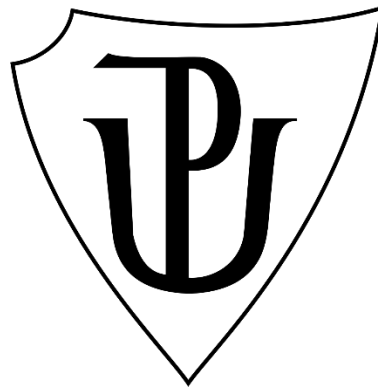


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Stanovení parametrů humorální imunity v různých tkáních včely medonosné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Marek Benda
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
Rok:	2023

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 9. 5. 2023

.....
Podpis studenta

Děkuji Mgr. Silvii Dostákové, Ph.D. za odborný dohled, věcné připomínky a trpělivost při vedení mé bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marek Benda
Název práce	Stanovení parametrů humorální imunity v různých tkáních včely medonosné
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) náleží mezi nejdůležitější opylovatele, mající nezastupitelnou roli jak v ekosystému, tak v zemědělství. Zdraví a přežití včel do značné míry závisí na správném fungování jejich imunitního systému, který sestává jednak z individuální, jednak ze sociální imunity. Individuální imunita zahrnuje fyzikální bariéry, jako je kutikula, buněčné odpovědi, jako je fagocytóza, a humorální odpovědi, jako je produkce antimikrobiálních peptidů. Včely také vykazují sociální imunitu, v jejímž rámci projevují např. grooming a hygienické chování, aby zamezily šíření patogenů včelstvem. Tato práce si klade za cíl prostudovat parametry humorální imunity v odlišných částech těla včely medonosné. Byla stanovena hladina celkových proteinů a antimikrobiálních peptidů abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu v hlavě, hrudi a zadečku zdravých včel a včel, jimž byly podány lipopolysacharidy. Soubor metod obsahoval zpracování vzorků, stanovení proteinů dle Bradforda a detekci výše uvedených peptidů pomocí metody ELISA. Výsledky ukázaly, že obsah proteinů se v různých částech těla lišil, s nejvyšší koncentrací v hrudích a nejnižší v hlavách. Vystavení lipopolysacharidům vedlo k navýšení koncentrace celkových proteinů v hrudích a zadečcích včel. Metoda ELISA prokázala, že lipopolysacharidy podané orálně v koncentracích 60 a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ skutečně indukovaly produkci abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu, a to ve všech tkáních. Tyto výsledky přináší další informace o rozmístění antimikrobiálních peptidů v různých částech těla včel v odpovědi na podněty k imunitní reakci.

Klíčová slova	Včela medonosná, humorální imunita, antimikrobiální peptidy, abaecin, defensin 1, hymenoptaecin, ELISA
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Marek Benda
Title	Determination of parameters of humoral immunity in different tissues of honey bees
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Honey bees (*Apis mellifera*) are among the most important pollinators, playing an indispensable role in both the ecosystem and agriculture. The survival and health of honey bees heavily rely on the proper functioning of their immune system, which comprises both individual and social immunity. Individual immunity involves physical barriers such as the cuticle, cellular responses such as phagocytosis and humoral responses such as the production of antimicrobial peptides. Honey bees also display social immunity, where they exhibit, e.g. grooming and hygienic behavior to prevent the spread of pathogens within the colony. This thesis aims to investigate the parameters of humoral immunity in distinct parts of the honey bee's body. It focuses on determining the levels of total protein and antimicrobial peptides abaecin, defensin 1, and hymenoptaecin in heads, thoraces, and abdomens of healthy honey bees and those administered with lipopolysaccharides. Methods used in the experimental part of this thesis include sample processing, Bradford protein assay, and detection of peptides mentioned above by ELISA method. The results showed that the total protein content varied across different body parts, with the highest concentration in thoraces, and the lowest in heads. Lipopolysaccharide exposure resulted in an increase in protein concentration in honey bees' thoraces and abdomens. As determined by ELISA, orally administered lipopolysaccharides at concentrations of 60 and 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ indeed induced the production of abaecin, defensin 1, and hymenoptaecin in all tissues. These findings provide an insight into the distribution of antimicrobial peptides in different body parts of honey bees in response to immune stimuli.

Keywords	Honey bee, humoral immunity, antimicrobial peptides, abaecin, defensin 1, hymenoptaecin, ELISA
Number of pages	79

Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Sociální imunita včel.....	2
2.1.1	Grooming	2
2.1.2	Hygienické chování.....	3
2.1.3	Hynutí jedinců a nekroforické chování	3
2.1.4	Termoregulace.....	3
2.1.5	Ochranný vliv včelích produktů.....	4
2.2	Individuální imunita včel	4
2.2.1	Fyzikální bariéry	6
2.2.2	Buněčná imunita.....	7
2.2.3	Humorální imunita	9
2.2.3.1	Lektiny a další rozpoznávací molekuly	10
2.2.3.2	Fenoloxidasová kaskáda	10
2.2.3.3	Lysozymy.....	12
2.3	Antimikrobiální peptidy	13
2.3.1	Dělení antimikrobiálních peptidů.....	13
2.3.2	Mechanismy účinku antimikrobiálních peptidů.....	15
2.3.2.1	Průnik vnějšími buněčnými obaly	15
2.3.2.2	Interakce s cytoplazmatickou membránou	16
2.3.2.3	Mechanismy rozrušení cytoplazmatické membrány.....	17
2.3.2.4	Mechanismy účinků na vnitrobuněčné cíle	19
2.3.3	Antimikrobiální peptidy včely medonosné	22
2.3.3.1	Abaeciny	22
2.3.3.2	Apidaeciny	23
2.3.3.3	Defensiny	24
2.3.3.4	Hymenoptaeciny	25
2.3.3.5	Peptidy včelího jedu a mateří kašičky	25
2.3.3.6	Produkce antimikrobiálních peptidů.....	26
2.4	Signální dráhy	29
2.4.1	Signální dráha Toll.....	29
2.4.2	Signální dráha JAK/STAT	30
2.4.3	Signální dráha Imd	30
2.4.4	Signální dráha JNK	31
2.5	Metoda ELISA	32
2.5.1	Varianty a modifikace metody ELISA.....	33
2.5.2	Využití metody ELISA	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Materiál	37
3.1.1	Chemikálie	37
3.1.2	Biologický materiál.....	38
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	38

3.1.4	Použité roztoky.....	38
3.2	Metody	39
3.2.1	Metoda dle Bradforda	39
3.2.1.1	Zpracování vzorků	39
3.2.1.2	Příprava kalibračních standardů.....	40
3.2.1.3	Průběh stanovení.....	41
3.2.2	Metoda ELISA	41
3.2.2.1	Zpracování vzorků	41
3.2.2.2	Příprava standardů antimikrobiálních peptidů	42
3.2.2.3	Průběh stanovení.....	42
3.3	Software	43
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	44
4.1	Koncentrace proteinů ve vzorcích tělních částí	44
4.2	Srovnání sekvencí antimikrobiálních peptidů se svými epitopy.....	47
4.3	Pozitivní a negativní kontroly metody ELISA.....	47
4.4	Zastoupení antimikrobiálních peptidů ve vzorcích tělních částí.....	48
5	ZÁVĚR.....	54
6	LITERATURA	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	69

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma humorální imunita včel, zaměření na jednotlivé tělní tkáně a produkci humorálních faktorů
- Analýza hladiny antimikrobiálních peptidů v různých tkáních včel (hlava, hrud', zadeček) po infekci (metoda ELISA)

1 ÚVOD

Včely jsou patrně nejznámějšími, celosvětově rozšířenými zástupkyněmi hmyzích opylovatelů. Zajišťují chod přírodních ekosystémů, jakož i dostatek lidské obživy. Ze včelích produktů nenachází uplatnění pouze med, ale i mateří kašička, vosk, propolis, a dokonce včelí jed. Proto není překvapivé, že jejich globální zdraví může mít hluboký dopad na ekologickou rovnováhu, potravinovou bezpečnost i ekonomiku.

Zdraví včelstev je konstantně ohrožováno různými škůdci a mikroorganismy. Včely si v boji proti nim vyvinuly sadu behaviorálních, buněčných a chemických odpovědí, jež jsou spolu s anatomickými fyzikálními bariérami kolektivně zvané včelí imunita.

Chemické odpovědi jsou předmětem humorální imunity. Účastní se jí patogeny rozpoznávající molekuly, které skrze signální dráhy moduluji hladiny efektorových molekul, např. lysozymů, melaninu, a především antimikrobiálních peptidů.

Význam výzkumu zdraví, potažmo imunity včel tkví v lepším porozumění jejím komplexním mechanismům a z toho plynoucí efektivnější ochraně a předcházení úbytkům chovaných plemen včely medonosné.

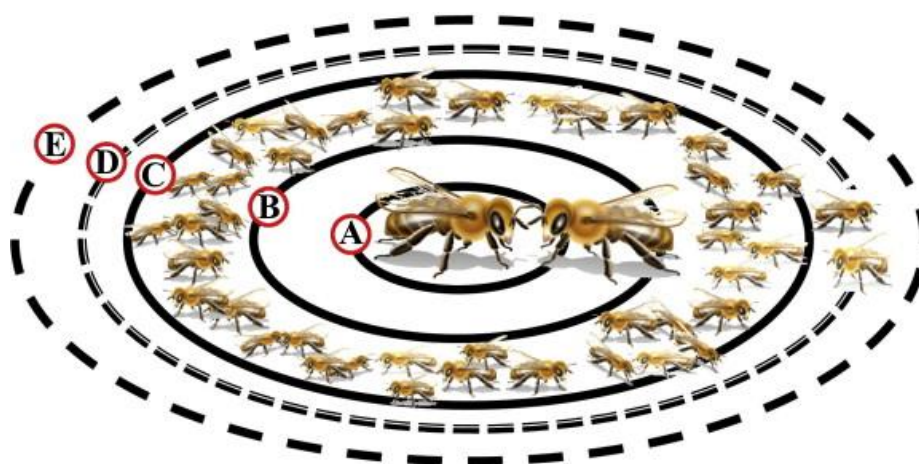
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Sociální imunita včel

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je klasickým příkladem druhu společenského hmyzu. Podobně jako termity, mravenci nebo některé vosy vede eusociální styl života, vyznačující se rozdělením dospělců do reprodukčních a nereprodukčních kast, starajících se o potomstvo. Druhým významným rysem je soužití alespoň dvou generací v jednom společenství – v hnízdech, popř. v úlech (Hölldobler & Wilson, 2009). Tato společenství mohou být s ohledem na vysokou hustotu jejich osídlení vhodnými cíli pro patogeny (Schmid-Hempel, 1995). Pojmem sociální imunita se rozumí soubor behaviorálních a fyziologických vlastností umožňujících jednotlivým členům společenství jim snáze odolávat (Harwood et al., 2021). U včel pracuje na vícero úrovních a v kombinaci s jejich individuální imunitou je celé včelstvo chráněno před onemocněními (Obr. 1). Toho dosahuje rozličnými mechanismy, jakými jsou např. grooming nebo hygienické chování (Evans et al., 2006).

2.1.1 Grooming

Grooming znamená samostatné i vzájemné odebírání ulpělých prachových či pylových částic, ale i ektoparazitů z povrchu těla včel. Do češtiny by se tento pojem dal přeložit jako „hřebelcování“. V průběhu čištění mohou včely parazity poranit nebo rovnou zabít (Ruttner & Hänel, 1992; Boecking & Spivak, 1999). Intenzivní grooming pomáhá včelstvu zvládat např. infestaci kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) (Russo et al., 2020).



Obr. 1: Přehled úrovní obrany včelstva: individuální imunita (A), vzájemný grooming (B), činnosti pramenící z dělby práce jako třeba hygienické chování (C), bránění vstupu a uchycení infekčních činitelů (D), používání pryskyřic a dalších látek k „opevňování“ hnízd (E) (převzato a upraveno z Evans & Spivak, 2010).

2.1.2 Hygienické chování

Hygienické chování zahrnuje rozpoznání, odvíčkování a odstranění nakaženého či uhynulého včelího plodu (Woodrow & States, 1943; Spivak, 1996). Rozeznání se děje na základě čichových vjemů (Masterman et al., 2001). Procedura je účinná jen tehdy, mají-li včely dobře vyvinutý čistící pud. Pokud tomu tak je, dovedou detekovat zápach nezdravého plodu už při nízkých koncentracích, kdy onemocnění ještě nedospělo do infekční fáze. V opačném případě může vyklízení buněk spíše napomoci šíření choroby (Masterman et al., 2001; Evans & Spivak, 2010).

V různých člancích zmiňovaná varroa-senzitivní hygiena včel se dá chápat jako podmnožina hygienického chování, spočívající v odklizení kukel napadených kleštíky a narušení jejich reprodukčního cyklu (Spivak, 1996; Harris, 2007). Uvažuje se též o dopadu pouhého odvíčkování a zavíčkování buněk, kdy dělnice zanechají zamořený plod uvnitř. K přerušení rozmnožování roztoče by mohlo dojít např. už jen změnou okolní vlhkosti (Kraus & Velthuis, 1997; Oddie et al., 2018). Přestože schopnostmi hygienického chování i groomingu oplývá zejména včela východní (*Apis cerana*), objevují se i u včely medonosné, nicméně v menším měřítku (Boecking & Spivak, 1999).

2.1.3 Hnutí jedinců a nekroforické chování

U plodu včely východní byl také pozorován jev, který Page et al. (2016) nazvali sociální apoptóza. Prokázali, že po poranění hyne mnohem častěji než plod včely medonosné.

Podle Conroy a Holmana (2022) se podobně altruisticky mohou zachovat i dospělci včely medonosné. Zjistili, že část dělnic, jimž byly podány lipopolysacharidy (LPS), včelstvo dobrovolně opustila a zemřela mimo něj. Početnější skupinu však vyhnaly ostatní zdravé dělnice, což souhlasí se závěry předchozího experimentu s nemocnými včelami, provedeného Baracchim et al. (2012).

Dospělce, kteří přesto ve hnízdě zemřeli, odklízí včelstvo pryč, obdobně jako plod. Tento pud se označuje jako nekroforické chování (Visscher, 1983). Nekroforické a hygienické chování je provázáno – dělnice se často specializují na oba úkony zároveň (Perez & Johnson, 2019).

2.1.4 Termoregulace

Včely si vyvinuly sofistikované strategie pro udržování stálého prostředí ve svých hnízdech. Kolektivně je ventilují, ochlazují anebo zahřívají, a to opakovanými kontrakcemi svých létacích svalů. Jejich schopnost provádět třesovou termogenezi byla adaptována coby obranný mechanismus proti škůdcům (Seeley & Visscher, 1985; Evans

& Spivak, 2010). Útoky sršní odráží dělnice včely východní i medonosné tak, že predátora hromadně obklopí a svalovými záškuby doslova uškvaří (Ono et al., 1995; Baracchi et al., 2010).

Starks et al. (2000) si povšimli, že v úlech postižených zvápenatěním včelího plodu panuje vyšší teplota než obvykle, a tento úkaz pojmenovali behaviorální horečka. Její význam přisoudili snaze včel vypořádat se s infekcí. Jelikož se uvedená sociální reakce v pozdější studii minula účinkem, zvažují její autoři mj. hypotézu, že patogen včelami manipuluje, aby rychleji proliferoval (Campbell et al., 2010; Goblirsch et al., 2020).

2.1.5 Ochranný vliv včelích produktů

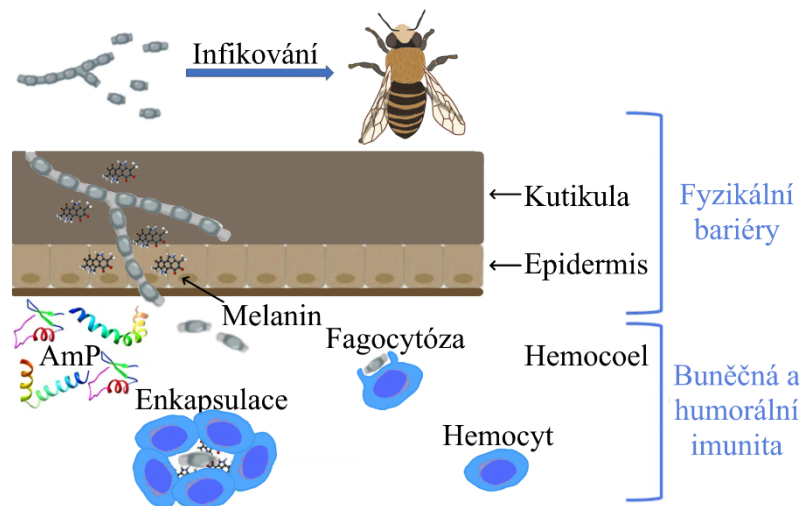
Souhrn behaviorálních mechanismů posilujících zdraví včelstva uzavírá tvorba včelích produktů, zejména propolisu. Jedná se o směsici pryskyřic sesbíraných z rostlin a smíchaných s voskem a výměšky slin. Včely jím obkládají stěny hnízd, zatěsňují případné průrvy a mumifikují zabitě vetřelce, které nejsou schopny z hnízda odnést (Bankova et al., 2000; Castaldo & Capasso, 2002). Propolis obsahuje terpenoidy a fenolové látky včetně flavonoidů s antimikrobiální aktivitou, a přispívá tak k sociální imunitě (Evans & Spivak, 2010; Pasupuleti et al., 2017).

Látky působící proti patogenům jsou obsaženy i v dalších včelích produktech. Med včelstvu dodává flavonoidy a fenolové kyseliny (Pasupuleti et al., 2017). Mimoto do něj včely vylučují glukosaoxidázu (β -D-glukosa:kyslík 1-oxidoreduktasa, EC 1.1.3.4) generující peroxid vodíku, který podstatně omezuje růst mikroorganismů, a antimikrobiální peptid (AmP) royalisin (Brudzynski, 2006; Bučeková et al., 2014). Ten se nalézá, spolu s jinými peptidy zvanými jelleiny a výše zmíněnými přírodními látkami, i v mateří kašičce (Fujiwara et al., 1990; Fontana et al., 2004; Harwood et al., 2021).

Baracchi et al. (2011) ve voskovém extraktu detekovali melittin a apamin, peptidy včelího jedu. Vyvodili z toho, že by si je včely mohly odkládat do pláštíků a tímto způsobem napomáhat ochraně včelstva. Těmito a dalšími bioaktivními peptidy se bakalářská práce bude zabývat podrobněji.

2.2 Individuální imunita včel

Obranné strategie včelího individuálního imunitního systému lze rozčlenit do tří kategorií: fyzikálních bariér, humorální a buněčné imunity (Daníhlík et al., 2016). Fyzikální bariéry prostorově oddělují prostředí organismu od okolí (Obr. 2). V hemocoelu, hmyzí tělní dutině, dochází jak k buněčné, tak humorální imunitní odpovědi. K mechanismům té buněčné se řadí např. fagocytóza či enkapsulace patogenů.



Obr. 2: Schematické zobrazení včelího individuálního imunitního systému. První linii obrany představují fyzikální bariéry, kutikula a epidermis. V hemocoelu se odehrávají reakce buněčné a humorální imunity včetně fagocytózy, enkapsulace, melanizace a působení antimikrobiálních peptidů (AmP) (převzato a upraveno z Manniello et al., 2021).

Jsou zprostředkovány specializovanými buňkami – hemocyty (Marmaras & Lampropoulou, 2009) (Obr. 2). K molekulám figurujícím v humorální odpovědi patří kupříkladu antimikrobiální peptidy (AmP) nebo složky fenoloxidasové kaskády, produkující melanin (Obr. 2). Zajišťují primárně lýzi cizích buněk, resp. melanizaci (Hillyer, 2016).

Ačkoliv byl včelí imunitní systém v předešlém odstavci rozdělen na dílčí oddíly, nelze tvrdit, že by při aktivaci imunity vystupovaly nezávisle na sobě. Naopak účinkují současně, a to i v případě fyzikálních bariér, kdy byly na povrchu kutikuly nalezeny cytolytické peptidy melittin a apamin (Baracchi & Turillazzi, 2010). Humorální a buněčná imunitní odpověď je dobře koordinována a navzájem regulována (Lavine & Strand, 2002). Zásadní podíl na tom nesou signální dráhy, konkrétně dráhy Toll, JAK/STAT, Imd a JNK (Evans et al., 2006). Zabývá se jimi kapitola 2.4.

Vzhledem k nepřítomnosti obratlovcům vlastní adaptivní imunity, založené hlavně na protilátkách (Ab) a T-lymfocytech, tedy život včel a vůbec bezobratlých závisí na vrozených mechanismech jejich imunitního systému (Hillyer, 2016; Hořejší et al., 2017). Přesto však byla u mnoha druhů hmyzu demonstrována existence typického rysu adaptivní odpovědi, imunologické paměti – mnohem efektivnější reakce na opětovné setkání s patogenem (Hillyer, 2016; Hořejší et al., 2017).

Tato pozoruhodná skutečnost, známá jako imunologický nebo také imunitní priming (česky imunitní průprava), nabádá k zamyšlení, zda by jistým funkčním ekvivalentem adaptivní imunity nemohly disponovat i včely (Little & Kraaijeveld, 2004; Tetreau et al., 2019). Článek Harwooda et al. (2021) pojednává o tzv. transgenerační imunitní průpravě, kdy se z rodičovské generace na potomky přenáší připravenost imunitního systému (Tetreau et al., 2019). Odhalil, že včely kojičky secernují fragmenty bakterií *Paenibacillus larvae* způsobující mor včelího plodu do mateří kašičky, jíž krmí matku. Autoři vyslovili domněnku, že by se tyto imunogenní molekulární vzory (viz podkapitola 2.2.3.1) mohly díky proteinu vitellogeninu dostat do jejích vaječnicků, indukovat imunitní odpověď v zárodcích a zvýšit odolnost plodu vůči onemocnění (Wheeler & Kawooya, 1990). Na těchto informacích postavili Dickel et al. (2022) experiment, v němž matkám orální cestou podali bakterin, což vyústilo ve sníženou úmrtnost larev po vystavení sporám patogenu. V lednu 2023 schválilo Ministerstvo zemědělství Spojených států použití vakcíny proti moru včelího plodu pro americké komerční včelaře (Milman, 2023). Na druhou stranu podobný experiment pracující s živými buňkami původce hniloby včelího plodu, bakteriemi *Melissococcus plutonius*, neuspěl (Ory et al., 2022). Transgenerační imunitní priming se i tak ukazuje být velmi rozsáhlou a, osvědčí-li se očkování, možná i průlomovou souhrou včelí sociální a individuální imunity, jíž se dále budou věnovat následující podkapitoly.

2.2.1 Fyzikální bariéry

Základní formu obrany proti patogenům představují fyzikální bariéry, zabraňující jejich vstupu do organismu. U včel, resp. hmyzu je nejvýznamnější bariérou kutikula, která pokrývá celý povrch těla a vystýlá vzdušnice a trávicí trakt s výjimkou žaludku (Chapman et al., 2013). Kutikula se skládá především z polysacharidu chitinu, kutikulárních proteinů, *N*-acetyldopaminu a *N*- β -alanyldopaminu. Oxidací těchto derivátů Tyr vznikají chinony reagující s proteiny za tvorby zesíteného sklerotinu. Intenzita zesítení určuje, nakolik bude kutikula pružná či tuhá (Liao et al., 2018). Kutikula je dále prostoupena a potáhnuta nenasycenými mastnými kyselinami a vosky vykazujícími antifungální aktivitu (Gliński & Buczek, 2003).

Vnitřní výstelku žaludku netvoří kutikula, nýbrž peritrofická membrána obdobného složení. Sestává z chitinu, proteinů a glykoproteinů a podílí se na trávení a absorpci přijaté potravy (Martin et al., 2006; Erlandson et al., 2019). Přítomné glykoproteiny napomáhají vychytávat mikroorganismy jejich navázáním na svoji sacharidovou složku (Erlandson et

al., 2019). Mikrobi napadající trávicí soustavu včel musí rovněž čelit nehostinným podmínkám navozeným nepříznivým pH, trávicími enzymy, pozřenými antimikrobiálními látkami a kompeticí s přirozeným střevním mikrobiomem (Gliński & Jarosz, 1995a).

Některé včelí patogeny dovedou chitinové ochranné vrstvy degradovat a vyvolat infekci. Např. *P. larvae* rozkládá peritrofickou membránu včelích larev pomocí (1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukanglykanohydrolas (chitinasa, EC 3.2.1.14) (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013). Jiné, zejména viry, z nichž je nejproslulejší virus deformovaných křídel, využívají mechanického poškození kutikuly kleštíkem včelím (Chen et al., 2004; Annoscia et al., 2019). Posledními překážkami dělicími patogeny, které překonaly peritrofickou membránu, od hemocoelu, popř. kutikuly jsou epiteliální buňky a bazální lamina, eventuálně svalové buňky (Gliński & Jarosz, 1995a; Ceylan et al., 2019).

2.2.2 Buněčná imunita

Patogeny, které pronikly skrze fyzikální bariéry do hemolymfy cirkulující v hemocoelu, jsou zde konfrontovány vlastní imunitní odpovědí organismu. Na buněčné úrovni ji zprostředkovávají hemocyty (Gliński & Jarosz, 1995a; Marmaras & Lampropoulou, 2009). Hemocyty včel bývají v literatuře děleny na subpopulace podle různých kritérií, např. morfologie, pohyblivosti či přilnavosti k podkladu, což vede ke stále přetrvávající nejednotnosti jejich klasifikace (Gábor et al., 2020) (Tab. 1). Richardson et al. (2018) pomocí mikroskopie a diferenčního barvení vypožorovali, že nejvíce zastoupeným typem hemocytů u včel jsou plasmacyty následované granulocyty. Plasmacyty charakterizovali jako malé asymetrické buňky s relativně velkým jádrem, granulocyty jako větší kulaté buňky obsahující mnoho membránových váčků. Detekovali i nesourodou skupinu permeabilizovaných buněk, nacházejících se ve stádiu rozkladu. Gábor et al. (2020) s použitím imunochemických technik rozlišili oenocytoidy, velké oválné buňky s malým jádrem a granuly (El Mohandes et al., 2010). El Mohandes et al. (2010) vedle toho mikroskopováním popsali nediferenciované prohemocyty, koagulocyty a dvoujaderné buňky (binucleated cells), které pravděpodobně představovaly hemocyty v průběhu mitózy. Počet hemocytů larev je oproti dospělcům zvýšen, ve stádiu kukly dosahuje maxima a poté má tendenci klesat s věkem (Schmid et al., 2008; Wilson-Rich et al., 2008). U larev v hemolymfě poněkud anomálně koluje více granulocytů než plasmacytů (Richardson et al., 2018).

Hemocyty zajišťují několik obranných procesů, a to fagocytózu, nodulaci a enkapsulaci. Tyto procesy mají společný cíl – odstranění patogenů z hemolymfy (Marmaras & Lampropoulou, 2009). Během fagocytózy jsou malé částice, nejčastěji bakterie, spory hub či fragmenty mycelia, pohlceny hemocyty a v útrokách fagolysosomu zneškodněny (Gliński & Buczek, 2003; Siva-Jothy et al., 2005). Fagocytózy se účastní včelí plasmatocyty a zejména granulocyty (Richardson et al., 2018). Nodulace spočívá v obalení shluků bakterií hemocyty a jejich prostorové izolaci. Uvězněné mikroorganismy následně zanikají v návaznosti na nedostatek kyslíku, aktivaci fenoloxidasové kaskády a vystavení antimikrobiálním peptidům (Strand, 2008). Enkapsulace se od nodulace liší pouze povahou patogena – nastává, pokud se jedná o velké parazity, jako jsou prvoci nebo hlístice (Marmaras & Lampropoulou, 2009). Uplatňuje i při infikování houbami (Gliński & Buczek, 2003). Ze studie uskutečněné Gábor et al. (2017) vyplývá, že se za enkapsulaci a nodulaci u včel zodpovídají hlavně plasmatocyty.

V neposlední řadě hemocyty pomáhají s hojením hlubokých ran. Rychle migrují k místu poranění a fagocytují jednak odumírající tkáň, jednak mikroby napadající organismus. Stejně tak zde koagulují, čímž zamezují vniku dalších patogenů do hemolymfy (Gliński & Jarosz, 1995b). Vytvořením zátky z hemocytů i navazujícím spuštěním fenoloxidasové kaskády celý děj nápadně připomíná enkapsulaci. Odehrává se ale mnohem rychleji (Siva-Jothy et al., 2005).

Tab. 1: Přehled charakterizací populací hemocytů napříč vybranou literaturou (vytvoreno podle Gábor et al. 2020).

Pojmenování hemocytů	Autoři	Metody použité pro určení	Funkce
Dvoujaderné buňky Granulocyty	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
	de Graaf et al.	Průtoková cytometrie	-
	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
	Gábor et al.	Molekulární markery	Fagocytóza
	Richardson et al.	Diferenční barvení Barvení neutrální červení	- Fagocytóza
Koagulocyty	de Graaf et al.	Průtoková cytometrie	-
	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
Oenocytoidy (oenocyty)	de Graaf et al.	Průtoková cytometrie	-
	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
	Gábor et al.	Molekulární markery	Melanizace
Permeabilizované buňky Plasmatocyty	Ricardson et al.	Diferenční barvení	-
	de Graaf et al.	Průtoková cytometrie	-
	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
	Gábor et al.	Molekulární markery	Enkapsulace
	Richardson et al.	Diferenční barvení Barvení neutrální červení	- Enkapsulace
Prohemocyty	de Graaf et al.	Průtoková cytometrie	-
	El Mohandes et al.	Giemsovo barvení	-
L5-1	Negri et al.		-
L5-2	Negri et al.		-
W-1	Negri et al.	Morfologie, přilnavost	-
W-2	Negri et al.	k podkladu, pohyblivost	-
W-3	Negri et al.		-
W-4	Negri et al.		-

2.2.3 Humorální imunita

Na obranyschopnost včel má nepostradatelný vliv i humorální neboli látková imunita, operující na úrovni samotných molekul, příhodně nazývaných humorální faktory. Patří mezi ně např. lektiny, složky fenoloxidasové kaskády a AmP (Daníhlík et al., 2016). Analýza genomu včely medonosné z roku 2006 prokázala jedinou profenoloxidasu (proPO), tři lysozymy, pět AmP a několik rozpoznávacích molekul v čele s lektiny typu C. Ve srovnání s dobře prozkoumanými genomy modelových organismů jako octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) nebo komára *Anopheles gambiae* je v DNA včely medonosné zakódováno téměř o dvě třetiny méně imunitních genů (Evans et al., 2006; Zhao & Liu, 2022). Tuto relativně nízkou imunokompetenci jednotlivců zřejmě kompenzuje silně vyvinuté sociální chování (Evans et al., 2006).

Hlavními mediátory humorální imunity jsou AmP (Wu et al., 2018). Soustředí se na ně samostatná kapitola 2.3.

2.2.3.1 Lektiny a další rozpoznávací molekuly

V případě bezobratlých, neprodukujících Ab, lze za lektiny považovat veškeré neenzymové proteiny jevící vazebnou afinitu vůči sacharidům (Barondes, 1988). Lektiny se vyskytují na povrchu buněk i volně v hemolymfě (Gül & Ayvali, 2002). Hrají roli v adhezní schopnosti hemocytů – navozují jejich přilnutí k sacharidovým determinantám. Jiné zase modulují přestavbu jejich membránových glykoproteinových receptorů, a tím adhezi potlačují (Glatz et al., 2004). Ve včelí hemolymfě se při srážecích reakcích uplatňuje hemolektin, protein strukturně homologní s von Willebrandovým faktorem savců (Lesch et al., 2007; Gábor et al., 2017).

Pozornost imunologů však nejvíce poutá schopnost některých lektinů reagovat na přítomnost evolučně konzervovaných struktur – molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). PAMPs jsou exprimovány na povrchu mikroorganismů, ale ne vyšších organismů (Arason, 1996; Evans et al., 2006; Marmaras & Lampropoulou, 2009). Umožňují tudíž tělu určit, jaké buňky jsou součástí zdravého organismu a jaké nikoliv, což je stěžejní pro správné a efektivní fungování jakéhokoliv imunitního systému. Rozeznání je realizováno navázáním PAMPs na receptory rozpoznávající molekulární vzory (pattern recognition receptors, PRRs), kterými bývají právě lektiny a jim podobné sloučeniny (Hillyer, 2016). PRRs tvorbou komplexů s PAMPs podněcují buněčnou i látkovou imunitní odpověď. U včel plní úlohu PRRs z notné části lektiny typu C.

Lektiny typu C se skrže domény rozpoznávající sacharidy váží na LPS, PAMPs příznačné pro stěny gramnegativních (G⁻) bakterií (Jiang, 2008). U včel mimoto existují peptidoglykany rozpoznávající proteiny (PGRP) determinující přítomnost grampozitivních (G⁺) bakterií, β -1,3-glukany rozpoznávající proteiny (β GRP) detekující houby, galektiny, PRRs s fibrinogenovou doménou aj. (Evans et al., 2006; Danihlák et al., 2016).

2.2.3.2 Fenoloxidasová kaskáda

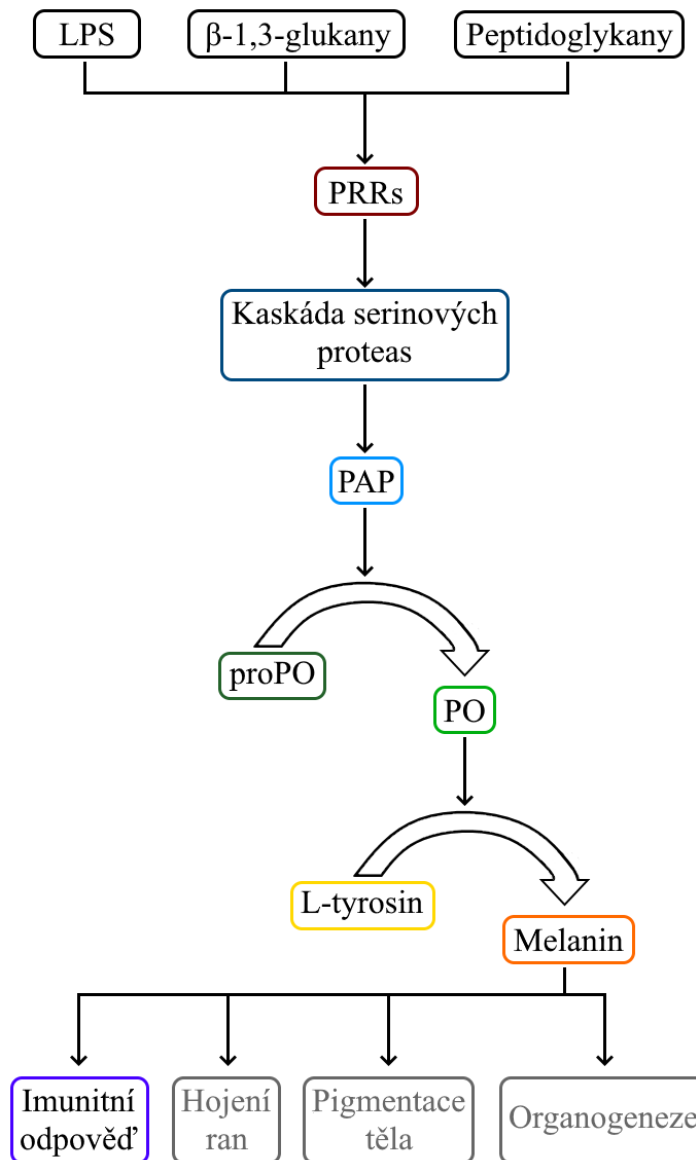
Fenoloxidasová kaskáda představuje jeden z ústředních molekulárně-biologických systémů hmyzí imunitní odpovědi – úzce se proplétá zejména s procesy buněčné imunity. Podporuje fagocytózu (Cerenius et al., 2008). Melanin, jenž jí je vylučován, zpevňuje kapsuly a noduly, nicméně primární cytotoxický účinek celé kaskády vůči patogenům se spíše připisuje vedlejším produktům jejích oxidačních reakcí, reaktivním formám kyslíku (ROS) a chinonům (Siva-Jothy et al., 2005; Cerenius et al., 2008).

Na počátku fenoloxidasové kaskády stojí profenoloxidasu aktivující systém (Cerenius & Söderhäll, 2004). Ten je stimulován výše diskutovanými PRRs reagujícími na PAMPs, v důsledku čehož se spustí kaskáda serinových proteas. Jejich poslední členek, pojmenovaný proPO-aktivující protein (PAP), rozštěpí zymogenní profenyloxidasu (proPO) na svoji aktivní formu, L-tyrosin,L-dopa:kyslík oxidoreduktasu (fenoloxidasu, PO, EC 1.14.18.1) (Siva-Jothy et al., 2005). Je zajímavé, že zatímco polypeptidový řetězec PAP obsahuje signální sekvenci, proPO ji postrádá (Cerenius & Söderhäll, 2004; Evans et al., 2006). Další zvláštností je, že na rozdíl od jiných humorálních faktorů zatím neexistuje přesvědčivý důkaz, že by přítomnost bakterií indukovala transkripci jejího genu (Lourenço et al., 2009). ProPO je zřejmě uskladněna uvnitř hemocytů, konkrétněji oenocytoidů, a její přeměna na PO probíhá po degranulaci v hemolymfě (Cerenius & Söderhäll, 2004; Gábor et al., 2020).

PO následně katalyzuje hydroxylaci okolních monofenolů na *o*-difenoly a oxidaci *o*-difenolů na *o*-chinony. Prvotním substrátem bývá L-tyrosin, který je převeden na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-dopa) a ten na L-dopachinon, jenž přes rozličné meziprodukty polymeruje na konečný produkt melanin (Marmaras et al., 1996). Tvorba melaninu touto cestou a s tím spjaté izolování patogenu se souhrnně nazývá melanizace. Projevuje se vznikem tmavých ostrůvků v hemolymfě (Hillyer, 2016).

Přínos melaninu pro hmyzí organismus přesahuje rozměr imunitní odpovědi – přispívá i k hojení ran, organogenezi či pigmentaci těla (Siva-Jothy et al., 2005; Whitten & Coates, 2017) (Obr. 3). Část enzymatického aparátu, který ho produkuje, se také podílí na sklerotizaci kutikuly (Marmaras & Lampropoulou, 2009).

Podle Schmid et al. (2008) je PO aktivita včelího plodu v porovnání s dospělci nízká. U trubců s věkem upadá, u matek naopak vzrůstá. Co se týče kasty dělnic, aktivita PO zůstává po prvním týdnu jejich života konstantní. Wilson-Rich et al. (2008) však tvrdí, že se aktivita PO s věkem dělnic zvyšuje, její nejvyšší hodnotu zaznamenali u létavek.



Obr. 3: Schéma fenoloxidasové kaskády doplněné o výčet biologických rolí melaninu včetně imunitní odpovědi (vytvoreno podle Cerenius & Söderhäll, 2012).

2.2.3.3 Lysozomy

Enzym peptidoglykan *N*-acetylmuramoylhydrolasa (lysozym, *N*-acetylmuramidasa, EC 3.2.1.17), jak je patrné ze systematického názvu, katalyzuje hydrolýzu β -1,4-glykosidové vazby mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem peptidoglykanu (Hillyer, 2016). Lyzuje stěny G⁺ bakterií, G⁻ bakterie jsou proti němu až na výjimky chráněny vrstvou LPS (Gliński & Jarosz, 1995a). Včely exprimují dva lysozomy typu c (chicken) a jeden typu i (invertebrate) (Evans et al., 2006). Dostupná o včelách pojednávající literatura jim nepřisuzuje antifungální aktivitu, třebaže je pro lysozomy

typu c typická a pro lysozomy typu i obvyklá (Gliński & Buczek, 2003; Callewaert & Michiels, 2010).

V hemolymfě včel se lysozomy vyskytují stabilně v malém množství (Hillyer, 2016). Po imunizaci se zvyšuje koncentrace pouze jednoho z c typů lysozymů (Evans et al., 2006). Za zdroj jejich produkce se považuje tukové tělísko (Gliński & Jarosz, 1995a).

Lysozomy mnoha živočichů, z třídy hmyzu např. octomilky, nabyly druhotné funkce coby trávicí enzymy produkované v různých částech digestivního traktu. Zda se tak stalo i u včely medonosné, není dosud známo (Kylsten et al., 1992; Callewaert & Michiels, 2010).

2.3 Antimikrobiální peptidy

AmP byly poprvé objeveny v kukle motýla martináče cekropijského (Steiner et al., 1981). Od té doby byly v hojném počtu popsány nejen u různých druhů hmyzu a vůbec bezobratlých, ale i u obratlovců včetně savců, dále pak u rostlin, hub, a dokonce bakterií (Zhang et al., 2021).

Navzdory tomu, že AmP jsou produkovány širokým spektrem organismů, je lze charakterizovat na základě několika společných vlastností. Jsou relativně malé, tepelně stabilní a neúčinkují na buňky mateřského organismu. Zato mohou působit proti G⁺, G⁻ bakteriím, houbám, parazitům a některým obaleným virům, přičemž si na ně tyto organismy vytváří rezistenci jen stěží (Takahashi et al., 2010; Li et al., 2012; Mwangi et al., 2019). AmP se mnohdy skládají z 20-50 aminokyselinových reziduí, z nichž převažují ty kationtové a hydrofobní (Takahashi et al., 2010; Wang et al., 2018). Mezi kationtové aminokyseliny (AK) se řadí Arg, Lys i His (Mi et al., 2017). Jde vlastně o všechny AK s polárními bazickými postranními řetězci. U hydrofobních AK jsou zastoupeny jak AK s nepolárními alifatickými, tak aromatickými postranními řetězci. Struktura AmP je často dotvářena rezidui Cys, jež oxidací svých sulfhydrylových skupin na cystin polypeptidový řetězec propojí a zpevní (Wang et al., 2018).

2.3.1 Dělení antimikrobiálních peptidů

Z výše uvedeného vyplývá, že AmP jsou amfifilní a mají celkový kladný náboj. Existuje však proporcionálně málo početná skupina aniontových AmP o celkovém náboji -1 až -7. Uplatňuje se v nich buď α -helikální motiv, nebo motiv cystinového uzlu a se záporně nabitými složkami cílových struktur někdy interagují prostřednictvím kovových kationtů (Harris et al., 2009). Samy přitom mívají zvýšený obsah Asp a Glu reziduí (Narayana & Chen, 2015). Li et al. (2009) se domnívají, že se lidský aniontový AmP dermcidin vyvinul

v reakci na adaptaci některých bakterií na běžné AmP tkvící ve snižování záporného náboje na svém povrchu.

Hmyzí kationtové AmP lze rozdělit na α -helikální peptidy, peptidy bohaté na Cys, peptidy bohaté na Pro a peptidy bohaté na Gly (Yi et al., 2014). V kationtových α -helikálních peptidech se ve velké míře vyskytují rezidua Ala, Leu či Lys, stabilizující šroubovicovou konformaci. Tyto peptidy ovšem postrádají Cys. Ve vodných roztocích jsou neuspořádané, svůj tvar zaujímají až při kontaktu s povrchem membrány (Takahashi et al., 2010). Doména α -helixu bývá situovaná na N-konci, C-konec může být rozvolněnější a amidovaný. Amidace chrání AmP před exopeptidasami, zvyšuje jejich náboj a poskytuje další vodíkovou vazbu pro zpevnění konformace (Tossi & Sandri, 2002). Typickými AmP patřícími do této skupiny jsou cekropiny (Brady et al., 2019).

Peptidy bohaté na Cys mohou v závislosti na počtu jeho reziduí tvořit β -vlásenky stabilizované jednou nebo dvěma disulfidovými vazbami a β -skládané listy stabilizované třemi nebo čtyřmi disulfidovými vazbami (Tossi & Sandri, 2002). Výskyt β -skládaných listů zvyšuje selektivitu peptidů bohatých na Cys vůči bakteriálním membránám v porovnání s těmi α -helikálními (Jin et al., 2005). Analogicky jako v jejich případě indukuje správné skládání AmP s β -vláskami právě přítomnost membrány, kdežto AmP s β -skládanými listy jsou ve vodném roztoku spíše rigidní, již složené, a tak v něm mají sklon svými hydrofobními zónami oligomerizovat (Yeaman & Yount, 2003; Liu et al., 2013). β -skládané listy může doprovázet α -helikální doména, jako tomu je u hmyzích defensinů (Cornet et al., 1995).

Poslední dvě skupiny, peptidy bohaté na Pro či Gly, mnohdy nevytváří charakteristické sekundární struktury a jejich stabilita závisí výhradně na vodíkových vazbách a při interakci s membránovými lipidy i na van der Waalsových silách (Zhang et al., 2021). Pokud se však v sekvenci AmP nachází mnoho Pro reziduí těsně u sebe, může se tato oblast stočit do polyprolinového helixu II. typu (PP II), levotočivé šroubovice se třemi rezidui na otočku (Kay et al., 2000). Peptidy bohaté na Pro z AK s polárními postranními bazickými řetězci jednoznačně upřednostňují Arg, s nímž Pro dává opakující se motiv Pro-Arg. AmP s vysokým obsahem Pro jsou také často amidované a *O*-glykosylované, což zvyšuje jejich antimikrobiální aktivitu (Tossi & Sandri, 2002; Yi et al., 2014). Glykosylace se netýká Pro ani hydroxyprolinu (Hyp), nýbrž Thr a Ser (Bulet & Stocklin, 2005). Peptidy bohaté na Pro mohou být zároveň bohaté i na Gly (Tossi & Sandri, 2002).

2.3.2 Mechanismy účinku antimikrobiálních peptidů

AmP vykazují četné, leckdy současně probíhající účinky, které zodpovídají za jejich obecně rychlý a silný antimikrobiální efekt. Ten pramení z poškození základních struktur zacílených buněk a narušení jejich funkcí. Prvním krokem působení AmP je interakce s cílovými buňkami za pomoci elektrostatických, hydrofobních nebo jiných interakcí, poté dochází k jejich konformační změně a akumulaci v prostředí cytoplazmatické membrány (CM), což po dosažení jisté prahové koncentrace vyústí ve ztrátu integrity membrány a usmrcení buňky, nebo translokaci AmP do cytosolu a inhibici intracelulárních komponent (Yeaman & Yount, 2003).

2.3.2.1 Průnik vnějšími buněčnými obaly

Prvotní kontakt AmP s patogenem je nejčastěji navozen elektrostatickými přitažlivými silami mezi kladně nabitým peptidem a záporně nabitým povrchem buňky. Tento poznatek platí zejména pro bakterie (Haney et al., 2010). Jedná-li se o houby, může být zapotřebí specifitějších interakcí.

Buněčná stěna G⁻ bakterií se skládá z vnější membrány, širokého periplazmatického prostoru s tenkou sítí peptidoglykanu a vnitřní (cytoplazmatické) membrány. Zatímco spodní část vnější membrány je tvořena fosfolipidy, svrchní část je složena z glykolipidů, především LPS (Silhavy et al., 2010). LPS jí udělují silný záporný náboj, pocházející z fosfátových, případně karboxylových skupin oblasti jádra a lipidu A (Raetz & Whitfield, 2002; Adams et al., 2014). Hancock a Chapple (1999) uvádějí, že AmP s aktivitou vůči G⁻ bakteriím pronikají skrze vnější membránu neutralizací jejího záporného náboje za vzniku trhliny, propouštějící AmP a jiné molekuly dovnitř. Alternativně podle nich může docházet k navázání AmP na vazebná místa LPS pro dvojmocné kationty, kompetitivnímu vytěsnění nativních Ca²⁺ a Mg²⁺ a deformaci vnější membrány vedoucí k jejímu rozrušení. Peptidoglykan je elektroneutrální a vcelku porézní, a pro prostupující AmP tudíž nepředstavuje překážku (Demchick & Koch, 1996; Malanovic & Lohner, 2016).

Buněčná stěna G⁺ bakterií není vybavena vnější membránou, její funkci zčásti přebírá mohutná vrstva peptidoglykanu (Silhavy et al., 2010). Nositelkou záporného náboje je zde kyselina teichoová, jež je k peptidoglykanu kovalentně připojená. Jestliže je navázaná k hlavičce membránového lipidu, označuje se jako lipoteichová kyselina (Neuhaus & Baddiley, 2003). Negativně nabitě řetězce (lipo)teichové kyseliny opět přitahují kladné AmP a pomáhají jim dosáhnout CM. Nicméně z jiného úhlu pohledu mohou být AmP

těmito polyaniontovými řetězci spíše vychytávány, čímž by se snížila jejich efektivní koncentrace na CM, a tím pádem i cytotoxicita (Malanovic & Lohner, 2016).

Pro průnik AmP do buněk hub je také nutné překonat buněčnou stěnu, sestavenou z glukanu, chitinu a glykosylovaných proteinů (Garcia-Rubio et al., 2020). Byly identifikovány různé AmP interagující s každou z těchto složek (Struyfs et al., 2021). Záporný náboj může mít i buněčná stěna hub. Mannosylové postranní řetězce glykoproteinů jsou u kvasinek fosforylované a melanin produkovaný mnoha zástupci hub je taktéž negativně nabitý (Eisenman & Casadevall, 2012; Orlean, 2012; Garcia-Rubio et al., 2020).

2.3.2.2 Interakce s cytoplazmatickou membránou

Veškeré biologické membrány jsou vystavěné z fosfolipidů, do nichž jsou zabudované proteiny. Přesto jsou AmP produkované organismem schopné rozlišit hostitelské membrány od membrán patogenů, na něž selektivně působí. Biologické membrány mají ze své podstaty amfifilní charakter – fosfolipidy se hydrofobními řetězci mastných kyselin shlukují do dvojvrstev lemovaných jejich hydrofilními hlavičkami. Odlišné složení polárních částí biologických membrán vytyčuje základní rozdíl mezi biomembránami eukaryotických a prokaryotických buněk. Ty eukaryotické obsahují hlavně fosfolipidy fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin či sfingomyelin. Každá z těchto molekul při fyziologickém pH existuje ve formě zwitterionu, má tedy nulový celkový náboj. Cholesterol, který moduluje fluidnost eukaryotických, ale jen zřídka prokaryotických CM, je rovněž nenabitý. Naproti tomu se v CM bakterií vyskytují převážně hydroxylované fosfolipidy fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin, disponující pouze zápornými náboji na fosfátech. Rozdíly v afinitách AmP k cílovým organismům může vysvětlovat odlišné rozvrstvení dílčích fosfolipidů na obou stranách biomembrán. Tuto transversální asymetrii mohou AmP svojí přítomností dokonce přímo ovlivňovat (Yeaman & Yount, 2003).

Dalším činitelem přispívajícím k selektivě AmP je transmembránový potenciál, generovaný nerovnoměrnou koncentrací iontů napříč biologickými membránami. Transmembránové potenciály bakteriálních buněk jsou totiž ve srovnání s eukaryotickými přibližně o 50 % nižší (Yeaman & Yount, 2003; McCormick, 2014).

Co se týče samotných AmP, nejdůležitější roli při interakci s CM hraje jejich konformace, kationicita a hydrofobicita. Hydrofobicita je vyjadřována jako množství reziduí hydrofobních AK nezbytných pro permeabilizaci membrány. Nabude-li příliš

velkých hodnot, AmP ztratí selektivitu působení a začnou cílit i na vlastní buňky. Jak již bylo zmíněno, interakci s negativně nabitou CM bakteriálních buněk v první řadě přivozuje celkový kladný náboj většiny AmP (Wang et al., 2018). Za nejnižší kladný náboj dovolující přilnutí AmP k CM je považován +2. S nárůstem kationicity antimikrobiální aktivita AmP nejprve stoupá a posléze klesá, stejně jako v prostředích s vysokými koncentracemi volných kationtů (Yeaman & Yount, 2003; Takahashi et al., 2010).

Některé antifungální AmP účinkují vlivem vazeb na specifické membránové proteiny nebo sfingolipidy hub (Li et al., 2006b; Matejuk et al., 2010). Jiné bioaktivní peptidy, povětšinou produkované bakteriemi, sice účinkují vůči houbám, projevují ale toxicitu i vůči savcím buněčným membránám (Fernández de Ullivarri et al., 2020).

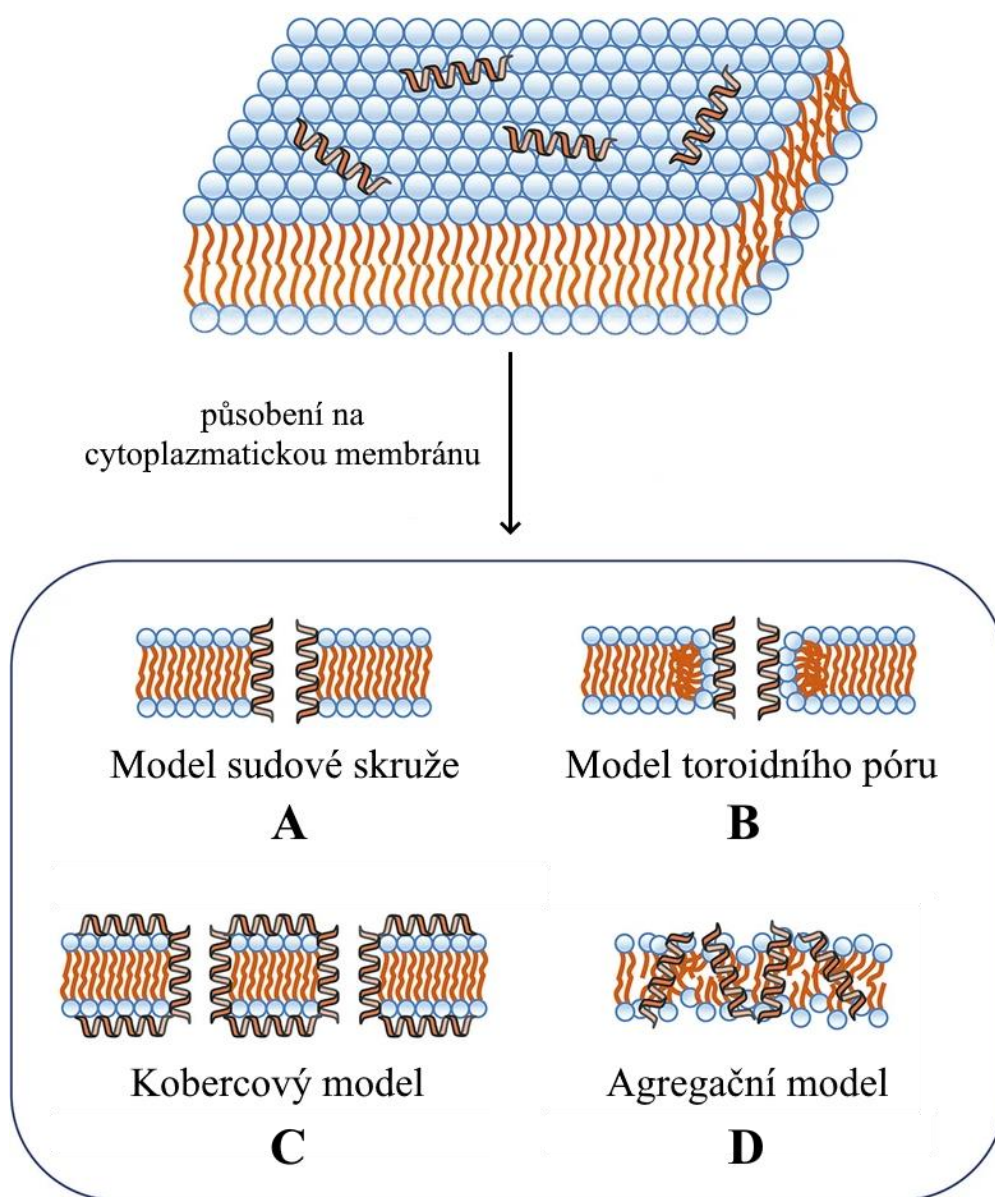
2.3.2.3 Mechanismy rozrušení cytoplazmatické membrány

Bezprostředně po asociaci AmP s CM se AmP orientují paralelně k rovině fosfolipidové dvojvrstvy. Peptidy dle míry své amfifility či hydrofobicity buď leží přímo na jejím povrchu, nebo jsou vnořené na rozhraní hydrofilních hlaviček a hydrofobních ocásků fosfolipidů (Sato & Feix, 2006). Akumulace AmP vede k zakřivení a zvětšení povrchu vnější strany CM, čímž se membrána ztenčuje (Chen et al., 2003; Sato & Feix, 2006). Po dosažení určitého poměru peptidů vůči lipidům se AmP přeorientují a poruší celistvost membrány, čemuž může dopomáhat i předchozí ztenčení CM (Brogden, 2005; Sato & Feix, 2006). V důsledku ztráty její integrity dochází k volnému toku iontů do buňky či ven z ní. Elektrochemický gradient se vyrovnává, transmembránový potenciál disipuje, na něm závislá syntéza ATP ustává a buňka umírá. K buněčné smrti vede i únik vitálních metabolitů a bobtnání předznamenávající osmolýzu (Shai, 1999; Sato & Feix, 2006).

Bylo navrženo hned několik modelových mechanismů popisujících efekty AmP na CM, jmenovitě model sudové skruže (barrel-stave model), model toroidního póru (toroidal pore model), kobercový model (carpet model) a agregační model (aggregate model) (Zhang et al., 2021).

Konformační změna nahromaděných AmP chovajících se podle modelu sudové skruže způsobuje nasměrování AmP kolmo vůči CM a její penetraci. Hydrofobní oblasti AmP se ocitají v kontaktu s mastnými kyselinami fosfolipidů, zatímco exponované hydrofilní zóny zprostředkovávají agregaci AmP na povrchu dutiny transmembránového kanálku (Lee et al., 2016a). Vzniklý pór připomíná plášť sudu a jednotlivé AmP, z nichž je seskládán, dužiny (Yeaman & Yount, 2003) (Obr. 4, A).

Na rozdíl od modelu sudové skruže dochází v rámci modelu toroidního póru k začleňování AmP do fosfolipidové dvojvrstvy za ohybu fosfolipidů kontinuálně propojujících obě strany CM (Matsuzaki et al., 1996; Brogden, 2005). Toroidní pór je tedy vybudován kolmě orientovanými AmP i hlavičkami fosfolipidů, s nimiž AmP stále interagují (Huang, 2000; Haney et al., 2010) (Obr. 4, B). Byly pozorovány i méně uspořádané toroidní póry, tvořené pouze jedním až dvěma mírně nakloněnými AmP. Zbytek AmP se nacházel na vnější straně CM poblíž transmembránového kanálku (Nguyen et al., 2011). Model toroidního póru vysvětluje, jak mohou AmP příliš malé na to, aby překlenuly fosfolipidovou dvojvrstvu, permeabilizovat CM (Sato & Feix, 2006).



Obr. 4: Shrnutí mechanismů AmP rozrušujících cytoplazmatickou membránu – model sudové skruže (A), model toroidního póru (B), kobercový model (C) a agregační model (D) (převzato a upraveno ze Zhang et al., 2021).

Kobercový model se od ostatních modelů odlišuje tím, že se AmP nevčleňují do CM. Namísto toho zůstávají paralelně asociované na vnější straně a dále se kumulují. Jakmile dospějí k prahové koncentraci, při níž pokrývají celý její povrch podobně jako koberec, tak se celá CM zhroutlí a rozpadne na kulovité micely (Hale & Hancock, 2007) (Obr. 4, C). Obdobným způsobem rozkládají biologické membrány detergenty (Wang et al., 2018).

Poslední zmíněný model je agregační. AmP se spolu s lipidy spojují do přechodných agregátů. Ty umožňují tvorbu kanálků provázenou únikem molekul, jakož i nelytickou translokaci peptidů přes CM a obnažení intracelulárních cílů (Haney et al., 2010; Zhang et al., 2021).

2.3.2.4 Mechanismy účinků na vnitrobuněčné cíle

Vedle široce přijímaného membránolytického mechanismu účinku AmP postupně získaly na pozornosti schopnosti některých AmP ovlivňovat vnitrobuněčné cíle (Hale & Hancock, 2007). Ukázalo se, že intracelulární inhibiční mechanismy AmP jsou stejně důležité jako mechanismy rozrušující CM a že oba typy účinků mnohdy probíhají synergisticky (Le et al., 2017).

Vnikání AmP do cytoplazmy, aniž by docházelo k lýzi membrány, nemusí probíhat výlučně na základě agregačního modelu – určité peptidy podněcují rapidní vznik velmi nestabilních toroidních pórů. Zánik takovýchto pórů je pak spojen s translokací peptidů do cytosolu (Uematsu & Matsuzaki, 2000; Yeaman & Yount, 2003). Madani et al. (2011) usuzují, že se AmP do buněk nepřenáší endocytosou, neboť jejich CM často chybí faktory potřebné pro její uskutečnění. AmP mohou být do cytoplazmy importovány i bakteriálními ATP-vázajícími kazetovými transportéry (ATP-binding cassette transporters) ve snaze snížit jejich koncentraci na CM a předejít lýze buňky (Groisman, 1994; Runti et al., 2013).

Po proniknutí dovnitř buňky se AmP zpřístupňuje řada možností, kterak mohou interferovat s jejím metabolismem (Obr 5). Nasedáváním na řetězce nukleových kyselin vyvolávají jejich poškození. Kationtové AmP vázající se na DNA pravděpodobně napodobují strukturu histonu H2A nebo atakují malý žlábek dvojšroubovice. S působením na DNA souvisí jejich centrální motiv Pro-Trp-Trp-Pro (Yonezawa et al., 1992; Park et al., 2000; Ghosh et al., 2014). Jiné AmP zase vykazují vyšší afinitu vůči jednovláknové RNA (Le et al., 2017). Správnou funkci nukleových kyselin mohou AmP narušovat blokováním replikace následkem inaktivace DNA topoisomerasy (DNA

topoisomerasa typu I, EC 5.6.2.1) i DNA topoisomerasy (ATP-hydrolyzující) (DNA topoisomerasa typu II, EC 5.6.2.2) (Vizán et al., 1991; Marchand et al., 2006; Zhang et al., 2021). Také mohou inhibovat transkripci, a to patrně interakcí s β' podjednotkou bakteriální nukleosidtrifosfát:RNA nukleotidyltransferasy (DNA-řízené) (RNA polymerasa, EC 2.7.7.6) (Yuzenkova et al., 2002) (Obr. 5).

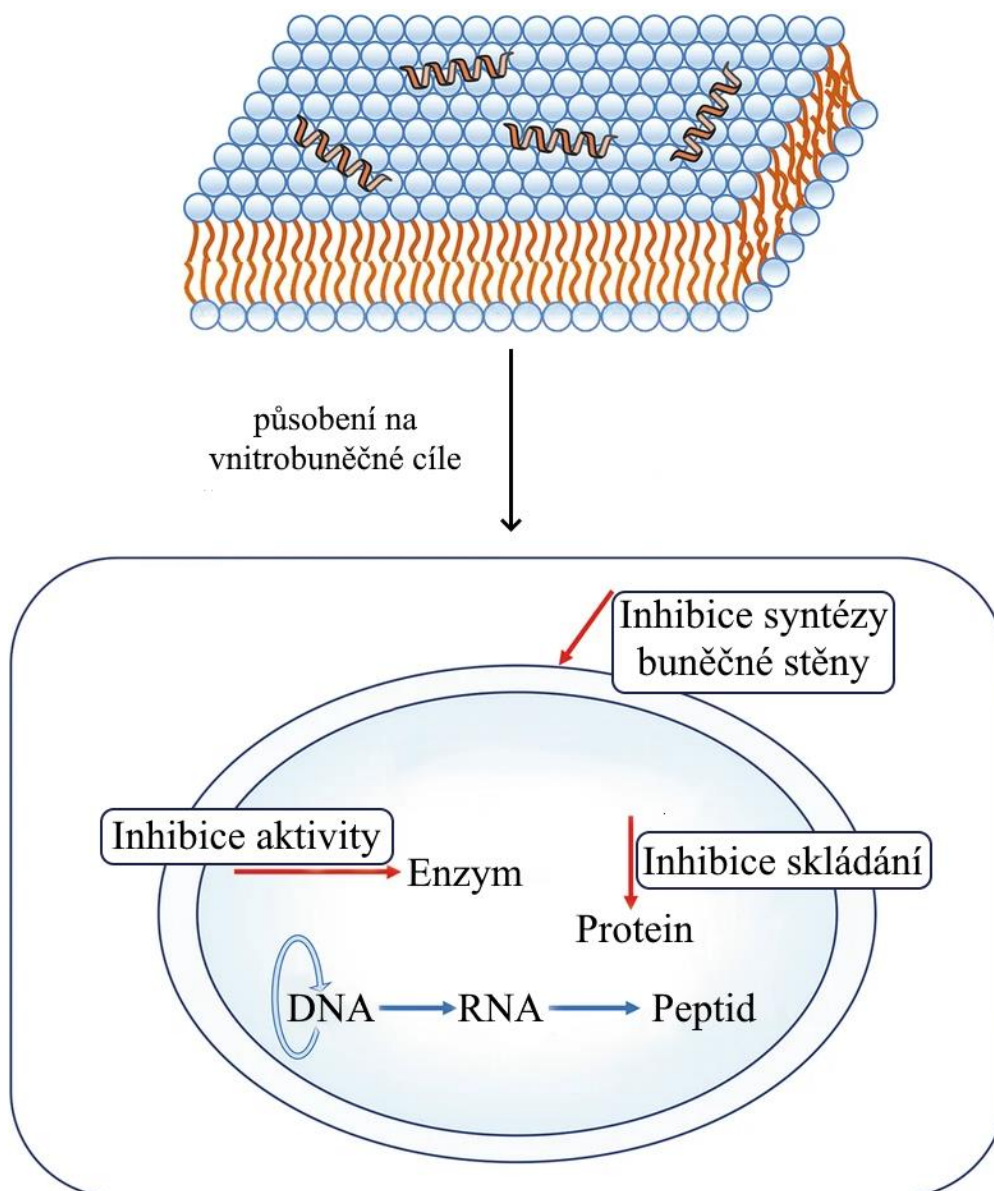
AmP bohaté na Pro často narušují translaci na ribosomech (Graf et al., 2017). Děje se tak navázáním AmP na sestavený 70S ribosom a zakrytím aminoacylového místa, peptidylového místa, jakož i aktivního místa peptidyl-tRNA:aminoacyl-tRNA *N*-peptidyltransferasy (peptidyltransferasa, EC 2.3.2.12) (Roy et al., 2015). Jiným prokázaným mechanismem je zadržení terminačních faktorů RF1 a RF2 na ribosomu po uvolnění nascentního proteinu, což má za následek vyčerpání jejich volných forem a znemožnění terminace translace na ostatních ribosomech (Florin et al., 2017) (Obr. 5).

Kromě proteosyntézy mohou AmP bohaté na Pro cílit na skládání proteinů (Le et al., 2017). Vazbou na C-koncové helixy tvořící „poklici“ chaperonu DnaK jej permanentně uzavřou, a tím inhibují jeho ATPasovou aktivitu a opravu špatně sbaleného proteinu (Kragol et al., 2001). Méně specificky se také vážou na chaperonin GroEL (Otvos et al., 2000) (Obr. 5).

Vnitrobuněčný účinek jistých AmP může zpětně ovlivnit integritu buněčné stěny. V bakteriální CM zakotvené molekuly lipidu II slouží k doručování stavebních bloků peptidoglykanu do periplazmatického prostoru pro syntézu buněčné stěny (Ng & Chan, 2016). Působením AmP na lipid II dochází k narušení tvorby peptidoglykanu, akumulaci jeho prekursoru přezdívaného Parkův nukleotid v cytoplazmě a proděravění buněčné stěny (Cammack et al., 2006; Sass et al., 2010) (Obr. 5). Shodný efekt nastává po uvolnění peptidoglykan-amidohydrolas (autolysin, EC 3.5.1.28) rozkládajících glykanové řetězce a tetrapeptidové můstky peptidoglykanu. Autolysiny se ovšem nenachází uvnitř buněk, nýbrž jsou u G+ bakterií poutány k lipoteichové kyselině. AmP rozrušující CM mohou zapříčinit delokalizaci glykolipidových kotev lipoteichové kyseliny a zároveň její deprotonaci, čímž se autolysiny aktivují (Yasir et al., 2019).

Literatura popisuje i další způsoby specifického intracelulárního působení AmP, např. deaktivaci dvoukomponentového regulačního systému používaného bakteriemi k přizpůsobení se změnám prostředí včetně vystavení AmP (Ho et al., 2012). Spadají sem i poruchy metabolismu sacharidů, purinů nebo argininu. V případě posledně jmenovaného metabolitu AmP cílí na L-arginin-karboxylasu (agmatin tvořící) (arginindekarboxylasa, EC 4.1.1.19), klíčovou pro zvyšování intracelulárního pH

a odolávání kyselému prostředí (Ho et al., 2016). Buněčný stres vyvolaný působením AmP na endoplazmatické retikulum vede k masivnímu vyplavení Ca^{2+} do cytosolu. S tím koreluje nárůst koncentrace mitochondriálních ROS zahajujících nekrotické změny (Lv et al., 2019). Le et al. (2017) navíc předpokládají, že AmP rozněcuje bakteriální mechanismy rezistence, jejichž aktivace ve výsledku naruší homeostázu a přivodí rozpad bakteriální buňky.



Obr. 5: Ukázka mechanismů AmP rozrušujících vnitrobuněčné cíle (převzato a upraveno ze Zhang et al., 2021).

2.3.3 Antimikrobiální peptidy včely medonosné

V hemolymfě včel byly nalezeny AmP abaecin, apidaecin, defensin a hymenoptaecin (Casteels et al., 1989; Casteels et al., 1990; Casteels et al., 1993; Casteels-Josson et al., 1994). Z mateří kašičky se podařilo purifikovat skupinu peptidů nazvanou jelleiny (Fontana et al., 2004). Již dlouhou dobu je znám melittin coby jedna z aktivních složek včelího jedu (Habermann, 1972).

Naproti tomu byla teprve nedávno demonstrována antimikrobiální aktivita kutikulárního proteinu apiderminu 2 (Kim et al., 2022). Hladina transkriptu jeho genu ve včelách vzrostla po podání usmrcených patogenů *P. larvae* a *Ascospaera apis*. Po nanesení rekombinantního apiderminu 2 na živé buňky *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis* a *Beauveria bassiana* bylo pod skenovacím elektronovým mikroskopem u všech tří mikroorganismů odhaleno poškození buněčné stěny (Kim et al., 2022). Eventuálnímu zařazení mezi AmP nebrání ani jeho velikost, svými 61 AK odpovídá spíše peptidům než proteinům (Kucharski et al., 2007).

2.3.3.1 Abaeciny

Abaecin byl původně objeven u včely medonosné (Casteels et al., 1990). Od té doby byly jemu strukturně i funkčně podobné AmP popsány nejenom u včely východní, ale i dalších blanokřídlých (*Hymenoptera*), např. čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) anebo parazitoida *Nasonia vitripennis* (Riddell et al., 2009; Xu et al., 2009; Tian et al., 2010).

Včelí abaecin má celkový náboj +4. Skládá se z 34 AK, z nichž 10 tvoří Pro (Casteels et al., 1990). Náleží proto do kategorie peptidů bohatých na Pro (Casteels et al., 1993). Přehled AK sekvencí abaecinu, apidaecinu, defensinu a hymenoptaecinu podává tabulka níže (Tab. 2). Všechny tyto AmP jsou v buňkách syntetizovány v podobě prekurzorových peptidů. 53 AK dlouhý prekurzor abaecinu jako jediný postrádá pro-sekvenci propojující signální sekvenci se sekvencí zralého AmP. Abaecin tudíž nabývá biologickou aktivitu patrně už v endoplasmatickém retikulu, kam je po translaci translokován (Casteels-Josson et al., 1994).

Abaecin účinkuje proti G⁺ a G⁻ bakteriím zhruba stejnou měrou. U abaecinu vyskytujícího se ve čmelácích bylo zjištěno, že zvyšuje aktivitu hymenoptaecinu a tento potenciační efekt propůjčuje i membránolytickým AmP jiných druhů hmyzu (Rahnamaeian et al., 2016). Poté, co jsou jimi odkryty intracelulární molekuly, atakuje protein DnaK (Rahnamaeian et al., 2015).

Tab. 2: Přehled sekvencí včelích antimikrobiálních peptidů (AmP) i s jejich isoformami (Casteels et al., 1989; Casteels et al., 1990; Casteels-Josson et al., 1994; Klaudiny et al., 2005; Dutta et al., 2008).

AmP	Isoforma	Sekvence
Abaecin	-	YVPLPNVPQPGRRPFPTFPQGPFNPKIKWPQGY
Apidaecin	Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
	Ib	GNNRPVYIPQPRPPHPRL
	II	GNNRPIYIPQPRPPHPRL
	III	GNNRPIYISQPRPPHPRL
Defensin 1	De-C	VTCDLLSFKGQVND SACAANCLSLGKAGGHCEKGVCI CRK-TSFKDLWDKRF
	Ro-F	VTCDLLSFKGQVND SACAANCLSLGKAGGHCEKGVCI CRK-TSFKDLWDKYF
Defensin 2	-	VTCDVLSWQSKWLSINHSACAIRCLAQRKGGSCRNGVICI-CRK
Hymenoptaecin	-	QERGSIVIQGTKEGKSRPSLDIDYKQRVYDKNGMTGDAYG-GLNIRPGQPSRQHAGFEFGKEYKNGFIKQGSEVQRGPGGR-LSPYFGINGGFRF

2.3.3.2 Apidaeciny

Stejně jako abaecin byl i apidaecin prvně izolován z hemolymfy včely medonosné a potom i z vícera štíhlopasích (Apocrita) – např. čmeláka zimního, vosy útočné (*Vespa germanica*) či kutilky *Sphecius speciosus* (Casteels et al., 1989; Li et al., 2006a). Všechny apidaeciny pojí obsah 18-20 AK, kladný náboj, zvýšený obsah Pro a vysoká homologie. Nejvíce evolučně konzervovaná bývá C-koncová oblast, napříč druhy nejproměnlivější zase ta N-koncová. Zatímco variabilní oblast apidaecinů vytyčuje spektrum bakterií, vůči nimž účinkují, konstantní podmiňuje jejich antimikrobiální aktivitu jako takovou. S ní patrně souvisí i její předpokládaná konformace PP II, dovolující apidaecinům navázat se na své molekulární cíle (Li et al., 2006a). Podle Otvoše et al. (2000) jimi jsou DnaK a GroEL. Z vnější strany CM by se k nim mohly dostat přes membránový transportér nebo oligomerizací předcházející permeabilizaci (Castle et al., 1999; Dutta et al., 2008). Casteels et al. (1990) si však nemyslí, že by působily jakkoliv lytický.

Včela medonosná ze společných multipeptidových prekurzorů, které byly detekovány jen u larev, produkuje tři isoformy apidaecinu: Ia, Ib a II (Tab. 2). Existence potenciální čtvrté isoformy III na úrovni proteinu dosud nebyla prokázána (Casteels et al., 1989; Li et al., 2006a; Danihlík et al., 2016). Dílčí isoformy se od sebe liší pouze bodovými záměnami AK a koncentracemi v hemolymfě po indukci ($c_{Ia} : c_{Ib} \approx 1 : 20$), antimikrobiální aktivitu mají srovnatelnou (Casteels et al., 1989). Apidaeciny jsou hlavní složkou včelí humorální odpovědi na infekci G- bakteriemi (Wu et al., 2018). Efektivně

účinkují vůči těm, jejichž životní cyklus je svázaný s rostlinami a včelu by mohly nakazit během sběru pylu, jde kupříkladu o rody *Erwinia* a *Rhizobium* (Casteels-Josson et al., 1994). Působí okamžitě, aktivita mechanismem účinku podobného abaecinu se projevuje až po prodlevě a v případě G– bakterií nedosahuje takové intenzity (Casteels et al., 1990).

2.3.3.3 Defensiny

Defensiny reprezentují rodinu na Cys bohatých AmP (Ilyasov et al., 2013). Jsou nejrozšířenějšími AmP mezi hmyzem a nachází se i u jiných živočichů včetně člověka, jakož i u rostlin (Raj & Dentino, 2002; Ding et al., 2009; Čeřovský & Bém, 2014). Králičí defensin byl vůbec prvním izolovaným zvířecím AmP (Raj & Dentino, 2002). Dle struktury se klasifikují do třech skupin: α -defensiny, β -defensiny a hmyzí defensiny (Bíliková et al., 2015). Hmyzí defensiny se vyznačují obsahem 34-51 AK, z nichž šest zastupuje Cys (Yi et al., 2014). Tvorbou disulfidových vazeb pomáhají stabilizovat dvě antiparalelní β -vlákna peptidu, jehož řetězec se dále směrem k N-konci skládá do amfifilního α -helixu a smyčky (Klaudiny et al., 2005).

Součástí genomu včely medonosné jsou dva geny pro defensin (Klaudiny et al., 2005). První z nich kóduje defensin 1, jenž má dvě isoformy. Jednou je defensin De-C, vyskytující se v hemolymfě, druhou royalisin Ro-F, nacházející se v mateří kašičce a v medu (Fujiwara et al., 1990; Kwakman et al., 2010). Royalisin se od defensinu z hemolymfy odlišuje substitucí na jedné AK, kde byl Tyr nahrazen Arg (Tab. 2). Oba peptidy sestávají shodně z 51 AK, udávají tedy horní limit pro délku hmyzích defensinů (Ilyasov et al., 2013). Příčinou je rozšíření amidovaného C-konce o dodatečný α -helix (Bučeková et al., 2014). Ačkoliv Klaudiny et al. (2005) ve svém článku tvrdí, že objevili novou isoformu defensinu 1, royalisin Ro-K, jimi stanovená sekvence se shoduje se sekvencí De-C otištěnou v předchozí práci, jejímiž autory jsou Casteels-Josson et al. (1994).

Přestože prekurzor defensinu 2, produkt druhého genu, je delší než u defensinu 1, v aktivním peptidu by mělo být zahrnuto pouze 43 AK. Pozbyl by tak veškeré C-koncové modifikace charakteristické pro jeho protějšek označený číslem 1 (Ilyasov et al., 2013). Jeho existence se doposud prokázala jen na úrovni transkriptu (Klaudiny et al., 2005).

Primárním účinkem defensinů bývá porušení integrity membrán patogenů a nejinak tomu je i u těch včelích (Raj & Dentino, 2002; Ilyasov et al., 2013) Jejich silná afinita vůči G+ bakteriím se zřejmě odvíjí od značného počtu Cys residuí a kompaktní struktury dané disulfidovými vazbami (Fujiwara et al., 1990). Royalisin působí proti *P. larvae*,

čímž napomáhá ochraně včelího plodu před infekcí. Je ale schopen destruovat i houby a některé G– bakterie, podobně jako defensin z hemolymfy (Ilyasov et al., 2013; Bíliková et al., 2015).

2.3.3.4 Hymenoptaeciny

Na rozdíl od v třídě hmyzu takřka všudypřítomných defensinů jsou hymenoptaeciny opět specifické jenom pro určité blanokřídlé druhy, jejich výskyt se překrývá s abaecinem (Riddell et al., 2009; Xu et al., 2009; Tian et al., 2010). Přísluší do skupiny peptidů bohatých na Gly (Casteels et al., 1993).

Včelí hymenoptaecin disponuje celkovým nábojem +5. Je vystavěn z 93 AK a N-koncové pyroglutamové kyseliny (Casteels et al., 1993). Vyštepuje se z prekurzoru o délce 129 AK a inhibuje růst jednak G+, jednak G– bakterií, přičemž v účinku vůči G– bakteriím jeví komplementaritu k apidaecinu. Narušuje jejich vnitřní i případnou vnější membránu (Casteels et al., 1993; Casteels-Josson et al., 1994). Pro indukování syntézy hymenoptaecinu, ale i abaecinu a defensinu 1 je v porovnání s apidaecinem zapotřebí větší množství patogenů, jejich nástup je rovněž opožděn (Casteels-Josson et al., 1994). Hymenoptaecin negativně reguluje expresi genu pro vitellogenin roztoče *Tropilaelaps mercedesae* (Wu et al., 2020a). Naopak expresi hymenoptaecinu a abaecinu ve včelách starých sedm dní snižuje expozice propolisu (Simone et al., 2009; Borba et al., 2015). Simone-Finstrom et al. (2017) mají pro tento fenomén vysvětlení – propolis, který sám o sobě vykazuje antimikrobiální účinky, snižuje energetické nároky organismu na imunitní odpověď. Včely pak mají k dispozici více živin pro přezimování, péči o plod apod.

2.3.3.5 Peptidy včelího jedu a mateří kašičky

V průběhu evoluce se u části blanokřídlých vyvinul bodací aparát jako prostředek k uchvácení kořisti. S rozvojem sociálního života se z žihadla a z jedu, který jím vytéká do rány, stala zbraň sloužící k obraně včelstva před predátory, ale i před patogeny (Baracchi et al., 2011). Hlavním toxinem včelího jedu je melittin (Habermann, 1972). Po odštěpení z prekurzoru sestává z 26 AK, jež mu dávají amfifilní charakter a aktivitu vůči celé paletě bakterií a hub (Habermann, 1972; Tosteson & Tosteson, 1981; El-Seedi et al., 2020). Mechanismy účinku melittinu jsou detailně prozkoumány. Primárně rozrušuje CM podle modelu toroidního póru (Yang et al., 2001). Třebaže se podílí na bolestivosti včelího bodnutí a vzniku zánětu, v malých dávkách má protizánětlivé účinky, poněvadž potlačuje činnost signálních drah regulujících hladiny mediátorů zánětu (Lee & Bae,

2016). Terapeutický potenciál melittinu ovšem brzdí jeho sklon k hemolýze, protože ho není vhodné považovat za AmP v užším slova smyslu – neúčinkuje selektivně proti mikroorganismům (Yang et al., 2001).

Antibakteriální a antifungální působení včelího jedu umocňuje peptid secapin, inhibující serinové proteázy včetně těch mikrobiálních (Hou et al., 2014; Lee et al., 2016b). A co víc, Van Vaerenbergh et al. (2013) v jedu včel detekovali AmP apidaecin.

Přidatné specifitější funkce v jedu včely medonosné zastávají peptidy apamin a mastocyty degranulující peptid (mast cell degranulating peptide, MCDP). Oba toxiny nedosahují ani čtyřprocentní koncentrace melittinu (de Lima & Brochetto-Braga, 2003). Apamin je znám jako neurotoxin a MCDP kromě toho facilituje vyplavení histaminu ze žírných buněk (Ziai et al., 1990). Shin et al. (2017) publikovali, že apamin potlačuje růst houby černě střídavé (*Alternaria alternata*). Na bakterie ale vliv nemá (Kuzmenkov et al., 2022). Antimikrobiální aktivita MCDP nebyla prokázána (El-Seedi et al., 2020).

Mateří kašička obsahuje vyjma royalisinu i další peptidy s antimikrobiálními vlastnostmi, jmenovitě jelleiny I, II a III, které působí na kvasinky a G⁺ i G⁻ bakterie. Poslední peptid, jellein IV, proti nim nevykazuje žádnou aktivitu. V kontrastu s melittinem nelyzuje červené krvinky ani jeden z nich (Fontana et al., 2004). Jelleiny jsou tvořeny enzymovým štěpením hlavního proteinu mateří kašičky 1 (major royal jelly protein 1, MRJP 1), produkovaného hltanovými žlázami včel a uvolňovaného do mateří kašičky (Fontana et al., 2004; Mureşan et al., 2022).

V mateří kašičce byl nalezen také peptid apisimin (Bíliková et al., 2002). Ačkoliv u něj nebyla a pořád není pozorována antimikrobiální aktivita, Evans et al. (2006) jej začlenili spolu s oběma defensiny, abaecinem, apidaecinem a hymenoptaecinem mezi včelí AmP (Bíliková et al., 2002; Danihlák et al., 2016). Nejnovější výzkum apisiminu na poli imunity poukazuje akorát na to, že v kombinaci s jinými látkami mateří kašičky stimuluje krevní monocyty (Gannabathula et al., 2015).

2.3.3.6 Produkce antimikrobiálních peptidů

Tak jako u skoro všech druhů hmyzu se i ve včele medonosné po střetnutí s patogeny zvyšuje exprese genů pro AmP, vedoucí k vyplavení abaecinu, apidaecinu, defensinu a hymenoptaecinu do hemolymfy (Casteels-Josson et al., 1994). Bulet a Stöcklin (2005) uvádí, že hmyz s proměnou dokonalou, kam spadají i blanokřídílí, syntetizuje AmP v různých epitelech, a především v tukovém tělísku, jež omývá hemolymfa (Larsen, 1976). Hmyz s proměnou nedokonalou je podle nich produkuje v hemocytech (Bulet &

Stocklin, 2005). Zhang et al. (2021) podotýkají, že AmP bezobratlých jsou distribuovány v hemolymfě, rozlišných tkáních a mukózních sekretech. Analýza proteinů slizových žláz trubců afrikanizovaných včel však na žádné AmP neupozorňuje (Colonello & Hartfelder, 2003).

Tukové tělísko zadečku sestává z volně přilehlých buněk s vysokým obsahem lipidů a glykogenu, obsahuje také proteinové granuly (Larsen, 1976; Costa-Leonardo et al., 2013). Novější studie na včelách dokládá, že se zde vedle adipocytů nachází i oenocytoidy. Dále poukazuje na jeho segmentaci a soudí, že dílčí segmenty jsou na sobě funkčně nezávislé a jejich rozvrstvení odpovídá vnějším tergům zadečku (Strachecka et al., 2021). Tukové tělísko slouží jako zásobárna živin a k tomu jeví značnou biosyntetickou aktivitu, z hlediska čehož ho lze přirovnat k játrům obratlovců (Larsen, 1976; Strachecka et al., 2021). Schönfeld (1955) ve své knize věnované včelařům zdůrazňuje, že se tuková tkáň vyjma zadečku vyskytuje i v hrudi za úponem podélných létacích svalů a u vkloubení křídel, ve hlavě pak v blízkosti tykadel.

Co se týče ostatních tkání potenciálně zapojených do produkce AmP, výzkum Maa et al. (2013) mj. ukázal, že se v žaludku včely medonosné transkribuje gen pro abaecin (Obr. 6 D). Žaludek končí přímo před vyústěním malpighických trubic, vylučujících z těla vodu a odpadní látky (Schönfeld, 1955). V tomto exkretčním orgánu byly u létavek nalezeny transkripty apidaecinu a defensinu 1 (Vannette et al., 2015) (Obr. 6 E).

Pro hlavy platí, že létavky exprimovaly geny kódující AmP rovněž v hltanových a mandibulárních žlázách, a to mnohem více než krmičky, což je překvapivé ze dvou důvodů (Vannette et al., 2015) (Obr. 6 A, B). Za prvé, hltanové žlázy jsou klíčové pro krmení a výživu plodu. Za druhé, s přibývajícím stářím včel obě žlázy atrofují (Schönfeld, 1955). Ze srovnání intenzity exprese AmP v hltanových vs. v malpighických žlázách vychází lépe hltanové, hladiny jejich genů jsou zde 1000× vyšší (Vannette et al., 2015).

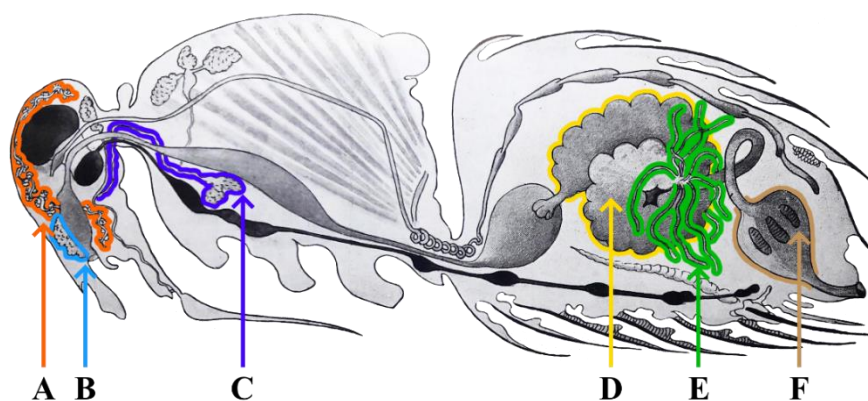
mRNA defensinu 1 byla v hltanových a mandibulárních žlázách detekována již dříve Klaudinym et al. (2005), kteří ji navíc našli i v hrudních (labiálních) žlázách (Schönfeld, 1955) (Obr. 6 A, B, C). mRNA defensinu 2 nestanovili ani v jedné tkáni, byť potvrdili její existenci v hrudi, jakož i v hlavě (Klaudiny et al., 2005).

Profily exprese abaecinu, apidaecinu, defensinu 1 i hymenoptaecinu ve hlavách a zadečcích dospělců publikovali Aronstein & Saldivar (2005). Transkript hymenoptaecinu v extraktu z hlavy nešlo zvolenou polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) detekovat. Bandy příslušící hymenoptaecinu v zadečku a apidaecinu v obou tělních částech byly sotva znatelné. Zato bandy abaecinu a defensinu 1 se vyvinuly dobře.

Tloušťka bandů defensinu 1 z hlavy a ze zadečku byla srovnatelná. Co se týče abaecinu, výraznější byl band pro zadeček.

Většina publikací zabývajících se expresí včelích imunitních faktorů dospívá k výsledkům analýzami mRNA, resp. cDNA (Casteels-Josson et al., 1994; Aronstein & Saldivar, 2005; Klaudiny et al., 2005; Mao et al., 2013; Vannette et al., 2015). Transkripce genů však nemusí nutně korespondovat s jejich translací do konečného proteinu (Dutta et al., 2008). Skutečné poměry tím pádem mohou lépe reflektovat techniky pracující s peptidy a proteiny. Houdelet et al. (2022) pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie a peptidového mapování s matricí asistovanou laserovou desorpce/ionizací (MALDI) vizualizovali a porovnali průřezy tkání zdravých včel a včel nakažených hmyzomorkou *Nosema ceranae*. S přispěním databáze molekulových iontů pak kromě jiného lokalizovali výskyt abaecinu, apidaecinu a royalisinu. Apidaecin byl zmapován rovnoměrně v oblasti toku hemolymfy hlavou, hrudí i zadečkem. Abaecin byl ve zvýšené koncentraci přítomen v hlavě a okolo žaludku a výkalového vaku (Obr. 6, F). Exprese royalisinu se omezila na hlavy včel, nejvyšší intenzity dosáhla v místě hltanových žláz (Obr. 6, A). Na rozdíl od obou AmP nedoznala v kontrolních a infikovaných vzorcích žádných změn.

V průběhu řešení své diplomové práce uplatnila Botíková (2022) k detekci abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu analýzu s enzymem vázaným na imunosorbent (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Z měření extraktů hlav LPS injektovaných včel vyplynulo, že navyšováním koncentrací LPS docházelo ke zdatnému vzestupu koncentrace defensinu 1 ve hlavách, což nutně nerozporuje pozorování Houdelet et al. (2022), protože růst hladin mohl být zapříčiněn výhradně isoformou z hemolymfy.



Obr. 6: Orgány, v nichž byl zaznamenán výskyt antimikrobiálních peptidů či jejich transkriptů. Hltanové žlázy (A), mandibulární (B) a labiální žláza (C), žaludek (D), malpighické trubice (E) a výkalový vak (F). Tukové tělísko není zakresleno (převzato a upraveno ze Schönfeld, 1955).

2.4 Signální dráhy

Signální dráhy neboli kaskády můžeme definovat jako „sekvence událostí umožňující buňkám přijmout signál a biologicky na něj reagovat“ (Kodíček, 2018, s. 39). Regulací buněčného metabolismu nebo exprese genů dávají buňkám schopnost komunikovat a plnit tělesné funkce, tu imunitní nevyjímaje (Akira et al., 2006; Alberts et al., 2008). V jejím případě se signální dráhy spouští reakcí rozličných PAMPs se specifickými PRRs. Indukují výraznou imunitní odpověď proti patogenu či skupině patogenů, jejichž PAMPs byly rozpoznány (Akira et al., 2006).

Ke zprostředkování imunitní odpovědi využívá včela medonosná celkem čtyři signální kaskády. Jde o signální dráhy Toll, JAK/STAT, Imd a JNK. Geny kódující signální molekuly jsou naprosto homologní s těmi v modelových organismech *D. melanogaster* a *A. gambiae*. Během analýzy genomu včely medonosné v roce 2006 se nepodařilo najít gen ligandu Unpaired (Upd) ze signalizace JAK/STAT. Jelikož je funkce této signální dráhy zachována, má se za to, že je stimulována odlišným, prozatím neznámým proteinem (Evans et al., 2006; McMenamin et al., 2018). Ve srovnání s octomilkami je pozměněna i signální dráha Toll, neboť včelám chybí transkripční faktor Dif. Produkují ale hned dvě isoformy transkripčního faktoru Dorsal (Evans et al., 2006). Vyplavování AmP z tukového tělíska je řízeno drahami Toll a Imd (Marmaras & Lampropoulou, 2009).

2.4.1 Signální dráha Toll

Podnětem pro iniciaci signální dráhy Toll je infekce G+ bakteriemi a houbami, resp. PGRP a β GRP regulovaná kaskáda proteas (Lemaitre et al., 1996; Parker et al., 2001). McMenamin (2018) k jejím aktivátorům připočítává i viry. Zvýšený přepis genů této dráhy pozorovali Annoscia et al. (2019) i u včelstev napadených kleštíkem včelím.

Činností výše zmíněných proteas dochází k odštěpení C-koncového fragmentu extracelulárního proteinu Spätzle, jehož vazbou na transmembránový receptor Toll se signál transdukuje (Parker et al., 2001). Uvnitř buňky se s dimerizovanou cytoplazmatickou doménou receptoru asociuje komplex dvou proteinů, Myd88 a Tube, poté i kinasa Pelle, jež se takto aktivuje. Následuje fosforylace, ubikvitinace a degradace proteinu Cactus, v důsledku čehož se uvolní Dorsal, načež se translokuje do jádra, kde navodí syntézu AmP (Evans et al., 2006; Aggarwal & Silverman, 2008; Manniello et al., 2021) (Obr. 7, A).

Aronstein a Saldivar (2005) pomocí techniky RNA interference umlčili jeden z genů kódujících včelí Toll receptor, *Am18w*, jenže expresní profil AmP zůstal neměnný. Bud'

se jejich produkce vůbec neúčastní, nebo byla jeho absence vykompenzována ostatními receptory této či zbylých kaskád. Naproti tomu Lourenço et al. (2018) knock-downem genu pro Dorsal dokázali, že signální dráha Toll reguluje expresi defensinu 1. Dráze Toll se u včel ještě připisuje modulace hladin PO a všech tří lysozymů, aniž by pro to v současnosti existovaly experimentální podklady (Evans et al., 2006).

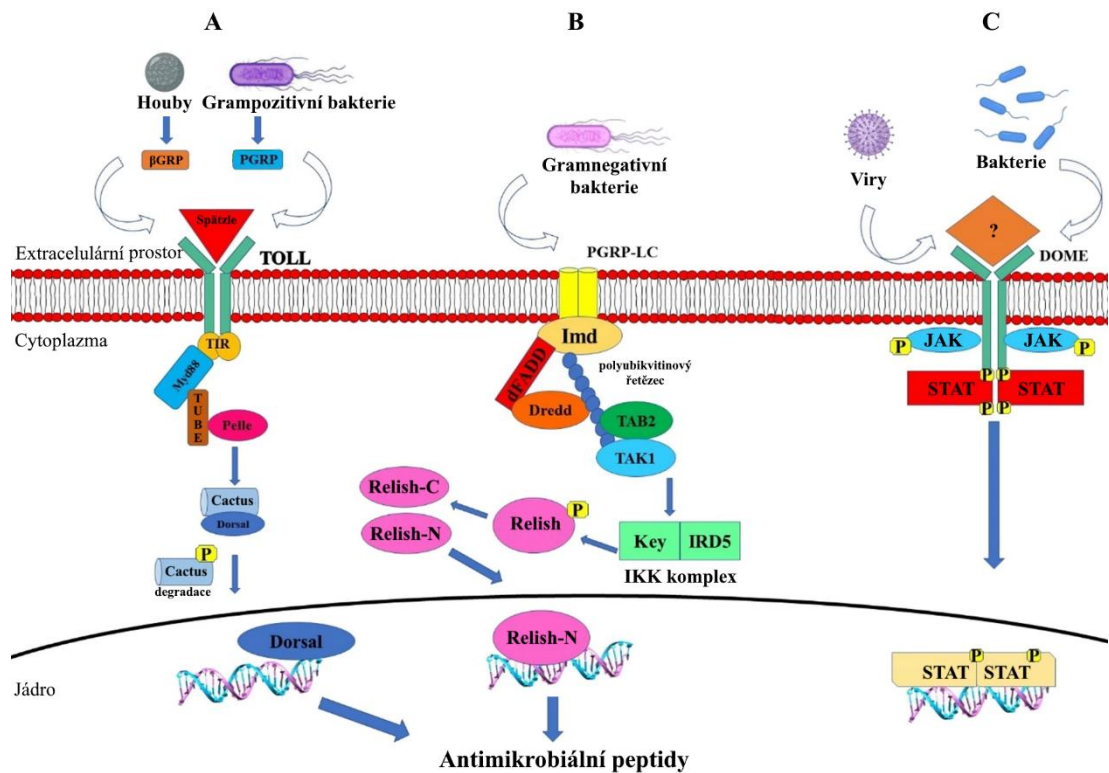
Kromě imunity ovlivňuje signální dráha Toll u hmyzu diferenciaci embrya podél dorzoventrální osy, jak zjistily výzkumy embryogeneze na octomilce obecné (Lemaitre et al., 1996).

2.4.2 Signální dráha JAK/STAT

Název signální dráhy JAK/STAT odkazuje na její dva klíčové komponenty – Janus kinasy (JAK) a proteiny zvané signální transduktéry a aktivátory transkripce (STAT) (Shuai & Liu, 2003). Vedle nich v ní vystupuje ligand Upd, jenž je ovšem u včel nahrazen neznámým ligandem, a jeho receptor Dome (Evans et al., 2006; Marmaras & Lampropoulou, 2009). Signalizace je po stimulaci viry či bakteriemi zahájena navázáním ligandu na Dome, který podléhá dimerizaci (Shuai & Liu, 2003; Kingsolver et al., 2013). Přilehlé JAK fosforylují specifická Tyr rezidua na receptoru za vzniku dokovacího místa pro STAT, z nichž se po fosforylaci JAK také stávají dimery. V tomto uspořádání disociují a jakožto transkripční faktory putují do jádra (Shuai & Liu, 2003) (Obr. 7, C). Výsledkem je pravděpodobně proliferace hemocytů a antivirová odpověď (Evans et al., 2006; Kingsolver et al., 2013).

2.4.3 Signální dráha Imd

Imunodeficientní (Imd) signální dráhu uvádějí do chodu typicky G⁻ bakterie, ale i některé G⁺ bakterie a možná i viry (Aggarwal & Silverman, 2008; McMenamin et al., 2018). Ví se, že její PGRP jsou stimulovány peptidoglykanem obsahujícím kyselinu diaminopimelovou a že spouští adaptorový protein Imd (Aggarwal & Silverman, 2008). Imd se asociuje s proteinem dFADD a ten zase s kaspasou Dredd. Aktivace Dredd vede k ubikvitinaci Imd. Vytvořený polyubikvitinový řetězec zaznamená kinasa TAK1, pročež rekrutuje IKK komplex. Tento prvek předá fosfát transkripčnímu faktoru Relish, čímž podnítl jeho rozštěpení kaspasou Dredd. Uvolněná N-koncová doména pak prochází přes jadernou membránu, kdežto C-koncová zůstává v cytosolu (Kingsolver et al., 2013) (Obr. 7, B). Podle Schlünse a Croziera (2007) signální dráha Imd reguluje expresi abaecinu a hymenoptaecinu, nikoliv však defensinu 1.



Obr. 7: Schéma signálních drah Toll (A), Imd (B) a JAK/STAT (C), aktivovaných skrze receptory rozpoznávající molekulární vzory bakterií, hub a virů (převzato a upraveno z Manniello et al., 2021).

2.4.4 Signální dráha JNK

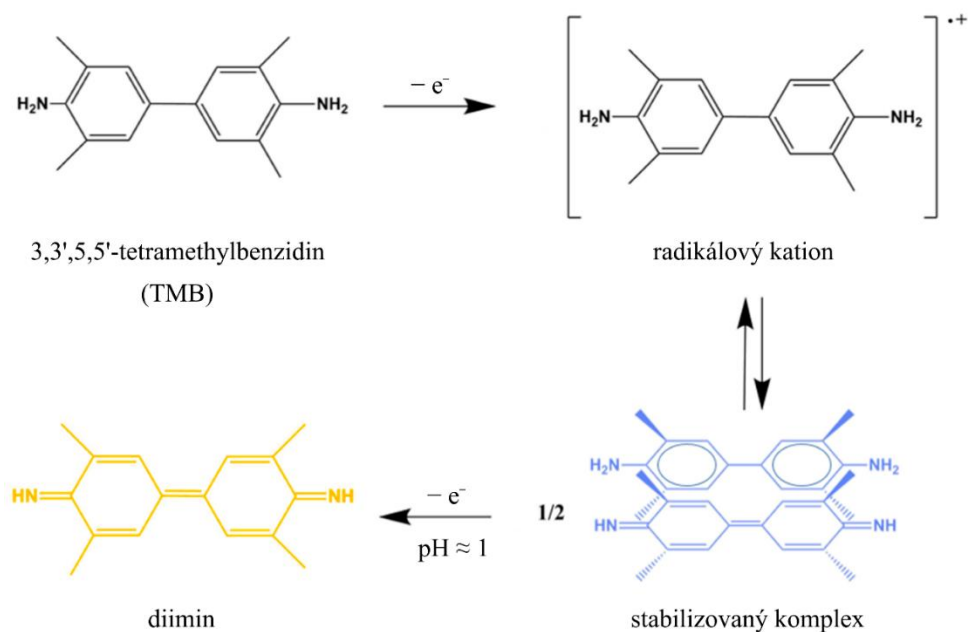
Signalizace prostřednictvím dráhy Imd může modulovat také komponenty signální dráhy JNK (Evans et al., 2006). Kinasa TAK1 má schopnost působit na c-Jun N-koncovou kinasu (JNK), jež, jak její název napovídá, fosforyluje transkripční faktor c-Jun. Po aktivaci Relish navíc dochází k degradaci TAK1 a utlumení této signalizace (Tafesh-Edwards & Eleftherianos, 2020). V tělech včel by mohla hrát roli při setkání s viry – přítomnost kleštíků s vysokou náloží viru deformovaných křídel vyvolala změny v expresi genů implikovaných v signální dráze JNK (McMenamin et al., 2018; Annoscia et al., 2019). Wu et al. (2020b) ve své studii došli k závěru, že tuto dráhu u včely východní ovlivňuje její střevní mikrobiom.

2.5 Metoda ELISA

ELISA je citlivou a na vybavení laboratoře poměrně nenáročnou metodou, založenou na dvou principech, imunochemickém a biochemickém – na schopnosti Ab specificky poutat antigeny (Ag) s epitopy komplementárními k jejich paratopům a na schopnosti určitých enzymů katalyzovat přeměnu chromogenních substrátů na barevné produkty. Ab jsou přitom na takovéto enzymy konjugovány kovalentní vazbou (Hornbeck, 2015; Konstantinou, 2017).

Metoda ELISA počíná adsorpcí antigenu (analytu) na pevný podklad, obvykle na jamky číré mikrotitrační destičky zhotovené z polystyrenu. Adsorpční schopnosti materiálu, a tím i citlivost detekce zvyšuje oxidace jeho povrchu ozářením paprsky gama (Feng et al., 2009; Konstantinou, 2017). Po inkubaci, již je potřeba nechat proběhnout i po dalších nanášecích krocích, se mikrodestička propláchně promývacím pufrem, zpravidla fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (phosphate-buffered saline, PBS) s detergentem. Promývání se opakuje mezi každým bodem postupu. Následuje tzv. blokování, které si klade za cíl, aby se všechna zbylá místa nenasycená Ag pokryla inertním proteinem. Ideální volbou bývá hovězí sérový albumin (BSA) rozpuštěný v blokovacím pufru, jenž se jinak od toho promývacího neliší. Coby alternativa BSA může posloužit želatina či sušené mléko. Poté se do směsi vpraví konjugát Ab a enzymu (Hornbeck, 2015; Konstantinou, 2017). Zdárného výsledku lze dosáhnout jedině tehdy, když Ab reaguje výlučně s analytem, a ne s blokujícím proteinem (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Přidáním roztoku substrátu se činností imobilizovaného enzymu začne vyvíjet měřitelný signál, a to změna barvy kapaliny v jamkách. Mezi tradičně používané substráty patří 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), *o*-fenylendiamin anebo *p*-nitrofenylfosfát. Transformaci prvních dvou sloučenin katalyzuje fenolový donor:peroxid vodíku oxidoreduktasa (křenová peroxidasa, HRP z anglického horseradish peroxidase, EC 1.11.1.7) (Obr. 8). Poslední jmenovaný reaktant je zase štěpen fosfát-monoester fosfohydrolasou (alkalická fosfatasa, EC 3.1.3.1). Detekce na bázi spektrofotometrie se uskutečňuje uvnitř mikrodestičkových readerů (Konstantinou, 2017). Generované zbarvení je pro účely měření absorbance vhodné nejprve ustálit. Kupříkladu oxidaci TMB katalyzovanou HRP lze terminovat úpravou pH, povětšinou dosaženou napipetováním zředěné kyseliny sírové (Obr. 8). Nespornou předností zastavení této reakce je znásobení citlivosti stanovení (Crowther, 2000).

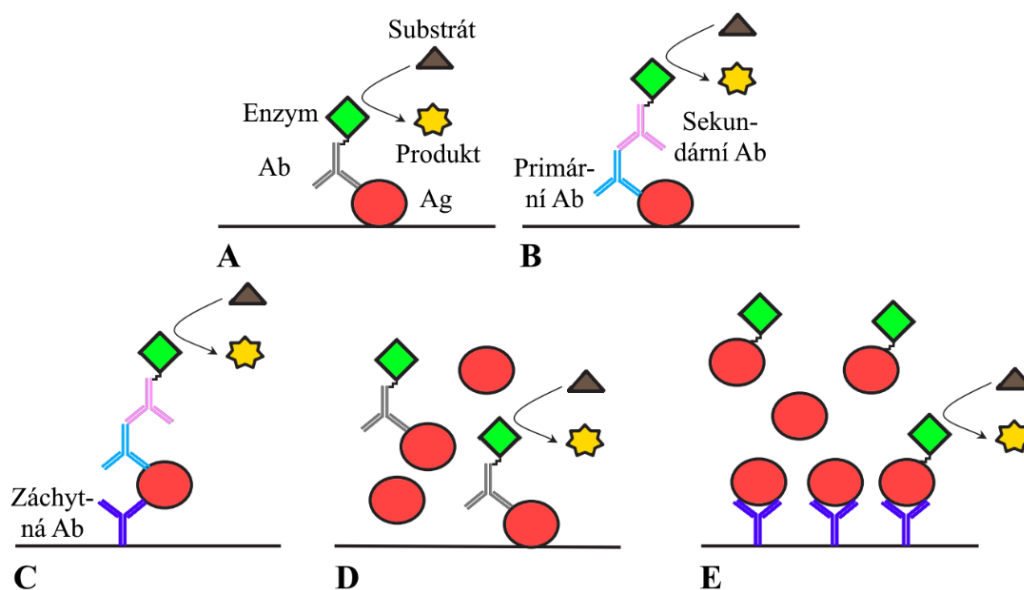


Obr. 8: Křenovou peroxidasou katalyzovaná oxidace chromogenního substrátu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu na modrý stabilizovaný komplex. Reakci lze zastavit drastickým snížením pH, pak kvantitativně vzniká stálý žlutý diimin (převzato a upraveno z Harpaz et al., 2020).

2.5.1 Varianty a modifikace metody ELISA

Výše uvedený postup uvažuje nejjednodušší, přímé uspořádání metody ELISA (Konstantinou, 2017) (Obr. 9, A). ELISA je však neobyčejně flexibilní a lze ji vyhotovit v četných variacích, poskytujících výhody (a jisté nevýhody) oproti přímému formátu. Za další tři základní typy metody se považují nepřímá, sendvičová a kompetitivní ELISA (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Protokol pro nepřímé uspořádání se od přímého odklání využitím dvou druhů Ab, primární a sekundární. Na nanosený Ag se nejdříve naváže neznačená primární Ab a na tu se posléze uchytí sekundární Ab konjugovaná na enzym (Aydin, 2015) (Obr. 9, B). Díky tomu, že primární Ab disponují vícero epitopy pro nasednutí více než jedné sekundární Ab, se signál amplifikuje (Lin, 2015). Od toho se odvíjí vysoká citlivost stanovení. Komerční sekundární Ab bývají cíleny na nespočet primárních Ab, nemusí se tedy syntetizovat na zakázku, což činí cenu analýzy přijatelnější. Na druhou stranu je při výběru sekundární Ab nezbytné brát zřetel na její potenciální křížovou reaktivitu s Ag (Shah & Maghsoudlou, 2016). Kromě Ag se analytem v nepřímé variantě metody ELISA může stát i primární Ab (Hornbeck, 2015).



Obr. 9: Běžná uspořádání metody ELISA: přímé (A), nepřímé (B), sendvičové (C), kompetitivní se značnou protilátkou (Ab) (D) a kompetitivní se značeným antigenem (Ag) (E) (převzato a upraveno z Konstantinou, 2017).

Na rozdíl od přímého a nepřímého uspořádání nezačíná sendvičová ELISA imobilizací Ag, nýbrž Ab, která je nazývána záchytnou a která z jedné strany obklopuje Ag. Z druhé se na něj váže primární Ab a na ni pak označená sekundární Ab (Obr. 9, C) (Shah & Maghsoudlou, 2016). Umožňuje-li to situace, lze primární a sekundární Ab nahradit jedinou Ab podobně jako u přímého formátu (Aydin, 2015). Sendvičová ELISA nabízí nejcitlivější stanovení, vyžaduje ale dva různé epitopy na Ag (Konstantinou, 2017). Vzorek analytu není nutné před analýzou purifikovat, neboť záchytné Ab vychytávají Ag afinitně. Nevýhodami jsou zvýšená finanční a časová náročnost, a to nejen při provádění experimentu, ale i při vybírání vhodné kombinace Ab (Stanker & Hnasko, 2015; Shah & Maghsoudlou, 2016).

Kompetitivní metody ELISA mohou být přizpůsobeny přímému, nepřímému i sendvičovému uspořádání (Crowther, 2000). Vyznačují se tím, že se spolu se stanovovaným Ag či Ab do jamek zanáší i známé množství enzymem značeného, jinak však identického referenčního Ag, resp. Ab. Analyt a referenční konjugát soutěží o vazbu na adsorbovanou Ab, resp. Ag (Obr. 9, E, D). Při výpočtu koncentrace analytu se tudíž nevychází z přímé, ale z nepřímé úměry – čím je signál intenzivnější, tím více referenční látky se navázalo na úkor analytu, který byl v roztoku proporcionálně méně zastoupen (Aydin, 2015). Kompetitivní formáty metody ELISA se volí hlavně tehdy, kvantifikují-li

se Ag, jež se buď vykytují ve vzorku v nepatrných koncentracích, nebo mají jen jeden přístupný epitop, čímž vylučují použití klasického sendvičového uspořádání (Crowther, 2000).

ELISA byla vyvinuta Engvall a Perlmannem (1971) se záměrem poskytnout jednodušší a zároveň srovnatelně citlivou alternativu k ve své době velmi populární metodě radioimunoanalýzy (RIA). Metoda RIA je založená na imunochemické reakci mezi Ab, volným Ag a radioaktivně značeným Ag (Yalow, 1980). Engvall a Perlmann zachovali její *de facto* kompetitivní povahu, namísto značení radionuklidu ovšem využili schopnosti alkalické fosfatasy hydrolyzovat *p*-nitrofenylfosfát na žlutý *p*-nitrofenol (Engvall, 2010). Od té doby prošla metoda ELISA mnohými úpravami a její vývoj stále pokračuje (Gao et al., 2020). Možnosti detekce signálu se z barevných reakcí rozrostly též na fluorescenční nebo chemiluminiscenční, jež vykazují vyšší citlivost. Ze stejného důvodu se Ab, popř. Ag propojují s molekulami enzymu komplexem biotin-avidin (Konstantinou, 2017).

Nikdy neutuchající poptávka po citlivějších a robustnějších metodách motivuje výzkum modifikací metody ELISA výtobytky z oboru nanotechnologií (Gao et al., 2020). Klasické substráty byly vyměněny za tzv. plazmonické nanočástice, které reorganizací své struktury vizuálně indikovaly přítomnost analytu s nebývale nízkou mezí detekce (de la Rica & Stevens, 2012). Na tento „plazmonický“ formát metody ELISA byly rovněž adaptovány nanonosiče jako liposomy, zaručující dodatečnou amplifikaci signálu (Bui et al., 2015). Přírodní enzymy, jejichž použitelnost je limitována nároky na užší rozsah teploty a pH, mohou být v dohledné době nahrazeny tzv. nanozymy, nanočásticemi s vlastní katalytickou aktivitou (Wei & Wang, 2013; Gao et al., 2020).

2.5.2 Využití metody ELISA

ELISA se běžně používá ke stanovení proteinů, peptidů, ale také nízkomolekulárních organických látek konjugovaných na vhodný nosič. Analýze se dá podrobit i analyt rozprostřený v komplexních maticích (Konstantinou, 2017; Sakamoto et al., 2018). Získaná data mohou mít kvalitativní, semikvantitativní nebo kvantitativní charakter (Reber et al., 1995; Konstantinou, 2017).

Metodu ELISA, hojně využívanou v oblasti zdravotnictví, lze analogicky uplatnit při vyšetřování povahy patogenů napadajících včelstvo, jak dokládají články popisující detekování viru akutní paralýzy včel, viru deformovaných křídel i kašmírského včelího

viru (Allen et al., 1986; Bowen-Walker et al., 1999; Shen et al., 2005; Shah & Maghsoudlou, 2016).

Na studium včelích peptidů, potažmo proteinů ji pravděpodobně poprvé aplikovali Won et al. (2009), když pomocí ní prokázali, že profil proteinů korejského a evropského medu se různí. Bíliková a Šimůth (2010) taktéž zkoumali složení medu, metodou ELISA kvantifikovali protein MRJP 1. Na jejich výsledky navázali Shen et al. (2015). Vyvinutím specifitější Ab proti stejnému analytu měření výrazně zpřesnili. O rok později se ELISA uplatnila při detekci defensinu 1, rovněž v medu (Valachová et al., 2016). Pole působnosti metody bylo v roce 2015 rozšířeno na další včelí produkt – stanovila se jí koncentrace melittinu ve včelím jedu i v kosmetice z něj vyráběné (Suh et al., 2015).

Ze včelích těl, konkrétně hemolymfy včely medonosné a východní, byl metodou ELISA kvantifikován royalisin. Autoři zjistili, že jeho koncentrace v hemolymfě včely východní byla významně vyšší než v případě včely medonosné, a to jak během infekce, tak i před a po jejím prodělání (Shen et al., 2014). Optimalizaci této imunoanalýzy pro stanovení relativního zastoupení peptidů abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu provedla Botíková (2022). Kromě výskytu uvedených AmP v hemolymfě, pro což byla optimalizace zamýšlena, provedla prvotní zhodnocení jejich zastoupení v extraktech z hlavy a zadečku u imunitně naivních a LPS vystavených jedinců.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Carl Roth, Německo)
Abaecin (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Coomassie brilantová modř G 250 (CBB G 250, Sigma-Aldrich, USA)
Defensin 1 (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Dihydrát hydrogenufosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika)
Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)
Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
Hydrogenuhlíčitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Hymenoptaecin (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Chlorid sodný (Penta, Česká republika)
Kozí anti-králičí sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, USA)
Králičí primární protilátka proti abaecinu (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Králičí primární protilátka proti defensinu 1 (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Králičí primární protilátka proti hymenoptaecinu (Moravian-Biotechnology, Česká republika)
Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina fosforečná 85% (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina sírová 96% (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina trifluoroctová 98% (Sigma-Aldrich, USA)
Lipopolysacharidy z *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, USA)
Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
Mléko sušené, nízký obsah tuku (Carl Roth, Německo)
Monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, USA)
Tetrahydrát peroxoboritanu sodného (Merck, USA)
Tween 20 (Carl Roth, Německo)

Uhličitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)

3.1.2 Biologický materiál

Včely, jež byly v rámci bakalářské práce zpracované, byly kraňského plemena (*A. mellifera carnica*) a pocházely ze včelnice Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. Sběr včel proběhl 27. července 2022. Rámek se zavíčkovaným plodem byl dopraven do laboratoře, kde byl ponechán v inkubátoru nastaveném na 34 °C (vlhkost 50-60 %) do vylíhnutí včel. Vylíhnuté včely o definovaném stáří (2-3 dny) byly rozděleny do klíček a krmeny po dobu 24 h roztokem LPS o hmotnostních koncentracích 30, 60 a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose v případě imunizovaných vzorků, v případě kontrolních pak roztokem 50% sacharosy. Poté byly včely zamrazeny a uschovány v mrazicím boxu při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Již lyofilizovaná hemolymfa čerstvě vylíhnutých mladušek byla dodána vedoucí práce.

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické laboratorní váhy CPA225D (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr (XS Instruments, Itálie)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Lyofilizátor L10-5 (Gregor Instruments, Česká republika)

Magnetická míchačka TKO (Kartell, Itálie)

Mikrodestičkový reader Synergy H1 (BioTek, USA)

Minicentrifuga C1008-B (Benchmark Scientific, USA)

Minitřepačka Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

Oscilační mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Parní sterilizátor (Tuttnauer, Nizozemsko)

Programovatelný rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Lotyšsko)

Přesné váhy PS 210.R2 (Radwag, Polsko)

Termostatovaná třepačka PST-100HL (Biosan, Lotyšsko)

Ultrazvuková lázeň K5 (Kraintek, Česká republika)

3.1.4 Použité roztoky

10× koncentrovaný promývací pufr pH 7,5: 109,55 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu sodného,

5,20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 1,85 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

hydrogenfosforečnanu sodného v destilované vodě, autoklávováno

Blokovací pufr: 5,00 g·l⁻¹ sušeného mléka v pracovním promývacím pufru

ELISA substrát: roztok TMB smíchaný s fosfo-citrátovým pufrům s peroxoboritanem sodným v poměru 1 : 40 objemovým dílům

Fosfo-citrátový pufr s peroxoboritanem sodným pH 4,6: 17,09 g·l⁻¹ dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, 9,98 g·l⁻¹ kyseliny citronové, 0,76 g·l⁻¹ tetrahydrátu peroxoboritanu sodného v destilované vodě

K-fosfátový pufr (K-Pi) pH 7,0: 10,63 g·l⁻¹ hydrogenfosforečnanu draselného, 5,24 g·l⁻¹ dihydrogenfosforečnanu draselného v destilované vodě

Nanášecí pufr pH 9,6: 4,24 g·l⁻¹ uhličitanu sodného, 5,04 g·l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného v destilované vodě, autoklávováno

Pracovní Bradfordovo činidlo: zásobní Bradfordovo činidlo naředěno destilovanou vodou v poměru 1 : 4 objemovým dílům

Pracovní promývací pufr: 1,10 g·l⁻¹ detergentu Tween-20 v 10× koncentrovaném promývacím pufru naředěném destilovanou vodou v poměru 1 : 9 objemovým dílům

Roztok TMB: 24 g·l⁻¹ TMB v DMSO

Zásobní Bradfordovo činidlo: 0,50 g·l⁻¹ CBB G 250 v methanolu, 85% kyselině fosforečné a destilované vodě smíchaných v poměru 1 : 2 : 1 objemovému dílu

Zásobní roztok BSA: 0,01 g·l⁻¹ BSA v destilované vodě

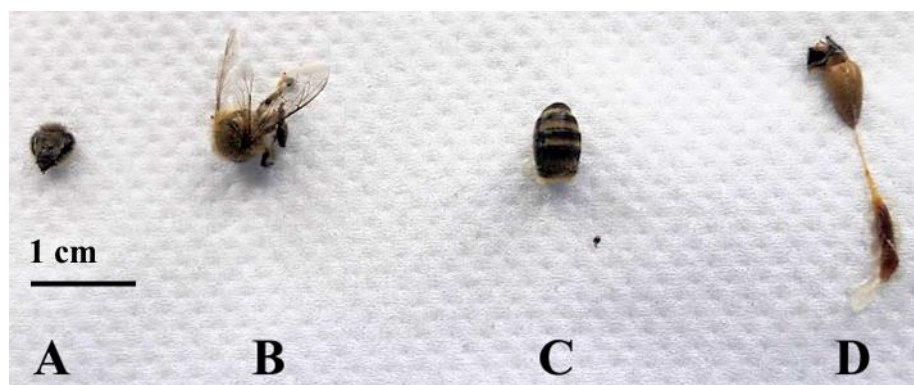
3.2 Metody

3.2.1 Metoda dle Bradforda

Bradfordova metoda byla využita ke stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorcích včel (Bradford, 1976).

3.2.1.1 Zpracování vzorků

Byly zpracovány celkem čtyři skupiny včel – tři experimentální, krmené LPS o $c_m = 30$, 60 a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a jedna kontrolní. Včelám byly po rozmrznutí odstřiženy hlavy a po uchopení posledních 2 tergíů zadečku jim byla pomocí pinzety vyjmuta většina digestivního traktu – medový váček, žaludek, střeva a výkalový vak s vlastním rektem (Schönfeld, 1955). Přestřížením stopky mezi hrudí a zadečkem a odstřížením výkalového vaku od zbytku vypreparované trávicí trubice byly získány jednotlivé vzorky různých tkání – hlav, hrudí, zadečků a střev (Obr. 10).



Obr. 10: Separované včelí tělní části: hlava (A), hrud' (B), zadeček (C) a trávicí trakt (D). Trávicí trakt byl pro účely Bradfordovy metody zbaven výkalového váčku, při provádění metody ELISA byl použit sice vcelku, ale pouze v průběhu pilotního měření.

Každá oddělená tělní část byla spolu s třemi homogenizačními kuličkami okamžitě vložena do 2ml mikrozkušavky ponechané na ledu. Vzorky byly následně přemístěny do mrazicího zařízení nastaveného na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 30 min byly vzorky naskládány do kovových desek vychlazených rovněž na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a homogenizovány pomocí oscilačního mlýnu po dobu 10 min a při frekvenci 30 s^{-1} .

Po homogenizaci bylo do všech mikrozkušavek pipetováno $200\text{ }\mu\text{l}$ K-Pi, vzorky byly důkladně protřepány na minitřepače a centrifugovány po dobu 10 min při $15000\times g$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakonec byly vzorky $20\times$ zředěny K-Pi a podrobeny analýze obsahu proteinů.

3.2.1.2 Příprava kalibračních standardů

Zásobní roztok BSA byl připraven rozpuštěním navážky $10,00\text{ mg}$ BSA v 1 ml destilované vody. Do prázdné mikrozkušavky z něj bylo odebráno $100\text{ }\mu\text{l}$ a doplněno $1900\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody, tak aby hmotnostní koncentrace činila $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z takto naředěného roztoku BSA byla sestavena kalibrační řada standardů o koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 3).

Tab. 3: Ředění roztoku BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pro přípravu 10 kalibračních standardů.

Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Objem roztoku BSA [μl]	Objem destilované vody [μl]
50	10	90
100	20	80
150	30	70
200	40	60
250	50	50
300	60	40
350	70	30
400	80	20
450	90	10
500	100	0

3.2.1.3 Průběh stanovení

Do jamek mikrotitrační desky bylo postupně pipetováno $5 \mu\text{l}$ $20\times$ zředěného vzorku tělní části (kalibračního standardu BSA), $45 \mu\text{l}$ K-Pi (destilované vody) a nakonec $200 \mu\text{l}$ pracovního Bradfordova činidla. Jako blank posloužilo $50 \mu\text{l}$ extrakčního roztoku (destilované vody) spolu s $200 \mu\text{l}$ pracovního Bradfordova činidla. Vše bylo nanášeno v triplicátech.

Po 5minutové inkubaci byly na mikrodestičkovém readeru změřeny absorbance při vlnových délkách 590 nm a 450 nm v módu bez víčka. Před měřením byly případné bublinky v jamkách propíchnuty pomocí špendlíku.

3.2.2 Metoda ELISA

Metoda ELISA byla využita ke vzájemnému porovnání hladin AmP abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu napříč tělními částmi.

3.2.2.1 Zpracování vzorků

Pro metodu ELISA byly opět přichystány vzorky ze včel zdravých i imunizovaných LPS. Jejich zpracování bylo totožné jako v podkapitole 3.2.1.1 s níže jmenovanými změnami. Vzorky tělních částí – hlav, hrudí a zadečků – byly extrahovány v $200 \mu\text{l}$ $0,1\%$ (v/v) TFA. Po homogenizaci a centrifugaci byly vzorky přes noc lyofilizovány.

Lyofilizované vzorky byly před nanášením na ELISA mikrodestičku rozpuštěny v $650 \mu\text{l}$ nanášecího pufru a 3 s promíchány na mikrotřepače. Posléze byly ponořeny na 5 min do ultrazvukové lázně a nakonec přibližně 2 min centrifugovány na minicentrifuze. Stejným způsobem byla zpracována také lyofilizovaná hemolymfa mladušek, navržená jako negativní kontrola.

3.2.2.2 Příprava standardů antimikrobiálních peptidů

Standardy AmP abaecin, defensin 1 a hymenoptaecin byly dodány toutéž firmou, která vyrobila primární Ab proti nim. Zásobní roztok každého standardu o hmotnostní koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl zředěn $100\times$ na $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a dále $10\times$ na $100 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pokaždé do destilované vody.

Roztoky AmP o hmotnostních koncentracích $100 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly naředěny $10\times$ na $10 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $5\times$ na $20 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ do nanášecího pufru. Standardy AmP ředěné v nanášecím pufru byly před použitím připravovány vždy čerstvé. Sloužily jako pozitivní kontrola.

3.2.2.3 Průběh stanovení

Do jamek 96jamkové ELISA mikrodestičky bylo pipetováno $100 \mu\text{l}$ vzorku příslušné tělní části, hemolymfy mladušky, standardu abaecinu, defensinu 1 či hymenoptaecinu nebo blanku – samotného nanášecího pufru. Vše bylo naneseno v duplikátech. Naplněná destička byla přikryta víčkem, obtáhnuta parafilmem a přes noc inkubována v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Následující den byl vytřepán obsah jamek, jež byly krátce nato $3\times$ promyty $200 \mu\text{l}$ pracovního promývacího pufru. Po vyklepání pracovního promývacího pufru byl povrch jamek pokryt $200 \mu\text{l}$ blokovacího pufru. Pak byla mikrodestička obtažena parafilmem a inkubována po dobu 2 h v třepačce termostatované na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ při 300 otáčkách za minutu (rpm). Po skončení inkubace a 3násobném promytí bylo do destičky pipetováno $100 \mu\text{l}$ naředěné primární Ab. Ab proti abaecinu byla ze zásobního roztoku ředěna do pracovního promývacího pufru v poměru 1 : 250 objemovým dílům. V případě Ab proti defensinu 1 a Ab proti hymenoptaecinu ředící poměr činil shodně 1 : 500 (Botíková, 2022). Inkubace jamek s primárními Ab pokračovala v třepačce po dobu 1 h za stejných podmínek ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 rpm). Před jejím skončením byla naředěna sekundární Ab pracovním promývacím pufrem (1 : 3000) (Botíková, 2022). Po trojitém promytí byla přidána po $100 \mu\text{l}$ do všech jamek mikrodestičky, jež byla znovu inkubována po dobu 1 h ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 rpm). Po inkubaci byla destička promyta celkem $6\times$ a poté bylo do každé jamky pipetováno $100 \mu\text{l}$ ELISA substrátu. ELISA substrát byl připraven smícháním $250 \mu\text{l}$ roztoku TMB v DMSO ($c_m = 24 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) s 10 ml fosfo-citrátového pufru s perborátem sodným. Roztok TMB v DMSO byl připraven minimálně 2 h před použitím a do zužitkování ponechán na programovatelném rotátoru ve tmě. ELISA substrát byl přichystán minimálně 1 h před použitím a uchováván ve tmě. Po proběhnutí závěrečné

hodinové inkubace (37 °C, 300 rpm) byl vývoj zbarvení v jamkách zastaven napipetováním 50 µl 2,8% (v/v) kyseliny sírové ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Na mikrodestičkovém readeru byla zaznamenána absorbance při vlnové délce 450 nm v módu bez víčka. Před měřením, jakož i před dílčími inkubacemi byly případné bublinky v jamkách propíchnuty pomocí špendlíku.

3.3 Software

Mikrodestičkový reader Synergy H1 byl ovládán pomocí programu Gene 5, verze 3.06. Pro vyhodnocení naměřených dat včetně tvorby grafů bylo užito programu Microsoft Excel, verze pro Microsoft 365. Srovnání (alignment) sekvencí AmP a epitopů, proti nimž byly výrobcem připraveny Ab, bylo provedeno v programu BioEdit, verze 7.2.5.

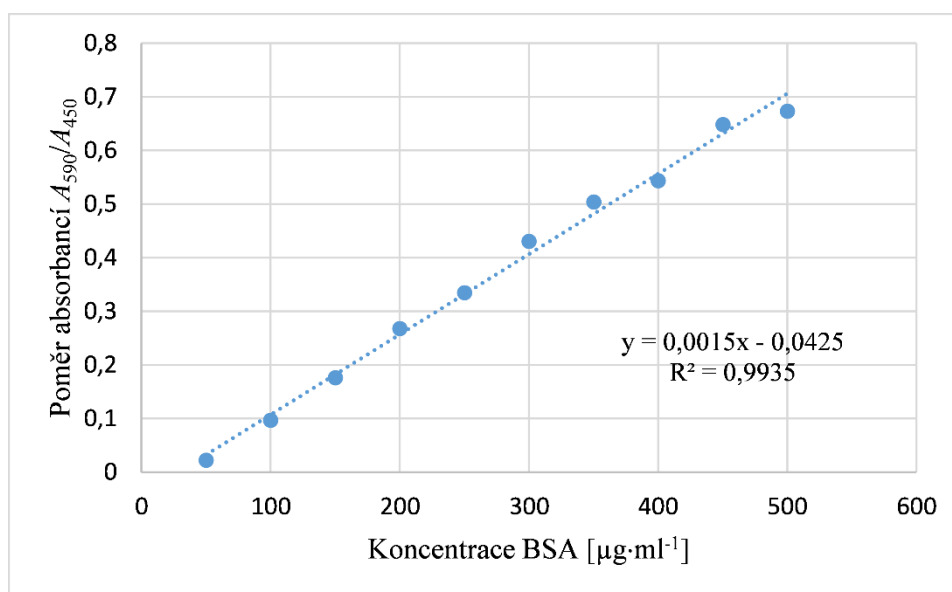
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Koncentrace proteinů ve vzorcích tělních částí

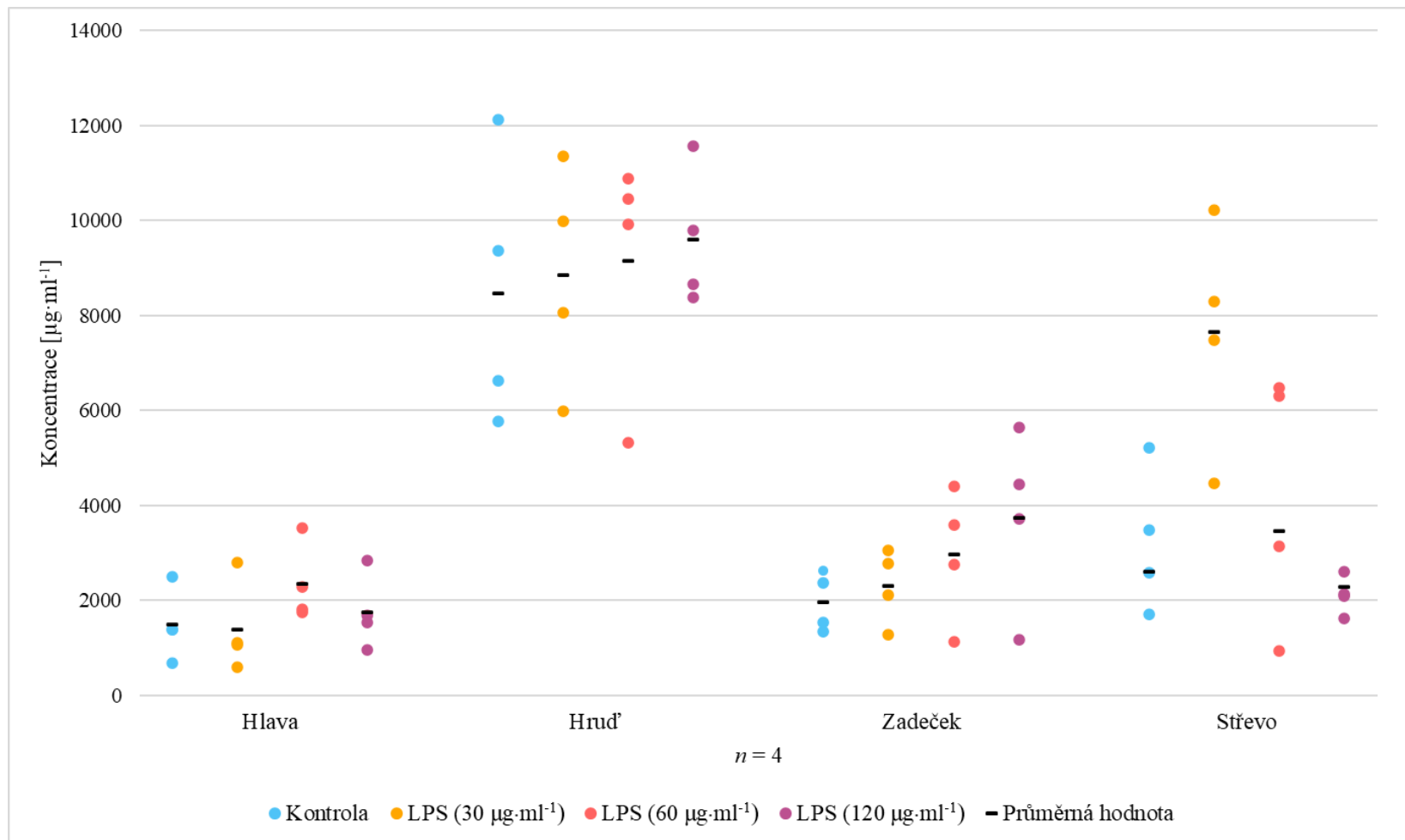
Z naměřených absorbancí při vlnových délkách 590 nm a 450 nm byl pro všechny jamky vypočítán podíl A_{590}/A_{450} . Práce s tímto vyjádřením absorbancí pomáhá potlačit vnitřní nelinearitu Bradfordovy metody, způsobenou překryvem barev dvou rozdílných forem CBB G 250 a zkreslující měření koncentrací proteinů mimo interval $2\text{-}10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledkem této linearizace je zlepšení citlivosti a přesnosti stanovení (Zor & Selinger, 1996).

Po zprůměrování triplikátů hodnot pro kalibrační standardy BSA a odečtení příslušného blanku – zde destilované vody – byla zjištěna průměrná hodnota podílu absorbancí pro každý standard. Jejich vynesení na osu y grafu proti známým hmotnostním koncentracím na ose x a proložení lineární regrese byla zkonstruována kalibrační závislost, popsaná rovnicí přímky $y = 0,0015x - 0,0425$ (Obr. 11).

Na základě znalosti rovnice kalibrační přímky byly přepočteny obdobně získané podíly absorbancí vzorků včelích tělních částí na hmotnostní koncentrace v nich obsažených proteinů. Bylo totiž zjištěno, že rozdíly podílu absorbancí destilované vody a K-Pi, do něhož byly proteiny extrahovány, jsou zanedbatelné (0,848 vs. 0,831). Údaj o celkové koncentraci proteinů v hlavě, hrudi, zadečku a střevu kontrolních a imunizovaných včel popisuje graf na následující straně. Jelikož byly v rámci skupin zpracovány jen 4 včely, byl zvolen formát kategorického skupinového bodového grafu (Obr. 12).



Obr. 11: Kalibrační přímka pro určení koncentrace proteinů ve vzorcích tělních částí.



Obr. 12: Koncentrace celkových proteinů v extraktech homogenátů včelích tělních částí u kontrolních vzorků (modrá) a vzorků vystavených LPS o hmotnostní koncentraci 30 µg·ml⁻¹ (žlutá), 60 µg·ml⁻¹ (červená) a 120 µg·ml⁻¹ (fialová). Černý obdélník značí průměrnou hodnotu v rámci skupiny, *n* počet vzorků.

V hlavách bylo u kontrolní skupiny obsaženo v průměru $1494,34 \pm 748,45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ celkových proteinů. U včel vystavených LPS o hmotnostní koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo stanoveno $1390,86 \pm 967,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů. Pro skupinu s LPS o koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obsah proteinů činil $2345,24 \pm 822,83 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro LPS o koncentraci $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ celkem $1759,30 \pm 789,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů.

V hrudích bylo u kontrolní skupiny naměřeno $8468,62 \pm 2875,89 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů a u experimentálních skupin $8850,30 \pm 2338,77 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $9153,25 \pm 2583,20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $9601,16 \pm 1445,90 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proteinů.

V zadečcích bylo u experimentálních skupin změřeno $2308,15 \pm 791,51 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $2971,06 \pm 1397,65 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $3743,88 \pm 1890,19 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proteinů. U kontrol bylo změřeno $1967,33 \pm 619,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů. Dostálková et al. (2022) v K-Pi extraktech ze zadečků neimunizovaných včel (bez trávicího traktu) stanovili koncentraci $1140,8 \pm 723,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ celkových proteinů pomocí nelinearizované Bradfordovy metody. V citované studii se zkoumaly včely letní generace, přičemž v této bakalářské práci, vzhledem k datu sběru včel, už mohlo být nakládáno se zástupci zimní generace. Včely zimní generace přežívají mnohem delší dobu než letní včely, což se odráží ve zvýšeném obsahu celkových proteinů, zvláště vitellogeninu, markeru dlouhověkosti (Schönfeld, 1955; Kunc et al., 2019).

Ve střevech bylo u kontrol nalezeno $2598,25 \pm 1500,99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů, u experimentálních skupin $7664,11 \pm 2399,32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $3459,99 \pm 2671,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $2277,08 \pm 405,58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proteinů.

Nejvíce proteinů bylo přítomno v hrudích včel, nejméně pak v jejich hlavách. Na příkladech hrudí a zadečků lze vidět, že kontrolní včely jevily nejnižší průměrnou koncentraci celkových proteinů a tato hodnota se zvyšující se koncentrací LPS stoupala. Průměrná koncentrace proteinů v hrudích včel vystavených nejvyšší koncentraci LPS byla $1,13\times$ vyšší než u kontrol, v případě zadečků $1,90\times$ vyšší. Tyto výsledky by mohly indikovat reakci na imunogen – produkci humorálních faktorů včetně AmP, jejichž tři zástupci, abaecin, defensin 1 a hymenoptaecin, byli detekováni metodou ELISA.

Hlavy ani střeva nevykazovaly plynulou závislost koncentrace LPS na průměrném množství proteinů. Zatímco u hlav byl rozptyl mezi měřenými vzorky relativně nízký, u střev byl s výjimkou skupiny imunizované LPS o $c_m = 120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vysoký. Částečně

by za to mohlo zodpovídat zpracovávání vzorku, kdy výkalový vak nemusel být od zbytku vypreparovaného trávicího traktu oddělen stejnoměrně. Ve výkalovém vaku se hromadí zbytky potravy včetně natrávených pylových částic obsahujících proteiny, jež mohou zkreslovat stanovení celkových proteinů (Schönfeld, 1955). Z tohoto důvodu byl před měřením odstraněn.

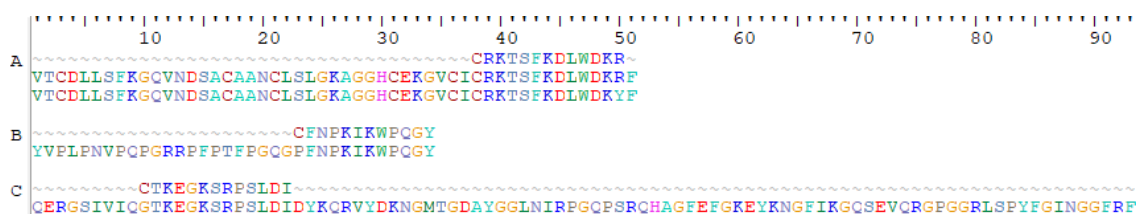
4.2 Srovnání sekvencí antimikrobiálních peptidů se svými epitopy

Od společnosti Moravian-Biotechnology byly získány informace o sekvenci epitopů AmP, proti kterým byly připraveny a dodány použité Ab. Pro určení jejich specifity byly následně srovnány se sekvencemi defensinu 1, který pravděpodobně existuje ve dvou isoformách, De-C a Ro-F (royalysin) (Obr. 13 A). Pro úplnost byly se svými epitopy porovnány i sekvence abaecinu a hymenoptaecinu (Obr. 13 B, C).

Výrobce navržené epitopy pro Ab proti abaecinu i Ab proti hymenoptaecinu jsou oproti kanonickým sekvencím těchto AmP substituované na jedné AK (Cys vs. Pro, resp. Gly). S ohledem na to je rozumné se domnívat, že Ab proti defensinu 1 se bude vázat nejen na v hemolymfě přítomnou isoformu De-C, s níž je firemní epitop identický, ale také na royalysin v hlavě, u něhož došlo k záměně Arg za Tyr v místě odpovídajícímu poslednímu AK zbytku příslušného epitopu.

4.3 Pozitivní a negativní kontroly metody ELISA

Pro měření zastoupení AmP metodou ELISA byla navržena jednak pozitivní, jednak negativní kontrola. Pozitivní kontrolou byly standardy AmP abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu. Nicméně standardy peptidů, nanesené v koncentracích 10 ng·ml⁻¹ a 20 ng·ml⁻¹, nevykazovaly vnitřní závislost na své koncentraci. Proto nebyla průměrná absorbance v rámci zpracování výsledku přepočítána na hmotnostní koncentraci jako v případě stanovení celkových proteinů.



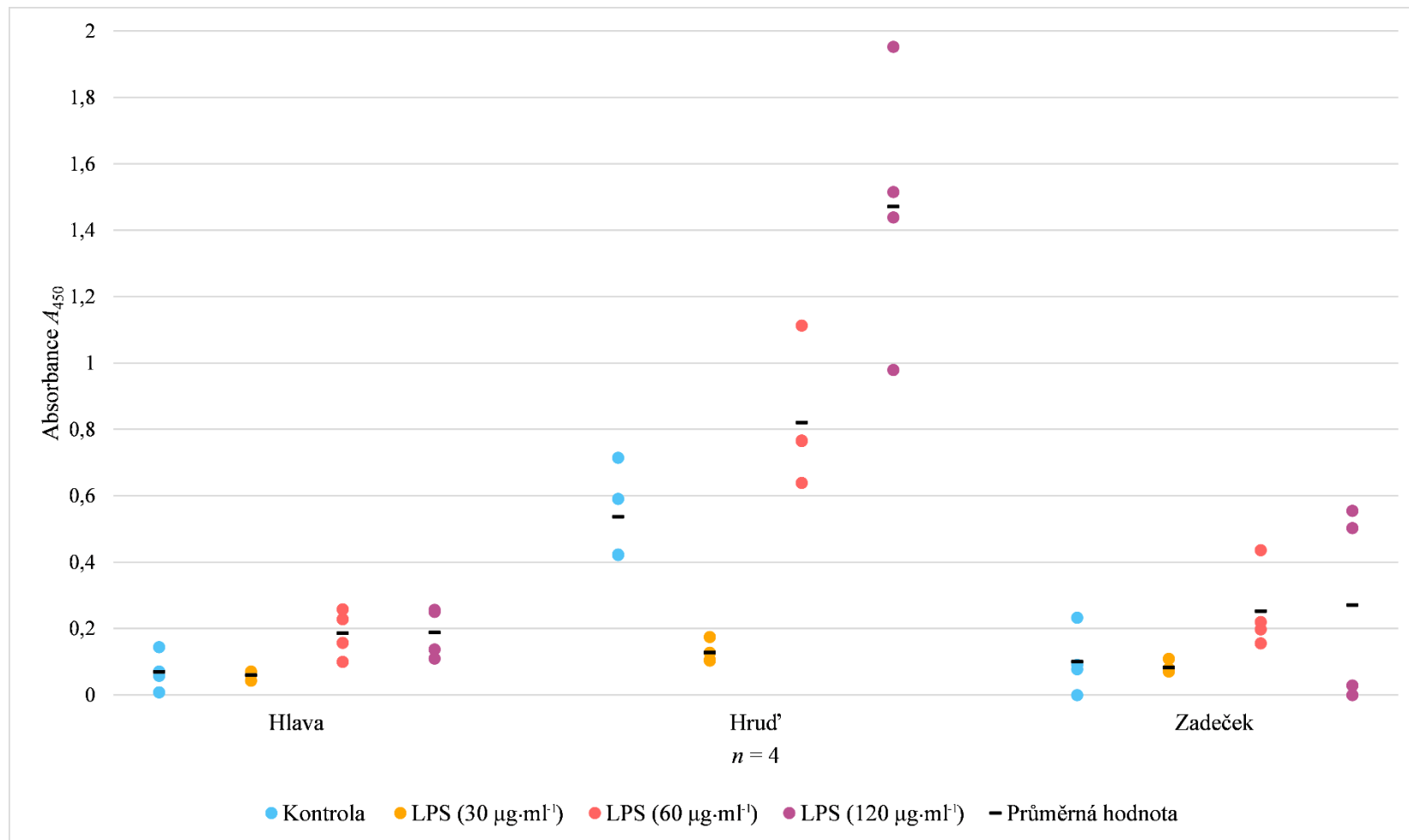
Obr. 13: Alignment sekvencí výrobcem navrženého epitopu defensinu 1 s isoformami defensinu 1, De-C a Ro-F (A), navrženého epitopu abaecinu s abaecinem (B) a navrženého epitopu hymenoptaecinu s hymenoptaecinem (C).

Jako negativní kontrola byly použity vzorky hemolymfy čerstvě vylíhnutých mladušek, u nichž se nepředpokládá produkce AmP. Jejich absorbance však vycházely velmi pozitivně, a to opakovaně. To může značit, že i v takto raném stádiu dospělosti dochází k produkci AmP. Porovnávání ELISA destiček, detekujících pokaždé peptidy jen jedné ze skupin včel, se tedy realizovalo na základě vzájemné podobnosti blanků.

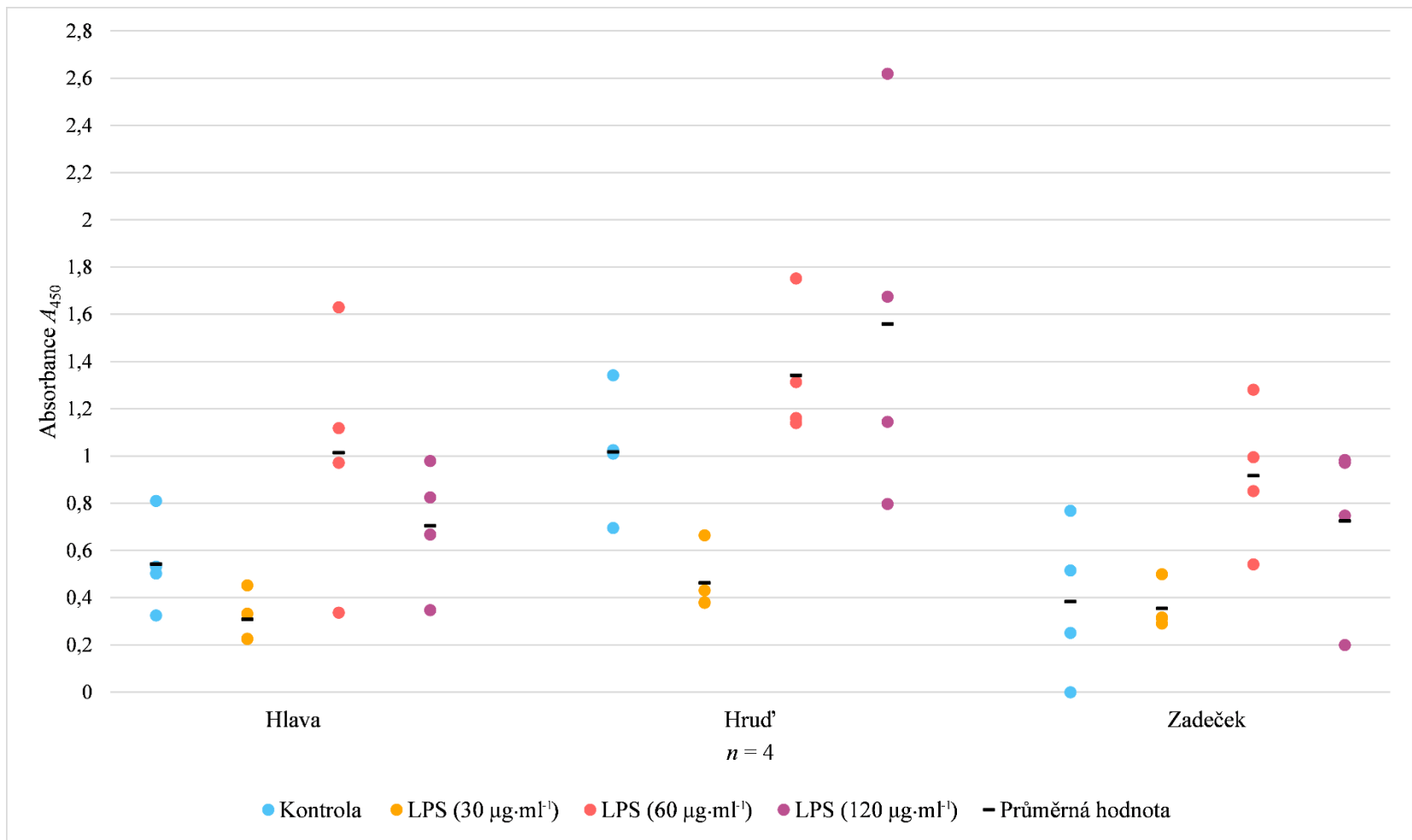
4.4 Zastoupení antimikrobiálních peptidů ve vzorcích tělních částí

Pro jednotlivé tělní části u kontrolních i experimentálních skupin včel bylo stanoveno relativní množství AmP abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu. Co se týče peptidu abaecinu, pro extrakty z hlav byla průměrná hodnota absorbance u kontrolní skupiny rovna $0,07 \pm 0,06$. Zpracované hlavy včel imunizovaných LPS o hmotnostní koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovaly průměrnou absorbanci $0,06 \pm 0,01$, LPS o hmotnostní koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pak $0,19 \pm 0,07$ a LPS o hmotnostní koncentraci $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ $0,19 \pm 0,08$. V hrudích byla u kontrolní skupiny naměřena průměrná absorbance $0,54 \pm 0,14$ a u experimentálních skupin $0,13 \pm 0,03$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $0,82 \pm 0,20$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $1,47 \pm 0,40$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V zadečcích byla u kontrol změřena absorbance $0,10 \pm 0,10$ a u experimentálních skupin $0,08 \pm 0,02$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $0,25 \pm 0,13$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,27 \pm 0,30$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Obr. 14).

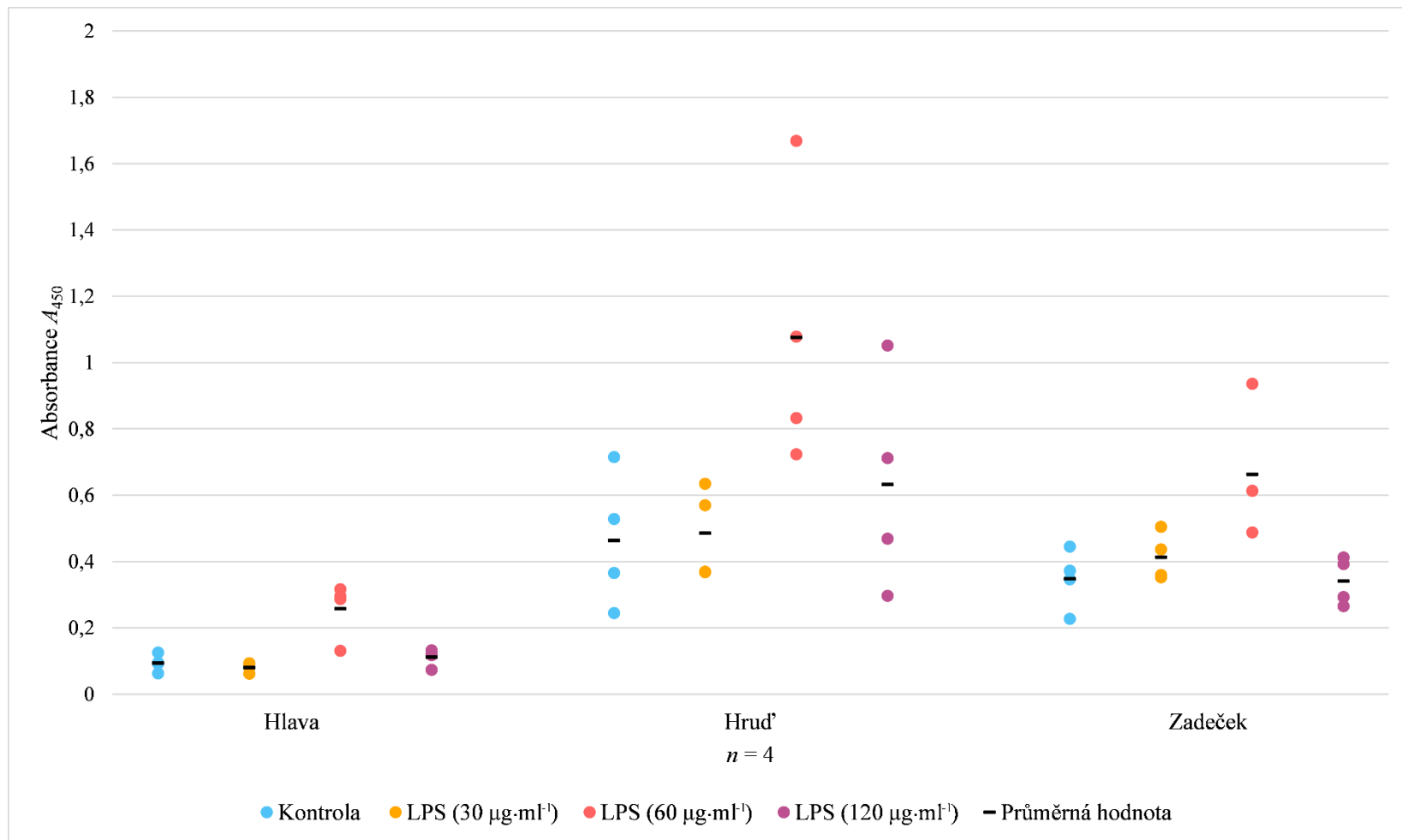
Zvýšené hladiny abaecinu byly pozorovány po imunizaci roztoky s koncentracemi LPS 60 a $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zvláště výrazný nárůst nastal v hrudích po aplikaci nejvíce koncentrovaného roztoku LPS. Naopak orální podání LPS o nejnižší koncentraci neovlivnilo hladiny abaecinu v analyzovaných tělních částech vzhledem ke kontrolám. Kontrolní skupina vykazovala u všech tkání velmi nízké hodnoty absorbance. Tyto poznatky naznačují, že krmení včel více koncentrovanými roztoky LPS indukovalo vyplavení abaecinu. Ve studii Siedehe et al. (2015) však injektování včel LPS ($c_m = 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) expresi genu tohoto peptidu prokazatelně nevyvolalo. Naproti tomu injekce živými i mrtvými buňkami *E. coli* jeho transkripci spouští (Casteels et al., 1990; Yang & Cox-Foster, 2005). Není vyloučeno, že za těchto podmínek dochází k indukovaní abaecinu spíše prostřednictvím aktivace signálních drah Imd a Toll peptidoglykany. Pokud jde o imunitní stimulaci LPS, je možné, že vhodnější imunizační technikou je podání orální cestou. Tento způsob by navíc měl eliminovat vliv stresové reakce, vyvolané poraněním jehlou, na odpověď imunitního systému (Lourenço et al., 2009). Houdelet et al. (2022) zjistili, že k tvorbě abaecinu dochází i po infekci *N. ceranae*. Jeho koncentraci v hrudi ovšem sledovali nižší než v hlavě a střevu nakažené i zdravé včely.



Obr. 14: Výskyt peptidu abaecinu v extraktech homogenátů včelích tělních částí u kontrolních vzorků (modrá) a vzorků vystavených LPS o hmotnostní koncentraci 30 µg·ml⁻¹ (žlutá), 60 µg·ml⁻¹ (červená) a 120 µg·ml⁻¹ (fialová). Černý obdélník značí průměrnou hodnotu v rámci skupiny, *n* počet vzorků.



Obr. 15: Výskyt peptidu defensinu 1 v extraktech homogenátů včelích tělních částí u kontrolních vzorků (modrá) a vzorků vystavených LPS o hmotnostní koncentraci 30 µg·ml⁻¹ (žlutá), 60 µg·ml⁻¹ (červená) a 120 µg·ml⁻¹ (fialová). Černý obdélník značí průměrnou hodnotu v rámci skupiny, *n* počet vzorků.



Obr. 16: Výskyt peptidu hymenoptaecinu v extraktech homogenátů včelích tělních částí u kontrolních vzorků (modrá) a vzorků vystavených LPS o hmotnostní koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (žlutá), 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (červená) a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (fialová). Černý obdélník značí průměrnou hodnotu v rámci skupiny, n počet vzorků.

Průměrné absorbance spjaté s výskytem peptidu defensinu 1 v hlavách čítaly u kontrol $0,54 \pm 0,20$, zatímco u imunizovaných skupin $0,31 \pm 0,11$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $1,01 \pm 0,53$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,71 \pm 0,27$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V hrudích byla u kontrol stanovena absorbance $1,02 \pm 0,26$, u experimentálních skupin pak $0,46 \pm 0,14$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $1,34 \pm 0,29$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $1,56 \pm 0,80$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Průměrná absorbance zpracovaných zadeček kontrolní skupiny byla $0,38 \pm 0,33$, přičemž napříč skupinami vystavenými LPS činila $0,36 \pm 0,10$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $0,92 \pm 0,31$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,73 \pm 0,37$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Obr. 15).

Hladiny defensinu 1 narostly po imunizaci roztoky s koncentracemi LPS 60 a $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, podobně jako u abaecinu. Zvýšená byla také průměrná absorbance pro kontrolní vzorky hrudí a v menší míře hlav ($2,65\times$, resp. $1,41\times$ oproti zadečkům kontrol) mRNA defensinu 1 stanovili v hlavách a hrudích Klaudiny et al. (2005). Je možné, že se v těchto tělních částech, konkrétněji v hltanových, mandibulárních a labiálních žlázách, transkribovala do royalisinu, který pravděpodobně není inducibilní (Klaudiny et al. 2005; Houdelet et al., 2022). V tomto ohledu by s ním kontrastoval defensin z hemolymfy, vyplavovaný v odezvě na injekce LPS, *E. coli* nebo *Micrococcus luteus* (Yang & Cox-Foster, 2005; Lourenço et al., 2009; Botíková, 2022). Produkci defensinu 1 však reguluje pouze signální dráha Toll, již by LPS, purifikované strukturální složky G⁻ bakterií, aktivovat neměly (Schlüns & Crozier, 2007). Jmenované závěry každopádně podporují tezi, že se primární Ab proti defensinu, použitá v bakalářské práci, vážala na obě isoformy defensinu 1. Houdelet et al. (2022) však detekovali násobně více royalisinu v hlavách než v hrudích včel.

Zastoupení hymenoptaecinu v hlavách analyzovaných včel, vyjádřené hodnotami průměrných absorbancí, u kontrol činilo $0,09 \pm 0,03$ a u experimentálních skupin $0,08 \pm 0,01$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $0,26 \pm 0,09$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,11 \pm 0,03$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V hrudích to u kontrol bylo $0,47 \pm 0,20$ a u experimentálních skupin $0,49 \pm 0,14$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $1,08 \pm 0,42$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,63 \pm 0,33$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V zadečcích jevíly kontroly průměrnou absorbančí $0,35 \pm 0,09$, experimentální skupiny zase $0,41 \pm 0,07$ (LPS, $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $0,66 \pm 0,19$ (LPS, $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $0,34 \pm 0,07$ (LPS, $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Obr. 16).

Indukování hymenoptaecinu, řízené signální dráhou Imd, je u LPS statisticky prokázáno (Schlüns & Crozier, 2007; Siede et al., 2015). Nicméně Yang a Cox-Foster (2005) nenašli souvislost mezi injektováním *E. coli* a transkripcí jeho genu. Na rozdíl od abaecinu a defensinu 1, hladiny hymenoptaecinu vzrostly jen po podání roztoku LPS o hmotnostní koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to v průměru 2,3násobně ve srovnání s tělními částmi imunitně naivních včel. Signály navozené aplikací nejvíce koncentrovaného roztoku LPS se blížily úrovním těchto kontrol. Obdobně nízké byly absorbance všech analyzovaných AmP po imunizaci včel LPS s hmotnostní koncentrací $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Může se jednat o podprahové dávky, při nichž ještě není včelí imunitní systém dostatečně stimulován. Optimální testovanou koncentrací LPS pro vyplavení hymenoptaecinu se ukázalo být $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro vyplavení abaecinu a defensinu 1 pak $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

V grafech prezentované výsledky podobně jako v pracích Botíkové (2022) nebo Aronstein a Saldivara (2005), studujících profil transkriptů AmP pomocí PCR, ukazují, že nejvyšší signál v tělních částech dospělců z testovaných peptidů vykazoval defensin 1. Tato bakalářská práce se však s dalšími závěry Aronstein a Saldivara (2005) ohledně exprese AmP v hlavách a zadečku rozchází. Pomocí metody ELISA byl v zadečcích detekován vyšší, nikoliv nižší průměrný obsah hymenoptaecinu než abaecinu. Dále se zjistilo, že zastoupení abaecinu a hymenoptaecinu v hlavách bylo přibližně stejné, kdežto Aronstein a Saldivar (2005) našli více transkriptů genu abaecinu.

Obecněji vzato, zastoupení AmP v hlavě, hrudi a zadečku sledovalo podobné trendy jako rozvrstvení celkových proteinů v těchto tělních částech. Přestože je tukové tělísko, nalézající se převážně v zadečku, považováno za místo produkce AmP, obsah abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu se zde podobal jejich obsahu v hlavě. Na druhou stranu nejvíce AmP bylo detekováno v hrudi včel, i když jejich produkci zde literatura zaznamenává pouze v labiálních žlázách (Klaudiny et al., 2005). Jednoduché vysvětlení, že průtok hemolymfy, kam se AmP vylučují, může být v hrudi nejvyšší, je vyvráceno výzkumem Crailsheima (1985). Podle něj se nejvíce hemolymfy vyskytuje v zadečku (a nejméně v hlavě). Možnou indicií pro rozklíčování překvapivě vysokého zastoupení AmP v hrudi včel je Schönfeldova (1955) poznámka, že se tuková tkáň nachází i zde.

5 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na stanovení parametrů humorální imunity v různých částech těla včely medonosné. V teoretické části byla vypracována literární rešerše o imunitním systému včely medonosné s důrazem na humorální imunitu, zejména AmP a jejich produkci. Rovněž byly shrnuty poznatky o signálních drahách, jež vedou k aktivaci imunitní odpovědi včely medonosné, a metodě ELISA, jež představovala klíčovou metodu praktické části práce.

V praktické části bylo provedeno stanovení koncentrace celkových proteinů v hlavě, hrudi, zadečku a střevu včel z kontrolní skupiny a ze čtyř experimentálních skupin, krmených LPS o hmotnostních koncentracích 30, 60 a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bylo zjištěno, že nejvíce proteinů se nacházelo v hrudích včel, nejméně v jejich hlavách. Množství celkových proteinů napříč skupinami se zvyšující se koncentrací LPS plynule rostlo v hrudi a zadečku.

Metodou ELISA bylo stanoveno relativní zastoupení AmP abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu v hlavě, hrudi a zadečku. Měření potvrdilo, že u jedinců imunizovaných vyššími koncentracemi LPS dochází k indukci produkce AmP. Největší množství peptidů abaecinu, defensinu 1 a hymenoptaecinu bylo nalezeno v hrudi, překvapivě malé pak v zadečku. Tento výsledek potenciálně značí, že oblast hrudi včely medonosné může hrát obzvláště důležitou roli v imunitní odpovědi, zatímco tukové tělísko zadečku nemusí být hlavním producentem stanovovaných AmP.

Další úsilí by mělo být věnováno optimalizaci rekombinantní produkce standardů peptidů, které by následně mohly umožnit kvantifikování koncentrace AmP. Měly by také být nalezeny lepší negativní kontroly. Rovněž by bylo vhodné opakovat měření střev včel u všech skupin metodou ELISA. Na studii by bylo vítané navázat stanovením dalších humorálních faktorů jako AmP apidaecinu či enzymu fenoloxidasy, pročež by mohly být připraveny nové Ab anebo by mohly být s výhodou využity jiné zavedené metody (apidaecin – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, fenoloxidasa – spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity).

6 LITERATURA

- Adams, P. G., Lamoureux, L., Swingle, K. L., Mukundan, H., & Montañó, G. A. (2014). Lipopolysaccharide-Induced Dynamic Lipid Membrane Reorganization: Tubules, Perforations, and Stacks. *Biophysical Journal*, *106*(11), 2395-2407. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.016>
- Aggarwal, K., & Silverman, N. (2008). Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Reports*, *41*(4), 267-277. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.4.267>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., & Wilson, J. (2008). *Molecular biology of the cell* (Fifth edition). Garland Science.
- Allen, M. F., Ball, B. V., White, R. F., & Antoniw, J. F. (1986). The Detection of Acute Paralysis Virus in *Varroa Jacobsoni* by the Use of a Simple Indirect Elisa. *Journal of Apicultural Research*, *25*(2), 100-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100700>
- Annoscia, D., Brown, S., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., Zanni, V., Galbraith, D., Caprio, E., Grozinger, C., Pennacchio, F., & Nazzi, F. (2019). Haemolymph removal by *Varroa mite* destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1901). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0331>
- Arason, G. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, *6*(4), 277-289. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0029>
- Aronstein, K., & Saldivar, E. (2005). Characterization of a honey bee Toll related receptor gene *Am18w* and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie*, *36*(1), 3-14. <https://doi.org/10.1051/apido:2004062>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, *72*, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, *31*(1), 3-15. <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Baracchi, D., Cusseau, G., Pradella, D., & Turillazzi, S. (2010). Defence reactions of *Apis mellifera ligustica* against attacks from the European hornet *Vespa crabro*. *Ethology Ecology & Evolution*, *22*(3), 281-294. <https://doi.org/10.1080/03949370.2010.502323>
- Baracchi, D., Fadda, A., & Turillazzi, S. (2012). Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. *Journal of Insect Physiology*, *58*(12), 1589-1596. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.09.014>
- Baracchi, D., Francese, S., & Turillazzi, S. (2011). Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon*, *58*(6-7), 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.017>
- Baracchi, D., & Turillazzi, S. (2010). Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology*, *56*(4), 366-375. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.013>
- Barondes, S. H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*, *13*(12), 480-482. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90235-6)
- Bíliková, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Kludiny, J., & Šimúth, J. (2002). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization, *528*(1-3), 125-129. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03272-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03272-6)
- Bíliková, K., Huang, S.-C., Lin, I.-P., Šimúth, J., & Peng, C.-C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*, *68*, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.001>
- Bíliková, K., & Šimúth, J. (2010). New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(15), 8776-8781. <https://doi.org/10.1021/jf101583s>

- Boecking, O., & Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2-3), 141-158. <https://doi.org/10.1051/apido:19990205>
- Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., & Spivak, M. (2015). Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology*, 218(22), 3689-3699. <https://doi.org/10.1242/jeb.127324>
- Botíková, P. (2022). *Imunochemická detekce a kvantifikace antimikrobiálních peptidů*. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J., & Gunn, A. (1999). The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), 101-106. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brady, D., Grapputo, A., Romoli, O., & Sandrelli, F. (2019). Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235862>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1228-1237. <https://doi.org/10.1139/w06-086>
- Bučeková, M., Valachová, I., Kohútová, L., Procházka, E., Klaudivy, J., & Majtán, J. (2014). Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101, 661-670. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1205-z>
- Bui, M.-P., Ahmed, S., & Abbas, A. (2015). Single-Digit Pathogen and Attomolar Detection with the Naked Eye Using Liposome-Amplified Plasmonic Immunoassay. *Nano Letters*, 15(9), 6239-6246. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02837>
- Bulet, P., & Stocklin, R. (2005). Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Protein & Peptide Letters*, 12(1), 3-11. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35, 127-160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>
- Cammack, R., Atwood, T., Campbell, P., Smith, A., Vella, F., & Stirling, J. (Eds.). (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (Second edition). Oxford University Press.
- Campbell, J., Kessler, B., Mayack, C., & Naug, D. (2010). Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit?. *Parasitology*, 137(10), 1487-1491. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000235>
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(Suppl. 1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00185-5)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and Chemical Characterization of *Hymenoptaecin*, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387-2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 381-386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Post-translational Conversion of the Precursor Structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569-28575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61943-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61943-5)

- Castle, M., Nazarian, A., Yi, S. S., & Tempst, P. (1999). Lethal Effects of Apidaecin on *Escherichia coli* Involve Sequential Molecular Interactions with Diverse Targets. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32555-32564. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32555>
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2012). 2 - Crustacean immune responses and their implications for disease control. In B. Austin (Ed.), *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control* (pp. 69-87). Woodhead Publishing.
- Ceylan, A., Sevin, S., & Özgenc, Ö. (2019). Histomorphological and histochemical structure of the midgut and hindgut of the Caucasian honey bee (*Apis mellifera caucasia*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(6), 747-753. <https://doi.org/10.3906/vet-1906-55>
- Colonello, N. A., & Hartfelder, K. (2003). Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. *Apidologie*, 34(3), 257-267. <https://doi.org/10.1051/apido:2003019>
- Conroy, T. E., & Holman, L. (2022). Social immunity in the honey bee: do immune-challenged workers enter enforced or self-imposed exile?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 76. <https://doi.org/10.1007/s00265-022-03139-z>
- Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., & Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*, 3(5), 435-448. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00177-0)
- Costa-Leonardo, A. M., Laranjo, L. T., Janei, V., & Haifig, I. (2013). The fat body of termites: Functions and stored materials. *Journal of Insect Physiology*, 59(6), 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.009>
- Crailsheim, K. (1985). Distribution of haemolymph in the honeybee (*Apis mellifica*) in relation to season, age and temperature. *Journal of Insect Physiology*, 31(9), 707-713. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(85\)90051-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90051-4)
- Crowther, J. (2000). *The ELISA Guidebook*. Humana Press.
- Čerovský, V., & Bém, R. (2014). Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy. *Pharmaceuticals*, 7(3), 251-264. <https://doi.org/10.3390/ph7030251>
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- de la Rica, R., & Stevens, M. M. (2012). Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology*, 7, 821-824. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.186>
- de Lima, P. R., & Brochetto-Braga, M. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 9(2). <https://doi.org/10.1590/S1678-91992003000200002>
- Demchick, P., & Koch, A. L. (1996). The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 768-773. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.768-773.1996>
- Dickel, F., Bos, N. M. P., Hughes, H., Martín-Hernández, R., Higes, M., Kleiser, A., & Freitak, D. (2022). The oral vaccination with *Paenibacillus larvae* bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees—A safety and efficacy study. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.946237>
- Ding, J., Chou, Y.-Y., & Chang, T. L. (2009). Defensins in Viral Infections. *Journal of Innate Immunity*, 1(5), 413-420. <https://doi.org/10.1159/000226256>
- Dostálková, S., Kodrík, D., Simone-Finstrom, M., Petřivalský, M., & Danihlík, J. (2022). Fine-scale assessment of Chlorella syrup as a nutritional supplement for honey bee colonies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1028037>

- Dutta, R. C., Nagpal, S., & Salunke, D. M. (2008). Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation, *40*(5), 1005-1015. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.005>
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*, 931-940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>
- El Mohandes, S. S., Nafea, E. A., & Fawzy, A. M. (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, *3*(1), 113-220. <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2010.15257>
- El-Seedi, H., Abd El-Wahed, A. A., Yosri, N., Musharraf, S. G., Chen, L., Moustafa, M., Zou, X., Al-Mousawi, S., Guo, Z., Khatib, A., & Khalifa, S. (2020). Antimicrobial Properties of *Apis mellifera*'s Bee Venom. *Toxins*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/toxins12070451>
- Engvall, E. (2010). The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*, *56*(2), 319-320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, *8*(9), 871-874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Erlandson, M. A., Toprak, U., & Hegedus, D. D. (2019). Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of Insect Physiology*, *117*. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103894>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, *15*(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Evans, J., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(Suppl.), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Feng, B., Dai, Y., Zhang, H., Wang, L., Ding, Y., & Zeng, H. (2009). How an Improved Immunoassay Sensitivity Can Be Achieved by Gamma Irradiation: Modification, Application and Characterization of Polystyrene Surface for Anti HIV-1 ELISA. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *30*(4), 457-466. <https://doi.org/10.1080/15321810903188318>
- Fernández de Ullivarri, M., Arbulu, S., Garcia-Gutierrez, E., & Cotter, P. D. (2020). Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00105>
- Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D. N., Rodnina, M. V., & Mankin, A. S. (2017). An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *24*, 752-757. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3439>
- Fontana, R., Mendes, M. A., de Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, *25*(6), 919-928. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly. Purification and Determination of the Primary Structure of Royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(19), 11333-11337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38596-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38596-5)
- Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Rusvai, M., Honti, V., Kolics, B., Török, T., Williams, M., Kurucz, É., & Andó, I. (2020). Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. *Developmental and Comparative Immunology*, *109*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103701>
- Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Török, T., Folkl-Medzihradzky, K., Darula, Z., Andó, I., & Kurucz, É. (2017). Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, *76*, 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.013>

- Gannabathula, S., Krissansen, G. W., Skinner, M., Steinhorn, G., & Schlothauer, R. (2015). Honeybee apisimin and plant arabinogalactans in honey costimulate monocytes. *Food Chemistry*, *168*, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.007>
- Gao, L., Yang, Q., Wu, P., & Li, F. (2020). Recent advances in nanomaterial-enhanced enzyme-linked immunosorbent assays. *Analyst*, *145*(12), 4069-4078. <https://doi.org/10.1039/D0AN00597E>
- Garcia-Gonzalez, 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*(11), 2894–2901. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12167>
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Ghosh, A., Kar, R. K., Jana, J., Saha, A., Jana, B., Krishnamoorthy, J., Kumar, D., Ghosh, S., Chatterjee, S., & Bhunia, A. (2014). Indolicidin Targets Duplex DNA: Structural and Mechanistic Insight through a Combination of Spectroscopy and Microscopy. *ChemMedChem*, *9*(9), 2052-2058. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402215>
- Glatz, R., Roberts, H. L. S., Li, D., Sarjan, M., Theopold, U. H., Asgari, S., & Schmidt, O. (2004). Lectin-induced haemocyte inactivation in insects. *Journal of Insect Physiology*, *50*(10), 955-963. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.009>
- Gliński, Z., & Buczek, K. (2003). Response of the Apoidea to fungal infection. *Apiacta*, *38*, 183-189. <http://www.fiitea.org/foundation/files/2003/Glinski.pdf>
- Gliński, Z., & Jarosz, J. (1995a). Cellular and Humoral Defences in Honey Bees. *Bee World*, *76*(4), 195-205. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1995.11099270>
- Gliński, Z., & Jarosz, J. (1995b). Mechanical and Biochemical Defences of Honey Bees. *Bee World*, *76*(3), 110-118. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1995.11099257>
- Goblirsch, M., Warner, J. F., Sommerfeldt, B. A., & Spivak, M. (2020). Social Fever or General Immune Response? Revisiting an Example of Social Immunity in Honey Bees. *Insects*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/insects11080528>
- Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C. A., & Wilson, D. N. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural Product Reports*, *34*(7), 702-711. <https://doi.org/10.1039/C7NP00020K>
- Groisman, E. A. (1994). How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends in Microbiology*, *2*(11), 444-449. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90802-8](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90802-8)
- Gül, N., & Ayvalı, C. (2002). Purification and Determination of the Molecular Structure of Hemolymph Lectin of *Agrotis segetum* (Denis and Schiff.). *Turkish Journal of Biology*, *26*(2). <https://journals.tubitak.gov.tr/cgi/viewcontent.cgi?article=2220&context=biology>
- Habermann, E. (1972). Bee and Wasp Venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science*, *177*(4046), 314-322. <https://doi.org/10.1126/science.177.4046.314>
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, *5*(6), 951-959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Hancock, R. E. W., & Chapple, D. S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(6), 1317-1323. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1317>
- Haney, E., Mansour, S., & Hancock, R. (2010). Antimicrobial Peptides: An Introduction. In A. Giuliani & A. Rinaldi (Eds.), *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols* (pp. 3-22). Humana Press.
- Harpaz, D., Eltzov, E., Ng, T. S. E., Marks, R. S., & Tok, A. I. Y. (2020). Enhanced Colorimetric Signal for Accurate Signal Detection in Paper-Based Biosensors. *Diagnostics*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010028>
- Harris, J. W. (2007). Bees with Varroa Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged \leq five days post capping. *Journal of Apicultural Research*, *46*(3), 134-139. <https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101383>

- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science*, 10(6), 585-606. <https://doi.org/10.2174/138920309789630589>
- Harwood, G., Salmela, H., Freitag, D., & Amdam, G. (2021). Social immunity in honey bees: royal jelly as a vehicle in transferring bacterial pathogen fragments between nestmates. *Journal of Experimental Biology*, 224(7). <https://doi.org/10.1242/jeb.231076>
- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102-118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Ho, Y.-H., Shah, P., Chen, Y.-W., & Chen, C.-S. (2016). Systematic Analysis of Intracellular-targeting Antimicrobial Peptides, Bactenecin 7, Hybrid of Pleurocidin and Dermaseptin, Proline-Arginine-rich Peptide, and Lactoferricin B, by Using *Escherichia coli* Proteome Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(6), 1837-1847. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054999>
- Ho, Y.-H., Sung, T.-C., & Chen, C.-S. (2012). Lactoferricin B Inhibits the Phosphorylation of the Two-Component System Response Regulators BasR and CreB. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014720>
- Hölldobler, B., & Wilson, E. (2009). *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. W. W. Norton & Company.
- Hornbeck, P. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 110(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdlička, T., & Špíšek, R. (2017). *Základy imunologie* (6., akt. vyd.). Triton.
- Hou, C., Guo, L., Lin, J., You, L., & Wu, W. (2014). Production of antibacterial peptide from bee venom via a new strategy for heterologous expression. *Molecular Biology Reports*, 41, 8081-8091. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3706-4>
- Houdelet, C., Arafah, K., Bocquet, M., & Bulet, P. (2022). Molecular histoproteomy by MALDI mass spectrometry imaging to uncover markers of the impact of Nosema on *Apis mellifera*. *Proteomics*, 22(9). <https://doi.org/10.1002/pmic.202100224>
- Huang, H. W. (2000). Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry*, 39(29), 8347-8352. <https://doi.org/10.1021/bi000946l>
- Chapman, R. F., Simpson, S. J., & Douglas, A. E. (Eds.). (2013). *The Insects: Structure and Function* (Fifth edition). Cambridge University Press.
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T., & Huang, H. W. (2003). Evidence for Membrane Thinning Effect as the Mechanism for Peptide-Induced Pore Formation. *Biophysical Journal*, 84(6), 3751-3758. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75103-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75103-0)
- Chen, Y., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer, M., & Feldlaufer, M. F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4), 441-448. <https://doi.org/10.1051/apido:2004031>
- Ilyasov, R. A., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., & Nikolaenko, A. G. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(9), 1-9. <https://doi.org/10.1134/S0022093013010015>
- Jiang, H. (2008). The biochemical basis of antimicrobial responses in *Manduca sexta*. *Insect Science*, 15(1), 53-66. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00187.x>
- Jin, Y., Hammer, J., Pate, M., Zhang, Y., Zhu, F., Zmuda, E., & Blazyk, J. (2005). Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β -Sheet and α -Helical Potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 4957-4964. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.4957-4964.2005>
- Kay, B. K., Williamson, M. P., & Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal*, 14(2), 231-241. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.2.231>
- Kim, B.-Y., Kim, Y.-H., Choi, Y.-S., Lee, M.-Y., Lee, K.-S., & Jin, B.-R. (2022). Antimicrobial Activity of Apidermin 2 from the Honeybee *Apis mellifera*. *Insects*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/insects13100958>

- Kingsolver, M. B., Huang, Z., & Hardy, R. W. (2013). Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. *Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4921-4936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.006>
- Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.007>
- Kodíček, M. (2018). *Biochemické pojmy: výkladový slovník* (dotisk 1. vydání). Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In J. Lin & M. Alcocer (Eds.), *Food Allergens: Methods and Protocols* (pp. 79-94). Humana Press.
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B. A., Hoffmann, R., & Otvos, L. (2001). The Antibacterial Peptide Pyrrhocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, 40(10), 3016-3026. <https://doi.org/10.1021/bi002656a>
- Kraus, B., & Velthuis, H. H. W. (1997). High Humidity in the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Brood Nest Limits Reproduction of the Parasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Naturwissenschaften*, 84(5), 217-218. <https://doi.org/10.1007/s001140050382>
- Kucharski, R., Maleszka, J., & Maleszka, R. (2007). Novel cuticular proteins revealed by the honey bee genome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.009>
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., & Hyršl, P. (2019). The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity. *Insects*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Kuzmenkov, A. I., Peigneur, S., Nasburg, J. A., Mineev, K. S., Nikolaev, M. V., Pinheiro-Junior, E. L., Arseniev, A. S., Wulff, H., Tytgat, J., & Vassilevski, A. A. (2022). Apamin structure and pharmacology revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.977440>
- Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J., & Zaat, S. A. J. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150789>
- Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Daffre, S., Samakovlis, C., & Hultmark, D. (1992). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Molecular and General Genetics*, 232, 335-343. <https://doi.org/10.1007/BF00266235>
- Larsen, W. J. (1976). Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue and Cell*, 8(1), 73-92. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(76\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0040-8166(76)90021-5)
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
- Lee, G., & Bae, H. (2016). Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. *Molecules*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050616>
- Lee, T.-H., Hall, K. N., & Aguilar, M.-I. (2016a). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25-39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Lee, K.-S., Kim, B.-Y., Yoon, H.-J., Choi, Y.-S., & Jin, B. R. (2016b). Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities. *Developmental & Comparative Immunology*, 63, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.011>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal

- Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86(6), 973-983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Lesch, C., Goto, A., Lindgren, M., Bidla, G., Dushay, M. S., & Theopold, U. (2007). A role for Hemolymph in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*, 31(12), 1255-1263. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.03.012>
- Li, W.-F., Ma, G.-X., & Zhou, X.-X. (2006a). Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, 27(9), 2350-2359. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.016>
- Li, M., Rigby, K., Lai, Y., Nair, V., Peschel, A., Schitteck, B., & Otto, M. (2009). *Staphylococcus aureus* Mutant Screen Reveals Interaction of the Human Antimicrobial Peptide Dermcidin with Membrane Phospholipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4200-4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00428-09>
- Li, X. S., Sun, J. N., Okamoto-Shibayama, K., & Edgerton, M. (2006b). *Candida albicans* Cell Wall Ssa Proteins Bind and Facilitate Import of Salivary Histatin 5 Required for Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22453-22463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604064200>
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Liao, C., Upadhyay, A., Liang, J., Han, Q., & Li, J. (2018). 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde synthase and cuticle formation in insects. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.007>
- Lin, A. (2015). Indirect ELISA. In R. Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 51-60). Humana Press.
- Little, T. J., & Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(2), 58-60. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011>
- Liu, Y., Xia, X., Xu, L., & Wang, Y. (2013). Design of hybrid β -hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. *Biomaterials*, 34(1), 237-250. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.032>
- Lourenço, A. P., Florecki, M. M., Simões, Z. L. P., & Evans, J. D. (2018). Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide *defensin-1*. *Insect Molecular Biology*, 27(5), 577-589. <https://doi.org/10.1111/imb.12498>
- Lourenço, A. P., Martins, J. R., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2009). Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 71(2), 70-87. <https://doi.org/10.1002/arch.20301>
- Lv, Y., Shao, G., Zhang, Q., Wang, X., Meng, Y., Wang, L., Huang, F., Yang, T., Jin, Y., & Fu, C. (2019). The antimicrobial peptide PFR induces necroptosis mediated by ER stress and elevated cytoplasmic calcium and mitochondrial ROS levels: cooperation with Ara-C to act against acute myeloid leukemia. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0073-6>
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., & Gräslund, A. (2011). Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biophysics*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ph9030059>
- Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 4259-4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 8842-8846. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303884110>

- Marchand, C., Krajewski, K., Lee, H.-F., Antony, S., Johnson, A. A., Amin, R., Roller, P., Kvaratskhelia, M., & Pommier, Y. (2006). Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Research*, *34*(18), 5157-5165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl667>
- Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D., & Zervas, C. G. (1996). Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *31*(2), 119-133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)31:2<119::AID-ARCH1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:2<119::AID-ARCH1>3.0.CO;2-V)
- Marmaras, V. J., & Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, *21*(2), 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- Martin, G. G., Simcox, R., Nguyen, A., & Chilingaryan, A. (2006). Peritrophic Membrane of the Penaeid Shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, Formation, and Permeability. *The Biological Bulletin*, *211*(3), 275-285. <https://doi.org/10.2307/4134549>
- Masterman, R., Ross, R., Mesce, K., & Spivak, M. (2001). Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, *187*, 441-452. <https://doi.org/10.1007/s003590100216>
- Matejuk, A., Leng, Q., Begum, M., Woodle, M., Scaria, P., Chou, S., & Mixson, A. (2010). Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. *Drugs of the Future*, *35*(3). <https://doi.org/10.1358/dof.2010.035.03.1452077>
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1996). An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. *Biochemistry*, *35*(35), 11361-11368. <https://doi.org/10.1021/bi960016v>
- McCormick, D. (2014). Chapter 12 - Membrane Potential and Action Potential. In J. Byrne, R. Heidelberger & M. Waxham (Eds.), *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience* (Third edition, pp. 351-376). Academic Press.
- McMenamin, A. J., Daughenbaugh, K. F., Parekh, F., Pizzorno, M. C., & Flenniken, M. L. (2018). Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/v10080395>
- Mi, G., Shi, D., Herchek, W., & Webster, T. J. (2017). Self-assembled arginine-rich peptides as effective antimicrobial agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *105*(4), 1046-1054. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35979>
- Milman, O. *US government approves use of world's first vaccine for honeybees*. The Guardian. <https://www.theguardian.com/environment/2023/jan/04/honeybee-vaccine-first-approved> (21. 1. 2023)
- Mureşan, C. I., Dezmirean, D. S., Marc, B. D., Suharoschi, R., Pop, O. L., & Buttstedt, A. (2022). Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. *Journal of Functional Foods*, *98*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105286>
- Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z.-Y. (2019). Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zoological Research*, *40*(6), 488-505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>
- Narayana, J. L., & Chen, J.-Y. (2015). Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides*, *72*, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.05.012>
- Neuhaus, F., & Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 686-723. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003>
- Ng, V., & Chan, W. C. (2016). New Found Hope for Antibiotic Discovery: Lipid II Inhibitors. *Chemistry—A European Journal*, *22*(36), 12606-12616. <https://doi.org/10.1002/chem.201601315>
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, *29*(9), 464-472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Oddie, M., Büchler, R., Dahle, B., Kovacic, M., Le Conte, Y., Locke, B., de Miranda, J. R., Mondet, F., & Neumann, P. (2018). Rapid parallel evolution overcomes global honey bee parasite. *Scientific Reports*, *8*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26001-7>

- Ono, M., Igarashi, T., Ohno, E., & Sasaki, M. (1995). Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature*, *377*(6547), 334-336. <https://doi.org/10.1038/377334a0>
- Orlean, P. (2012). Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*, *192*(3), 775-818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Ory, F., Duchemin, V., Kilchenmann, V., Charrière, J., Dainat, B., & Dietemann, V. (2022). Lack of evidence for trans-generational immune priming against the honey bee pathogen *Melissococcus plutonius*. *PLoS ONE*, *17*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268142>
- Otvos, L., O, I., Rogers, M. E., Consolvo, P. J., Condie, B. A., Lovas, S., Bulet, P., & Blaszczyk-Thurin, M. (2000). Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, *39*(46), 14150-14159. <https://doi.org/10.1021/bi0012843>
- Page, P., Lin, Z., Buawangpong, N., Zheng, H., Hu, F., Neumann, P., Chantawannakul, P., & Dietemann, V. (2016). Social apoptosis in honey bee superorganisms. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep27210>
- Park, C. B., Yi, K.-S., Matsuzaki, K., Kim, M., & Kim, S. C. (2000). Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(15), 8245-8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>
- Parker, J. S., Mizuguchi, K., & Gay, N. J. (2001). A family of proteins related to Spätzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *45*(1), 71-80. <https://doi.org/10.1002/prot.1125>
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Perez, A. A., & Johnson, B. R. (2019). Task repertoires of hygienic workers reveal a link between specialized necrophoric behaviors in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *73*. <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2731-7>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, *71*, 635-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rahnamaeian, M., Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., Dobszlaff, K., Wiesner, J., Twyman, R. M., Zuchner, T., Sadd, B. M., Regoes, R., Schmid-Hempel, P., & Vilcinskas, A. (2015). Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1806). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0293>
- Rahnamaeian, M., Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., & Vilcinskas, A. (2016). The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation. *Peptides*, *78*, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.016>
- Raj, P. A., & Dentino, A. R. (2002). Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters*, *206*(1), 9-18. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb10979.x>
- Reber, G., Vissac, A.-M., de Moerloose, P., Bounameaux, H., & Amiral, J. (1995). A new, semi-quantitative and individual ELISA for rapid measurement of plasma D-dimer in patients suspected of pulmonary embolism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, *6*(5), 460-463. <https://doi.org/10.1097/00001721-199507000-00014>
- Riddell, C., Adams, S., Schmid-Hempel, P., & Mallon, E. B. (2009). Differential Expression of Immune Defences Is Associated with Specific Host-Parasite Interactions in Insects. *PLoS ONE*, *4*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007621>
- Richardson, R. T., Ballinger, M. N., Qian, F., Christman, J. W., & Johnson, R. M. (2018). Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*, *49*, 397-410. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>
- Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., & Steitz, T. A. (2015). The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*, 466-469. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3031>
- Runti, G., del Carmen Lopez Ruiz, M., Stoilova, T. B., Hussain, R., Jennions, M., Choudhury, H. G., Benincasa, M., Gennaro, R., Beis, K., & Scocchi, M. (2013). Functional Characterization of SbmA, a Bacterial Inner Membrane Transporter Required for Importing the Antimicrobial

- Peptide Bac7(1-35). *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5343-5351. <https://doi.org/10.1128/JB.00818-13>
- Russo, R. M., Liendo, M. C., Landi, L., Pietronave, H., Merke, J., Fain, H., Muntaabski, I., Palacio, M. A., Rodríguez, G. A., Lanzavecchia, S. B., & Scannapieco, A. C. (2020). Grooming Behavior in Naturally *Varroa*-Resistant *Apis mellifera* Colonies From North-Central Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.590281>
- Ruttner, F., & Hänel, H. (1992). Active defense against *Varroa* mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie*, 23(2), 173-187. <https://doi.org/10.1051/apido:19920210>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72, 32-42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
- Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., & Sahl, H. (2010). Human β -Defensin 3 Inhibits Cell Wall Biosynthesis in Staphylococci. *Infection and Immunity*, 78(6), 2793-2800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09>
- Sato, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1245-1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.021>
- Seeley, T. D., & Visscher, P. K. (1985). Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecological Entomology*, 10(1), 81-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1985.tb00537.x>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7). <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 55-70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)
- Shen, L.-R., Dilireba, S., Zhou, W.-X., Wang, Y.-R., Li, M.-L., & Zhai, L. (2014). Rapid Detection of Immunity Against Bacteria in Asian Honeybee and Western Honeybee with Quantification of Royalisin in the Hemolymph by Fast ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9305-9309. <https://doi.org/10.1021/jf501637g>
- Shen, L.-R., Wang, Y.-R., Zhai, L., Zhou, W.-X., Tan, L.-L., Li, M.-L., Liu, D.-D., & Xiao, F. (2015). Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 16, 155-166. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400223>
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., & Cui, L. (2005). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342(1), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.012>
- Shin, S.-H., Ye, M.-K., Choi, S.-Y., & Park, K.-K. (2017). The Effects of Melittin and Apamin on Airborne Fungi-Induced Chemical Mediator and Extracellular Matrix Production from Nasal Polyp Fibroblasts. *Toxins*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/toxins9110348>
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 3, 900-911. <https://doi.org/10.1038/nri1226>
- Schlüns, H., & Crozier, R. H. (2007). Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*, 16(6), 753-759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00768.x>
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., Stanley, D. W., & Tautz, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, 54(2), 439-444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>
- Schmid-Hempel, P. (1995). Parasites and social insects. *Apidologie*, 26(3), 255-271. <https://doi.org/10.1051/apido:19950307>
- Schönfeld, A. (1955). *Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné*. Státní zemědělské nakladatelství.

- Siede, R., Meixner, M. D., & Büchler, R. (2015). Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 51(4), 320-328. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.4.05>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414-a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simone, M., Evans, J. D., & Spivak, M. (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63(11), 3016-3022. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x>
- Simone-Finstrom, M., Borba, R. S., Wilson, M., & Spivak, M. (2017). Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/insects8020046>
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32, 1-48. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(05\)32001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7)
- Spivak, M. (1996). Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27(4), 245-260. <https://doi.org/10.1051/apido:19960407>
- Stanker, L., & Hnasko, R. (2015). A Double-Sandwich ELISA for Identification of Monoclonal Antibodies Suitable for Sandwich Immunoassays. In R. Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 69-78). Humana Press.
- Starks, P. T., Blackie, C. A., & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87, 229-231. <https://doi.org/10.1007/s001140050709>
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248. <https://doi.org/10.1038/292246a0>
- Strachecka, A., Olszewski, K., Kuszewska, K., Chobotow, J., Wójcik, Ł., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2021). Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93357-8>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Struyfs, C., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2021). Membrane-Interacting Antifungal Peptides. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649875>
- Suh, L. Y. K., Kartoon, T., Gujral, N., Yoon, Y., Suh, J. W., & Sunwoo, H. (2015). The Use of Chicken Igy in a Double Antibody Sandwich Elisa for the Quantification of Melittin in Bee Venom and Bee Venom Melittin Content in Cosmetics. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 97-107. <https://doi.org/10.1515/jas-2015-0011>
- Tafesh-Edwards, G., & Eleftherianos, I. (2020). JNK signaling in *Drosophila* immunity and homeostasis. *Immunology Letters*, 226, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.017>
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236-1241. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.023>
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B., & Moret, Y. (2019). Trans-generational Immune Priming in Invertebrates: Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01938>
- Tian, C., Gao, B., Fang, Q., Ye, G., & Zhu, S. (2010). Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. *BMC Genomics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-187>
- Tossi, A., & Sandri, L. (2002). Molecular Diversity in Gene-Encoded, Cationic Antimicrobial Polypeptides. *Current Pharmaceutical Design*, 8(9), 743-761. <https://doi.org/10.2174/1381612023395475>
- Tosteson, M. T., & Tosteson, D. C. (1981). The sting: Melittin forms channels in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 36(1), 109-116. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84719-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84719-4)
- Uematsu, N., & Matsuzaki, K. (2000). Polar Angle as a Determinant of Amphipathic α -Helix-Lipid Interactions: A Model Peptide Study. *Biophysical Journal*, 79(4), 2075-2083. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76455-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76455-1)

- Valachová, I., Bučeková, M., & Majtán, J. (2016). Quantification of bee-derived peptide defensin-1 in honey by competitive enzyme-linked immunosorbent assay, a new approach in honey quality control. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(3), 233-243. <https://doi.org/10.17221/422/2015-CJFS>
- Van Vaerenbergh, M., Cardoen, D., Formesyn, E. M., Brunain, M., Van Driessche, G., Blank, S., Spillner, E., Verleyen, P., Wenseleers, T., Schoofs, L., Devreese, B., & de Graaf, D. C. (2013). Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5. *Insect Molecular Biology*, 22(2), 199-210. <https://doi.org/10.1111/imb.12013>
- Vannette, R. L., Mohamed, A., & Johnson, B. R. (2015). Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16224>
- Visscher, P. K. (1983). The honey bee way of death: Necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Animal Behaviour*, 31(4), 1070-1076. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(83\)80014-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(83)80014-1)
- Vizán, J. L., Hernández-Chico, C., del Castillo, I., & Moreno, F. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *The EMBO Journal*, 10(2), 467-476. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07969.x>
- Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., & Shan, A. (2018). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 831-859. <https://doi.org/10.1002/med.21542>
- Wei, H., & Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(14). <https://doi.org/10.1039/c3cs35486e>
- Wheeler, D. E., & Kawooya, J. K. (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14(4), 253-267. <https://doi.org/10.1002/arch.940140405>
- Whitten, M. M. A., & Coates, C. J. (2017). Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 30(4), 386-401. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12590>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Won, S.-R., Li, C.-Y., Kim, J.-W., & Rhee, H.-I. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, 113(4), 1334-1338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.082>
- Woodrow, A. W., & States, H. J., Jr. (1943). Removal of Diseased Brood in Colonies Infected with A. F. B. *American Bee Journal*, 83(1), 22-23. https://archive.org/details/sim_american-bee-journal_1943-01_83_1/page/22/mode/2up
- Wu, Y., Liu, Q., Weiss, B., Kaltenpoth, M., & Kadowaki, T. (2020a). Honey Bee Suppresses the Parasitic Mite Vitellogenin by Antimicrobial Peptide. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01037>
- Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- Wu, Y., Zheng, Y., Chen, Y., Chen, G., Zheng, H., & Hu, F. (2020b). *Apis cerana* gut microbiota contribute to host health though stimulating host immune system and strengthening host resistance to *Nosema ceranae*. *Royal Society Open Science*, 7(5). <https://doi.org/10.1098/rsos.192100>
- Xu, P., Shi, M., & Chen, X. (2009). Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004239>
- Yalow, R. (1980). Radioimmunoassay. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9, 327-345. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.09.060180.001551>
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings*

- of the *National Academy of Sciences*, 102(21), 7470-7475.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>
- Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., & Huang, H. W. (2001). Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal*, 81(3), 1475-1485.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X)
- Yasir, M., Dutta, D., & Willcox, M. D. P. (2019). Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability. *PLoS ONE*, 14(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215703>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27-55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., & Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5807-5822.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- Zhao, X., & Liu, Y. (2022). Current Knowledge on Bee Innate Immunity Based on Genomics and Transcriptomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22).
<https://doi.org/10.3390/ijms232214278>
- Ziai, M. R., Russek, S., Wang, H.-C., Beer, B., & Blume, A. J. (1990). Mast Cell Degranulating Peptide: A Multi-functional Neurotoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(7), 457-461. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb06595.x>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302-308.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

βGRP	β-1,3-glukany rozpoznávající proteiny
Ab	protilátka
Ag	antigen
AK	aminokyseliny
AmP	antimikrobiální peptidy
BSA	hovězí sérový albumin
CBB G 250	Coomassie brilantová modř G 250
CM	cytoplazmatická membrána
ELISA	analýza s enzymem vázaným na imunosorbent
G-	gramnegativní (bakterie)
G+	grampozitivní (bakterie)
HRP	křenová peroxidasa
Hyp	hydroxyprolin
Imd	imunodeficientní (signální dráha)
JAK	Janus kinasy
JNK	c-Jun N-koncová kinasa
K-Pi	K-fosfátový pufr
L-dopa	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
LPS	lipopolysacharidy
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MCDP	mastocyty degranulující peptid
MRJP 1	hlavní protein mateří kašičky 1
PAMPs	molekulární vzory asociované s patogeny
PAP	proPO-aktivující protein
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerasová řetězová reakce
PGRP	peptidoglykany rozpoznávající proteiny
PO	fenoloxidasa
PP II	polyprolinový helix II. typu
proPO	profenoloxidasa
PRRs	receptory rozpoznávající molekulární vzory
RIA	radioimunoanalýza

ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu
STAT	signální transduktéry a aktivátory transkripce
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
Upd	Unpaired