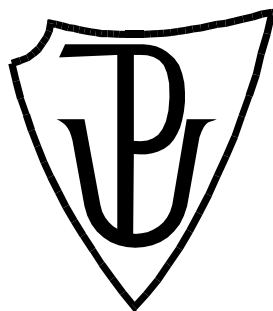


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Biologicky aktivní peptidy v reakci na stresové podmínky včely medonosné (*Apis mellifera*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Jakub Rozhon
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok: 2021

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

.....

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Jakub Rozhon
Název práce:	Biologicky aktivní peptidy v reakci na stresové podmínky včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biochemie
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021

Abstrakt

V současné době dochází v porovnání s předešlými lety ke znatelným úbytkům populací včely medonosné (*Apis mellifera*) z neznámých důvodů. Biologicky aktivní peptidy jsou molekuly se značným fyziologickým účinkem u všech živých organismů. U hmyzu zprostředkovávají obrannou a imunitní odpověď jedince na stresory z okolí. Tato práce je věnována studiu těchto molekul v těle včely medonosné a mechanismu jejich působení se specifickým zaměřením na dvě velké skupiny bioaktivních peptidů: antimikrobiální peptidy a hmyzí peptidové hormony. Antimikrobiální peptid apidaecin I složený z peptidického řetězce 18 aminokyselin s typickými strukturními rysy (např. vyšší obsah prolinu) je cílen především vůči Gram-negativním bakteriím. Adipokinetický hormon včel složený z řetězce 9 aminokyselin aktivuje, mobilizuje a degraduje lipidy uložené v jejich tukovém tělese v reakci na vnější stresové podmínky. Součástí práce jsou také vypracované teoretické protokoly s navrženým postupem izolace, purifikace a detekce s kvantifikací těchto peptidů pomocí vhodných metod.

Klíčová slova:	Biologicky aktivní peptidy, antimikrobiální peptidy, hmyzí peptidové hormony, včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>), optimalizace, izolace, purifikace a kvantifikace peptidů.
Počet stran:	83
Počet příloh:	13
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Jakub Rozhon

Title: Biologically active peptides in reaction to stress conditions of honeybee (*Apis mellifera*)

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of biochemistry

Supervisor: Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Abstract

It was recently found, that the honeybee (*Apis mellifera*) population has been, in contrast to previous years, decreasing from unknown reasons. Biologically active peptides are molecules known for their considerable physiological impact on all living organisms. In case of insect organisms, they are main mediators of defense and immune response in relation with external stressors. The aim of this thesis is to study these molecules in honeybee's body and their mechanism of action with specific focusing on two big groups of bioactive peptides: antimicrobial peptides and insect peptide hormones. Antimicrobial peptide apidaecin I composed from peptide chain of 18 amino acids with typical structural features (e.g. high proline content) is aimed mainly against Gram-negative bacteria. Honeybee's adipokinetic hormone composed from 9 amino acids activates, mobilises and degrades lipids stored in their fat body depending on external stress conditions. Part of the thesis are also elaborated theoretical protocols with suggested workflow of isolation, purification and detection with quantification of these peptides via suitable methods.

Keywords: Biologically active peptides, antimicrobial peptides, insect peptide hormones, honeybee (*Apis mellifera*), optimalisation, isolation, purification and quantification.

Number of pages: 83

Number of appendices: 13

Language: Czech

1 OBSAH

1	OBSAH	5
2	CÍLE	8
3	ÚVOD	9
4	LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
4.1	PEPTIDY.....	10
4.2	BIOLOGICKY AKTIVNÍ PEPTIDY	13
4.2.1	<i>Původ biologicky aktivních peptidů</i>	<i>15</i>
4.2.2	<i>Modifikace biologicky aktivních peptidů</i>	<i>16</i>
4.2.3	<i>Funkce a fyziologický význam biologicky aktivních peptidů</i>	<i>17</i>
4.3	ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY	19
4.3.1	<i>Historie objevu</i>	<i>19</i>
4.3.2	<i>Původ a funkce.....</i>	<i>20</i>
4.3.3	<i>Princip účinku.....</i>	<i>20</i>
4.3.4	<i>Chemické složení a struktura</i>	<i>22</i>
4.3.5	<i>Antimikrobiální peptidy včely medonosné</i>	<i>23</i>
4.3.5.1	Apidaeciny	24
4.3.5.2	Abaecin	24
4.3.5.3	Defensiny	25
4.3.5.4	Hymenoptaecin	25
4.3.5.5	Další významné antimikrobiální peptidy u včel	26
4.3.6	<i>Buněčné signální dráhy zapojené v regulaci antimikrobiálních peptidů</i>	<i>26</i>
4.3.6.1	Toll signální dráha	27
4.3.6.2	IMD-JNK signální dráha.....	28
4.3.6.3	JAK/STAT signální dráha	29
4.4	HMYZÍ PEPTIDOVÉ HORMONY	30
4.4.1	<i>Historie objevu</i>	<i>30</i>
4.4.2	<i>Původ a funkce.....</i>	<i>30</i>
4.4.3	<i>Chemické složení jednotlivých zástupců a princip jejich účinku</i>	<i>31</i>
4.4.3.1	Adipokinetické hormony (AKHs).....	35
4.4.3.2	Peptidové hormony podobné insulinu (ILPs).....	37
4.4.3.3	Hormon způsobující diapauzu a aktivaci biosyntézy hmyzích feromonů (DH-PBAN)	39
4.4.3.4	Neuropeptid F (NPF) a krátký neuropeptid F (sNPF)	40
4.4.3.5	Allatostatin-A (AstA)	41
4.4.3.6	Corazonin (Crz)	42
4.4.3.7	Leukokinin (Lk).....	43
4.4.3.8	CCH-amid-2 (CCHa2).....	43

4.4.3.9	Tachykininy (Tks)	43
4.4.3.10	Cytokiny (adipokiny) (Cyks)	44
4.4.3.11	Limostatin (Lst)	45
4.4.4	<i>Hmyzí peptidové hormony včely medonosné</i>	45
4.5	METODY	47
4.5.1	<i>Purifikační a separační metody peptidů</i>	47
4.5.1.1	AMICON® filtrace	47
4.5.1.2	Iontoměničová chromatografie – Ion-exchange chromatography (IEC)	48
4.5.1.3	Chromatografie s reverzní fází – Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC)	49
4.5.2	<i>Detekční metody peptidů</i>	50
4.5.2.1	Hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace elektrosprejem (ESI-MS)	50
4.5.2.2	Kvantifikace v hmotnostní spektrometrii s využitím interních značených standardů	52
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	55
5.1	NAVRŽENÝ PROTOKOL IZOLACE, PURIFIKACE A NÁSLEDNÉ DETEKCE S KVANTIFIKACÍ VČELÍHO ANTIMIKROBIÁLNÍHO PEPTIDU APIDAEACINU I	55
5.1.1	<i>Izolace apidaecinu I z těla Apis mellifera – prepurifikační kroky</i>	55
5.1.1.1	Sběr hemolymfy a hrudní části ze včelího těla	55
5.1.1.2	Nutné prepurifikační kroky	55
5.1.2	<i>Purifikace jednotlivých vzorků za účelem zisku co nejčistší frakce apidaecinu I</i>	56
5.1.2.1	Slabá iontoměničová chromatografie na katexu (WCX) v reverzní fází	57
5.1.2.2	Kapalinová chromatografie na reverzní fází v nanokapilárním provedení (RP-nLC)	57
5.1.3	<i>Měření hmotnostního spektra apidaecinu I s následnou kvantifikací</i>	58
5.1.3.1	Externí kalibrace	58
5.1.3.2	Kvantifikace	58
5.2	NAVRŽENÝ PROTOKOL IZOLACE, PURIFIKACE A NÁSLEDNÉ DETEKCE S KVANTIFIKACÍ VČELÍHO ADIPOKINETICKÉHO HORMONU (APM-AKH)	60
5.2.1	<i>Izolace včelího adipokinetického hormonu z těla Apis mellifera – prepurifikační kroky</i>	60
5.2.1.1	Kolekce tkání neuroendokrinní soustavy – cerebrálního ganglionu bez komplexu <i>corpora cardiaca-corpora allata</i> a samotného komplexu <i>corpora cardiaca-corpora allata</i>	60
5.2.1.2	Nutné prepurifikační kroky	60
5.2.2	<i>Purifikace jednotlivých vzorků za účelem zisku co nejčistší frakce včelího adipokinetického hormonu</i>	61
5.2.2.1	„Size-exclusion“ chromatografie (SEC)	61
5.2.2.2	Kapalinová chromatografie na reverzní fází v nanokapilárním provedení (RP-nLC)	62
5.2.3	<i>Měření hmotnostního spektra včelího adipokinetického hormonu s následnou kvantifikací</i>	62
5.2.3.1	Externí kalibrace	62
5.2.3.2	Kvantifikace	63
6	ZÁVĚR	64

7	LITERATURA	66
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78

2 CÍLE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo syntetické zpracování literární rešerše o vybraných skupinách biologicky aktivních peptidů včely medonosné (*Apis mellifera*) a také o jejich významu a účincích v samotném těle tohoto druhu hmyzu.

V literární rešerši jsou mimo jiné popsány poznatky o způsobu zpracování, izolace a purifikace biologicky aktivních peptidů včel v minulosti.

Hlavní cíl experimentální části se týká vypracování teoretického protokolu vhodného zpracování biologického materiálu pro izolaci a purifikaci biologicky aktivních peptidů druhu *Apis mellifera*. Dále je tento pilotní protokol věnován samotné izolaci a purifikaci látek za využití současně používaných metodik (kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie). Nedílnou součástí protokolu je také vhodná optimalizace používané metodiky, za účelem co nejpřesnější izolace a detekce vybraných biologicky aktivních peptidů včel.

3 ÚVOD

V současné době dochází v porovnání s předešlými lety a desetiletími ke znatelným úbytkům populací včely medonosné (*Apis mellifera*) z doposud neznámých důvodů, což má za následek nejen výrazné ohrožení tohoto druhu, ale i značné ovlivnění života lidské populace na Zemi (Daníhlík *et al.*, 2016). Včela medonosná je totiž hlavní opylovačem rostlin, což zahrnuje i zemědělské plodiny, ovocné stromy a další pro člověka velmi významné plodiny. Dle vanEngelsdorpa a Meixnera (2010) jsou hlavní příčinou ztrát *Apis mellifera* zhoršující se podmínky pro jejich přežití, které jsou způsobeny jak biotickými, tak abiotickými faktory okolního prostředí. V této práci je kladen důraz na studium ovlivnění kvality a délky života tohoto hmyzu pomocí biotických faktorů se zaměřením na molekuly s fyziologickými účinky v jejich těle – biologicky aktivní peptidy.

Biologicky aktivní peptidy (také bioaktivní peptidy) jsou molekuly se značným fyziologickým účinkem u všech živých organismů. Teoretická část této práce je věnována hmyzím bioaktivním peptidům, které řadíme do dvou větších skupin zvaných hmyzí antimikrobiální peptidy (AmPs) a hmyzí peptidové hormony (HPHs). AmPs zajišťují mimo jiné okamžitou vlastní imunitní odpověď včel při napadení patogenem (Daníhlík *et al.*, 2016). HPHs navíc zajišťují regulaci metabolických pochodů v pomalejším a dlouhodobějším výhledu než AmPs, které ovlivňují fyzický stav jedince, jeho chování, adaptaci na prostředí a také jeho reakce na stresové podmínky prostředí (Kodrik, 2017). V kapitole navazující na experimentální část práce je pak vysvětlen princip prepurifikačních, purifikačních a detekčních metod, které jsou současně využívány v rámci peptidomického a proteomického studia.

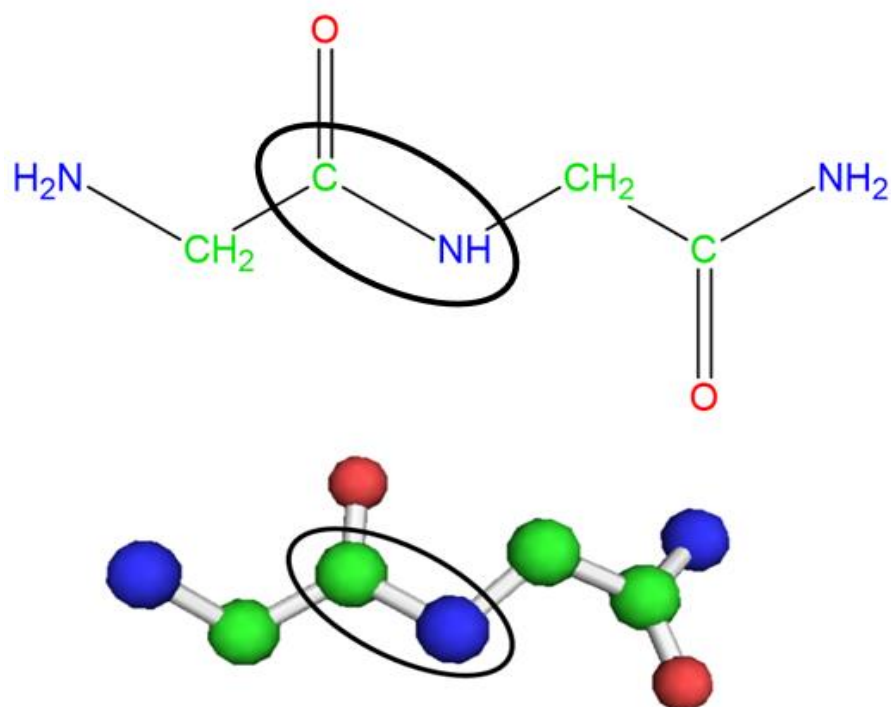
Pro zkoumání konkrétních bioaktivních peptidů *Apis mellifera* je nutné vytvoření správného a co možná nejšetrnějšího postupu izolace, separace a purifikace, detekce a kvantifikace těchto molekul pomocí současně používaných metod. Předložená práce je tedy v experimentální části věnována vhodné optimalizaci metod, kterými jsou kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie, za účelem prohloubení znalostí o včelích bioaktivních peptidech spojených s délkou a kvalitou života jednotlivých včelstev.

4 LITERÁRNÍ REŠERŠE

4.1 Peptidy

Různé peptidy ve všech živých organismech vykazují biologickou aktivitu a zprostředkovávají celou škálu biologických funkcí. Ovšem pro správnou funkci v organismu je zprvu nutná jejich syntéza a distribuce. Biosynteticky mohou peptidy vznikat dvěma různými způsoby: ribosomální a neribosomální cestou. Biosyntéza peptidů ribosomální cestou, tedy proces transkripce a následné translace, probíhá za účasti tří základních makromolekulárních komplexů: aminoacyl-tRNA synthetasy (EC 6.1.1.-; aaRS), elongačního faktoru a velké ribosomální podjednotky. Zmíněným mechanismem dochází k tvorbě peptidů a proteinů ve většině živých organismů. Naproti tomu, při neribosomální syntéze peptidů, tedy tvorbě peptidů mimo ribosom za účasti synthetas, organismus využívá (mimo jiné) následující proteiny: adenylační doménu peptidu, peptidyl carrier protein (PCP) a kondenzační doménu peptidu (Finking a Marahiel, 2004). Takovéto tvorby peptidů a proteinů jsou schopny především mikroorganismy (bakterie, houby), využívající enzym nonribosomal peptide synthetase (EC 6.3.2.-; NRPSs) (Hahn a Stachelhaus, 2004). V poslední řadě existují také peptidy, které jsou sice syntetizovány v ribosomech, ale poté jsou přeměňovány pomocí enzymů, což vede k velké rozmanitosti pole působnosti těchto látek. Konkrétně se jedná o bakteriociny a mikrocin, které slouží k inspiraci při vývoji nových modifikací antibiotik (Duquesne *et al.*, 2007).

Aminokyseliny (AMK) jsou molekuly, které obsahují jednak aminoskupinu ($-NH_2$), ale také karboxylovou skupinu ($-COOH$). Důležité pro tvorbu peptidů a proteinů jsou ty AMK, které obsahují aminoskupinu na uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou, a jsou nazývány 2-aminokyseliny (či α -aminokyseliny) – doposud je známých 22 proteinogenních AMK (Hertweck, 2011). Spojením těchto molekul pomocí výše uvedených skupin do jednoho řetězce vznikají peptidy. Konkrétně zde dochází k uvolnění molekuly vody (H_2O), kdy se z aminoskupiny odštěpí jeden vodík, a z karboxylové skupiny se odloučí hydroxylová skupina (OH^-). Jsou tak utvořeny zbytky jednotlivých AMK zvané také residua tvořící spolu kovalentní amidovou vazbu, která je více známá pod názvem peptidová vazba (JCBN, 1984; Obr. 1).



Obrázek 1: Struktura peptidové vazby (ukázka na molekule glycylglycinamidu); vytvořeno v programu ChemSketch – horní část a PyMOL – dolní část.

Vzniklé peptidy můžeme rozdělit podle jejich délky a také podle způsobu navázání jednotlivých AMK v peptidovém řetězci. Podle počtu spojených residuí je dělíme na oligopeptidy (s počtem menším než 10-20) a polypeptidy (s počtem větším než 10-20) (JCBN, 1984; Moss *et al.*, 1995). Pořadí jednotlivých AMK v peptidu udává jeho primární strukturu, jež úzce souvisí s biologickou aktivitou dané biomakromolekuly (Murray, 2002). Rozlišení polypeptidů a proteinů se na základě různých zdrojů liší, nicméně dle Mosse *et al.* (1995) je považován za protein polypeptid s molekulovou hmotností přesahující 10 kDa (tedy polypeptid tvořen cirká 50 AMK). Je nutno také rozlišovat, která aminoskupina a která karboxylová skupina jednotlivých AMK se účastní tvorby peptidové vazby – peptidy s vazbou vytvořenou z karboxylové skupiny na první pozici a z aminoskupiny na druhé pozici nazýváme eupeptidy (peptidy obsahující eupeptidickou vazbu), ovšem pokud je na karboxylovou skupinu navázána aminoskupina nacházející se v jiné pozici, bavíme se o takzvaných izopeptidech (peptidy obsahující izopeptidickou vazbu) (JCBN, 1984). Aminokyseliny nacházející se na koncích oligopeptidového či polypeptidového řetězce obsahují volné skupiny, na kterých není navázána další AMK. Podle chemické struktury tohoto zbytku se bavíme o C-konci (C-terminus), jež obsahuje volnou karboxylovou skupinu, a N-konci (N-terminus), který disponuje volnou aminoskupinou. Tyto konce mohou být také blokovány

určitými molekulami – C-terminus aminoskupinou a N-terminus pyruglutamovou kyselinou – např. u biologicky aktivních peptidů hmyzu, konkrétněji u adipokinetických hormonů (AKHs) (Kodrík, 2017; viz kapitola 4.4).

Jejich funkce jsou širokospektré. Jsou to základní stavební kameny proteinů, které samy o sobě tvoří konkrétně u člověka pětinu jeho tělesné hmotnosti (Štern, 2011). Dále zajišťují imunitní odezvu a regulaci organismu, jelikož jsou hlavní složkou enzymů a některých hormonů a v neposlední řadě slouží také k medicínským účelům, např. k tvorbě antibiotik a vakcín (Murray, 2002).

Peptidy lze syntetizovat také chemicky. Reakce ovšem musejí probíhat za současného použití chránících skupin (protecting groups), které mají za úkol ochránit reaktivní skupiny na postranních řetězcích jednotlivých aminokyselin, aby zde chemickou reakcí nedocházelo k tvorbě směsi různých produktů. Důležitou roli hraje také směr tvorby peptidů, kde hlavním rozdílem mezi uměle syntetizovaným a biosyntetizovaným peptidem je, že syntéza peptidů v organismech probíhá od N-konce směrem k C-konci, kdežto při chemické syntéze je tomu naopak (Isidro-Llobet *et al.*, 2009).

4.2 Biologicky aktivní peptidy

Jako podmnožinu peptidů můžeme označit biologicky aktivní peptidy, či někdy nazývané bioaktivní peptidy. Z chemického hlediska se řadí mezi oligopeptidy a polypeptidy se specifickými schopnostmi a účinky ovlivňující chod všech živočichů a rostlin na naší planetě. Podle Sáncheze a Vázqueze (2017) sestávají tedy obvykle, ne však výlučně, ze 2 až 20 AMK za současné přítomnosti prolinu, lysinu a argininu, kteréžto jsou obohaceny také o hydrofobní AMK. Toto je obecně platná definice, ovšem mezi objevenými bioaktivními peptidy se nachází i velký počet těchto látek, které danou definici nesplňují – ať už svým složením či délkou postranních a hlavních řetězců. Jejich specifické složení je jednou z možných příčin, proč vykazují (oproti klasickým peptidům) rezistenci vůči jejich rozkladu enzymy zvanými peptidasy (EC 3.4.X.Y) (Kitts a Weiler, 2003).

Bioaktivní peptidy můžeme rozdělit na základě hned několika parametrů. Těmito parametry jsou např. živočišné, ze kterých pocházejí, jejich způsob syntézy, funkce a mechanismus účinku. Názorné rozdělení je vyobrazeno v tabulce (Tab. 1). Je však nutno uvést, že toto rozdělení není zcela striktní, jelikož se jednotlivé bioaktivní peptidy mohou nacházet ve více jak jedné z peptidových skupin.

Tabulka 1: Rozdělení významných biologicky aktivních peptidů do jednotlivých skupin.

Skupiny bioaktivních peptidů	Organismus obsahující tyto peptidy (lokace v organismu)	Některé funkce pro danou skupinu	Zástupci konkrétní skupiny
Skupiny peptidů rostlin (Matsubayashi, 2013)	Rostliny	Různá u konkrétních peptidů (ochranná a obranná, signalizační)	CLAVATA3, Obranné signální peptidy, Fytosulfokin
Skupiny peptidů hub (Ng, 2013)	Houby, živočišné, rostliny	Obranná a ochranná, antibakteriální, antiproliferační a jiné	PSK, Fungální toxiny, Rostlinné antifungální peptidy
Skupiny peptidů bezobratlých živočichů, obojživelníků a kožní peptidy (Nachman, 2013; Conlon, 2013)	Živočišné (konkrétní žlázy např. u hmyzu: neuroendokrinní žlázy)	Ochranná (změna zbarvení), signalizační, regulační	AKH/RPCH, Allatotropin, Bombininy, Insulin uvolňující peptidy
Peptidy s rakovinnými či protirakovinnými účinky (Moody, 2013)	Živočišné (téměř ve všech hlavních orgánech těla: mozek, srdce, plíce atd.)	Proliferační/antiproliferační, angiogenezní	Adrenomedullin, Angiotensiny, Gastrin, Somatostatin
Peptidy bakteriální a antibiotické (Hancock, 2013)	Živočišné, bakterie (produkce bakteriocinů)	Imunitní odpověď, ochranná a obranná, antimikrobiální	Kathelicidiny, Defensiny, Mikrociny
Peptidy jedové (Sabatier, 2013)	Specifické organismy ze všech říší	Obranná a ochranná	Zvířecí toxiny, Toxiny blanokřídlých, Hadí a pavoučí toxiny
Peptidy imunitní a zánětlivé (Oppenheim, 2013)	Živočišné (komplement – imunitní systém)	Imunitní odpověď, obranná	Anafylatoxiny, Chemokiny, Neuroimunitní peptidy
Peptidy mozkové (Vaudry, 2013)	Živočišné (mozek, ganglie)	Kontrola funkčnosti neuronů, zpracování nervových vzruchů	Apelin, CRH skupina peptidů, Melanokortiny
Peptidy endokrinní (Malendowicz, 2013), ingestivní (Woods, 2013), kardiovaskulární (Takahashi, 2013)	Živočišné (žlázy s vnitřní sekrecí, gastrointestinální trakt a cévní soustava)	Kontrola správného chodu jednotlivých soustav organismu	Adiponektin, Apolipoproteiny, Leptin

4.2.1 PŮVOD BIOLOGICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ

Podle původu vzniku jednotlivých biologicky aktivních peptidů existují 2 velké skupiny: endogenní a exogenní. Přičemž endogenní si organismus dokáže vytvořit sám v závislosti na určité stresové situaci způsobené jednak podnětem z okolního prostředí (např. napadení cizorodými chemikáliemi či organismy), ale také třeba při regulaci nejrůznějších metabolických pochodů uvnitř organismu samotného.

Exogenní bioaktivní peptidy jsou naproti tomu získávány především trávením přijaté potravy a biologického materiálu, jež obsahuje buď rostlinné, nebo živočišné biologicky aktivní molekuly. Z toho důvodu jsou jedním ze dvou hlavních zdrojů exogenních bioaktivních peptidů pro organismy rostliny – konkrétně např. kukuřice, sója (Singh *et al.*, 2014), pšenice, ale i houby (Möller *et al.*, 2008). Druhý zdroj představuje živočišný biologický materiál – pro člověka a další organismy zejména hovězí maso, krev (Przybylski *et al.*, 2016), želatina (Lassoued *et al.*, 2015), vejce, mléko, sýr, mléčné produkty (Mohanty *et al.*, 2016) a ryby (Möller *et al.*, 2008; Sánchez a Vázquez, 2017).

Současně je však stále větším trendem syntetická produkce biologicky aktivních látek, jež zahrnují právě i bioaktivní peptidy. Moderní chemie a biochemie již odhalila nepřeberné množství způsobů, jak konkrétní biomolekuly s co nejvyšší přesností, čistotou a nenáročností připravit, nicméně stále usiluje o jejich zdokonalení a o vývoj nových metod. Syntetické bioaktivní peptidy se tudíž vyrábí jak v laboratorním, tak i v průmyslovém měřítku, a to buď modifikací již existujících peptidů a proteinů (např. z výše uvedených zdrojů) (Korhonen, 2009), nebo tvorbou organických molekul pomocí chemické syntézy (Sánchez a Vázquez, 2017).

Hlavní metodou produkce peptidů pomocí modifikací jejich izolovaných nesyntetických prekurzorů je podle Korhonen (2003; 2009) enzymatická hydrolýza trávicími enzymy, fermentací mléka proteolytickou kulturou a proteolýza pomocí enzymů získaných z mikroorganismů a rostlin. Chemická syntéza peptidů probíhá např. na pevné fázi – tak zvaná solid-phase peptide synthesis (SPPS) (Hackenberger a Schwarzer, 2008), nebo *in silico* cestou (Udenigwe *et al.*, 2013). Těmito a také mnoha jinými způsoby lze tudíž vytvářet nové biologicky aktivní peptidy anebo ty stávající modifikovat.

4.2.2 MODIFIKACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ

V současné době existuje nepřehledné množství modifikací bioaktivních peptidů. Pro lepší orientaci v této problematice je můžeme rozdělit na 3 skupiny modifikací: kotranslační, posttranslační a posttranskripční, které se od sebe liší zásadními rozdíly. Protein či peptid vzniká v organismu procesem transkripce a následné translace (viz kapitola 4.1).

Kotranslační modifikace peptidu probíhá současně s těmito procesy a je tedy syntetizován již modifikovaný produkt. Jako příklad této modifikace lze uvést kovalentní navázání sacharidových residuí na AMK asparagin za současného vzniku glykoproteinů (Kodíček, 2007a). Tento proces se u člověka i ostatních eukaryotických organismů odehrává v endoplazmatickém retikulu. Obdobně může docházet k navázání např. lipidových residuí na daný protein, či peptid.

Posttranskripční modifikací rozumíme přeměnu ribonukleové kyseliny (RNA), která se odehrává mezi ději transkripce a translace. V praxi to znamená, že je nejprve vytvořena RNA přepisem z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a po její kompletaci nastává samotná kovalentní modifikace chemickou cestou. Tu pak dělíme podle měnící se části následovně (Kodíček, 2007c):

1. Modifikace AMK obsahující heterocyklické kruhy, přičemž vznikají báze nukleových kyselin, které se v organismech vyskytují pouze zřídka – tyto modifikace je možné pozorovat majoritně u transferové RNA (tRNA);
2. Exkluze (vyseknutí) nekódujících sekvencí z genů – u RNA je známá tato modifikace pod pojmem RNA splicing. Před vysvětlením tohoto děje je nutno si definovat pojem intron, což je nekódující sekvence DNA (ta část genu, která neobsahuje genetickou informaci), podle které se tvoří RNA. Při modifikaci zvané RNA splicing tedy dochází k exkluzi intronů z RNA, za účelem vzniku RNA, která se funkčně podílí na translaci.
3. Přeměna konce řetězce RNA – k tomuto úkonu dochází převážně ve struktuře mediátorové RNA (mRNA) a nazývá se mRNA cap (mRNA čepička). V podstatě jde o navázání guanosinu na mRNA atypickou vazbou, které se účastní tři fosfátové zbytky tvořící tzv. trifosfátový můstek mezi reagujícími molekulami. Pozice vazby, která se u obou residuí nachází v ribosové části na pozici 5, zapříčiňuje schopnost produktu vázat se na ribosom. Vazba také chrání 5'-konec ribosové části mRNA před hydrolytickým štěpením enzymy, které se v buňce nacházejí (Kodíček, 2007d).

Posttranslační modifikace je specifická v kovalentní přeměně proteinu, nebo peptidu až po jeho vytvoření – není tedy zasahováno do tvorby bílkovinných látek tvořených na ribosomu. Dle Kodíčka (2007b), který mimo jiné upozorňuje na záměnu kotranslačních a posttranslačních modifikací, je možno posttranslační modifikace dělit do následujících skupin:

1. Modifikace na postranních řetězcích AMK:
 - a) Oxidace AMK obsahující síru (cystein) za tvorby disulfidických můstků;
 - b) Fosforylace peptidů (proteinů) za vzniku fosforylovaných produktů;
 - c) Hydroxylace AMK (např. prolinu a lysinu – důležitá složka kolagenu);
 - a) Konjugace sacharidových residuí s AMK za tvorby glykoproteinů;
2. Aktivace peptidů (proteinů) řízenou proteolýzou:
 - a) Oštěpení N-terminálního methioninu;
 - b) Odštěpení N-terminálních sekvencí (pre-sekvence a pro-sekvence), které rozhodují o dalších funkcích nově vzniklého peptidu, či proteinu;
3. Připojení prosthetických skupin (např. kyseliny lipoové, biotinu, hemu, pyridoxalfosfátu a jiné) za vzniku látek s velmi specifickou funkcí;
4. Připojení kovových iontů, díky kterému vznikají metaloproteiny.

4.2.3 FUNKCE A FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM BIOLOGICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ

Úlohy bioaktivních peptidů v organismech jsou až nepředstavitelně rozmanité, jelikož ovlivňují nejen jeho vývoj, metabolické pochody a fungování, ale i sociální cítění a chování jednotlivce na základě jeho biologických potřeb. Neméně důležité jsou také bioaktivní peptidy podílející se na imunitní a obranné odpovědi jedince na stresové podmínky, ať už při oxidačním stresu jedince, jeho napadení patogenem nebo také při pocitu nebezpečí (při napadení predátorem). Na tyto situace odpovídá jedinec – prostřednictvím bioaktivních peptidů – aktivací humorální imunity, či lokomocí (Kastin, 2013).

Kupříkladu u člověka se bioaktivní peptidy vyskytují na několika různých místech podle své funkce – v hypotalamu a hypofýze kontrolující správné fungování nervové soustavy a správnou exkreci hormonů (které mohou také obsahovat bioaktivní peptidy), v gastrointestinálním traktu obstarávající správné trávení potravy a zisk živin, v pohlavních orgánech způsobující vznik pohlavních znaků a schopnost se rozmnožovat, v játrech, srdci a jiných tkáních (Wang a de Mejia, 2005).

Hmyzí biologicky aktivní peptidy jsou řazeny do dvou větších skupin zvaných hmyzí antimikrobiální peptidy (AmPs) a hmyzí peptidové hormony (HPHs), přičemž každá ze skupin má svou specifickou úlohu v hmyzím organismu jedince, ale také v celém společenství – pokud se bavíme o sociálním hmyzu. Podrobněji bude AmPs a HPHs pojednáno v následujících kapitolách (viz kapitola 4.3; 4.4).

Hmyzí AmPs zajišťují okamžitou vlastní imunitní odpověď hmyzu při napadení patogenem. Přirozeně se nacházejí v hemolymfě a způsobují sekreci hmyzích humorálních faktorů v hemocytech (buňky hemolymfy – „krve“ hmyzu) a tukovém tělese. Dle Danihlíka *et al.* (2016) je hmyzí vrozená imunita rozložena do tří úrovní: fyzická bariéra jako nejnižší stupeň ochrany, poté imunita zprostředkovávaná buňkami, a nakonec mimobuněčná humorální imunita zahrnující právě AmPs. Při správné funkčnosti všech dříve zmíněných komponent je tedy hmyz, respektive sociální hmyz, dostatečně chráněn před svými přirozenými patogeny.

HPHs navíc zajišťují regulaci metabolických pochodů v pomalejším a dlouhodobějším výhledu než AmPs, které ovlivňují fyzický stav jedince, jeho chování, adaptaci na prostředí a také reakce jedince na stresové podmínky prostředí. Konkrétně řídí např. svlékání a metamorfózu jedince, jeho fyzickou a pohlavní zralost, rozmnožování, schopnost měnit barvu či svalovou kontrakci – mimo jiné při lokomočních pohybech (Goldsworthy *et al.*, 2002a; Kodrík, 2017). Hlavní úlohu v těchto pochodech zajišťuje hmyzí hormonální soustava (Kodrík, 2014).

4.3 Antimikrobiální peptidy

4.3.1 HISTORIE OBJEVU

Objev AmPs je datován do počátku 20. století (rok 1922), kdy sir Alexander Fleming objevil první peptid s biologickou aktivitou v lidském hlenu, který byl později nazván lysozym (Zhang a Gallo, 2016). Pozdější studie ovšem potvrdily jeho mechanismus účinku, který spočívá v enzymatickém rozkladu buněčné stěny patogenů, kdežto antimikrobiální aktivita AmPs není způsobena enzymaticky (Vocaldo *et al.*, 2001; Phoenix *et al.*, 2013). Lysozym tedy nelze považovat za AmP v pravém slova smyslu, nicméně stál jeho objev na počátku obrovského zájmu o studium těchto látek a jejich terapeutického účinku spojeného s antimikrobiální aktivitou. Po objevu lysozymu byly v roce 1939 objeveny peptidy, později nazvané gramicidiny, vykazující biologický účinek vůči Gram pozitivním bakteriím, které mohou být považovány za první objevené AmPs a byly později využity k tvorbě antibiotik (Dubos, 1939; Van Epps, 2006; Phoenix *et al.*, 2013).

V této době nebylo zcela zřejmé, jakým způsobem se brání určité říše organismů – zejména rostliny a hmyz vůči patogenům. Tyto říše totiž postrádají základní znaky získané imunity, která má za úkol zneškodnění cizorodých látek a organismů. Tato skutečnost odstartovala mnoho studií se zaměřením na AmPs u různých druhů rostlin a hmyzu. Za zmínku stojí, že Zeya a Spitznagel (1963) popsali na začátku šedesátých let 20. století AmPs v savcích neutrofilních granulocytech a v roce 1972 byl popsán biologicky aktivní peptid cecropin způsobující v těle jedince *Drosophila melanogaster* silnou imunitní odpověď na přítomnost patogenu *Aerobacter cloacae* (Boman *et al.*, 1972). Největší zájem o studium AmPs podnítila studie skupiny vědců vedených Hansem G. Bomanem z roku 1981 potvrzující přítomnost těchto látek téměř ve všech druzích hmyzu, které byly zkoumány (Pasupuleti *et al.*, 2011). Následujícím milníkem studia AmPs byla práce Zasloffa (1987), jež popisovala novou skupinu AmPs s názvem megaininy. Struktura těchto látek neměla takový význam jako fakt, že byly izolovány z těla žab rodu *Xenopus*, což odstartovalo jejich studium napříč všemi živočišnými říšemi (Pasupuleti *et al.*, 2011), přičemž je v současné době popsáno v Databázi antimikrobiální aktivity a struktury peptidů („The Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides“) množství AmPs přesahující počet 15000 (Pirtskhalava *et al.*, 2021).

Metody použité pro identifikaci, purifikaci a kvantifikaci AmPs byly omezeny dobou, ve které byly prováděny konkrétní studie. V průběhu let byly používány různé typy

elektroforézy – např. zónová elektroforéza (Zeva a Spitznagel, 1963), ke které se postupně přidávaly nově vyvíjené metody, zejména chromatografické (Steiner *et al.*, 1981). S rozvojem techniky došlo k možnosti velmi přesné detekce AmPs pomocí metody hmotnostní spektrometrie (Daníhlík *et al.*, 2014), mimo kterou byly vyvinuty také metody imunochemické sloužící k identifikaci látek na základě jejich vazby s příslušnou protilátkou, kterážto metoda má pro danou molekulu velkou specifitu. Velmi používanou je také v současné době metoda zvaná „Polymerase chain reaction“ (PCR), která umožňuje studium genové exprese AmPs (Daníhlík *et al.*, 2016).

4.3.2 PŮVOD A FUNKCE

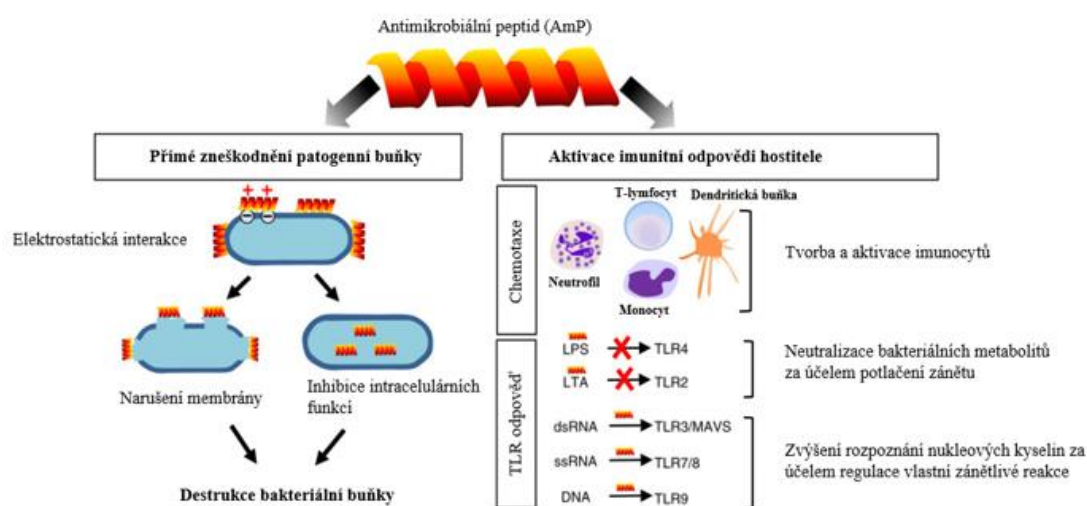
AmPs jsou biomolekuly vyskytující se téměř ve všech organismech. Zde mohou vznikat dvěma způsoby, a to jednak translací, která probíhá v ribosomech, ale také mohou být vytvořeny pomocí neribosomální syntézy. První z výše uvedených způsobů je typický pro většinu organismů, ovšem neribosomální způsob je specifický pro bakterie (Hancock a Chapple, 1999). Takto jsou u vyšších organismů produkovány buňkami hostitele jako odpověď na jeho napadení patogeny, které představují bakterie, kvasinky, mikroskopické houby, ale také rakovinotvorné buňky (Zhang a Gallo, 2016). Přičemž mají schopnost buď zničit tyto patogeny, nebo aktivovat imunitní reakci hostitele, tedy aktivovat patřičné signální dráhy, což vede také ke zničení patogenů. Představují tedy hlavní složku vrozené imunity všech těchto organismů (Mahlapuu *et al.*, 2016).

4.3.3 PRINCIP ÚČINKU

Hancock a Sahl (2006) ve své práci popisují, že schopnost přímého zničení daného patogenu je umožněna amfifilními a kationickými vlastnostmi AmPs, jelikož se na povrchu bakteriálních buněk nachází záporný náboj, který je způsoben přítomností kyselých polymerů – těmito hlavními polymery jsou lipopolysacharidy (LPSs) u Gram-negativních buněk a kyselina lipoteichoová u Gram-pozitivních buněk. Při interakci opačných nábojů poté dochází k hromadění AmPs v blízkosti patogenních buněk. Následně dojde ke kontaktu povrchu buňky a peptidu, který poté přejde do membrány a interaguje s ní (konkrétně s vrchními částmi mastných kyselin, kterými jsou tvořeny fosfolipidy). Membrána je tímto narušena a dochází ke ztrátě důležitých metabolitů a iontů vedoucí ke zničení cizorodého organismu (Yeaman a Yount, 2003). AmPs ovšem také mohou způsobit jen ztenčení této membrány, jelikož mohou být cíleny na konkrétní metabolity a molekuly uvnitř bakteriální buňky. Peptidy tedy projdou do buňky patogenu a napadají nejdůležitější biomakromolekuly a mechanismy – DNA/RNA, proteiny,

syntetické a enzymatické pochody v buňce (Mahlapuu *et al.*, 2016). Důsledkem tohoto působení je také zničení cílené buňky (Obr. 2).

Vedle cílené degradace patogenních buněk mohou AmPs sloužit jako imunomodulátory, tedy molekuly odpovědné za imunitní odpověď organismu. V tomto procesu stimulují např. chemotaxi, diferenciaci buněk schopných fagocytovat patogen a aktivaci získané imunity. Uvedené pochody následně stimulují navazující pochody jako je potlačení Toll-like receptorů (TLRs), produkce prozánětlivých cytokinů a anti-endotoxinových aktivátorů (Obr. 2). Potlačení těchto tří zmíněných mechanismů zabraňuje nadměrné imunitní reakci (včetně sepse), která může být pro organismus velmi škodlivá (Mahlapuu *et al.*, 2016).



Obrázek 2: Schematické znázornění mechanismu zneškodnění bakteriální buňky hostitelem zprostředkované pomocí AmPs (MAVS – mitochondrial antiviral signaling protein; LPS – lipopolysacharid; LTA – lipoteichoová kyselina; TLR – toll-like receptor; dsRNA – double-stranded (dvouvláknová) RNA; ssRNA – single-stranded (jednovláknová) RNA); upraveno z Zhang a Gallo, 2016.

Imunitní reakce zprostředkovaná AmPs probíhá s vysokou specifitou z toho důvodu, aby např. peptidy mající za úkol ničit patogenní buňky člověka nezačaly atakovat buňky těla vlastní. Specifita AmPs je založena na mnoha kritériích. Mahlapuu *et al.* (2016) a Yeaman a Yount (2003) kladou ve svých pracích důraz zejména na rozdílné složení cytoplazmatické membrány, která je obecně u savců bohatá na zwitterionové fosfolipidy způsobující její neutrální náboj. Neméně důležitým důvodem je také rozdílný transmembránový potenciál buněk, přičemž savčí buňka vykazuje potenciál mezi -90 až -110 mV, kdežto bakteriální buňka mezi -130 až -150 mV. Savčí buňky obsahují na rozdíl od bakteriálních také vysoký podíl cholesterolu, který znesnadňuje vazbu AmPs na

membránu. Cholesterol totiž nejen stabilizuje fosfolipidovou dvojvrstvu, ale může také interagovat se samotnými AmPs (Zasloff, 2002).

Při sebemenším porušení signálních drah, které jsou spojeny s expresí AmPs, dochází k méně závažným až k fatálním onemocněním organismu. Tyto onemocnění se projevují nadměrnou expresí AmPs, nebo naopak selháním imunitní odpovědi při jejich nedostatku a souhrnně je nazýváme autoimunitní onemocnění (Zasloff, 2002; Zhang a Gallo, 2016).

4.3.4 CHEMICKÉ SLOŽENÍ A STRUKTURA

AmPs jsou podmnožinou biologicky aktivních peptidů, tudíž se svou strukturou těmto biomolekulám podobají – ale ne doslova. Jedná se o relativně kratší peptidy, které se ale pohybují dle rozdělení jak v oblasti oligopeptidů, tak i polypeptidů, jelikož jsou složeny převážně z 10 až 50 AMK (Hancock a Sahl, 2006; Zhang a Gallo, 2016). Jejich řetězec může ovšem sestávat z počtu blízcímu se 100 AMK (Pasupuleti *et al.*, 2011). Zásadní vlastností AmPs je skutečnost, že obsahují AMK s postranními skupinami způsobující jejich pozitivní náboj (především lysin a arginin), který se pohybuje v rozmezí od +2 do +11 (Yeaman a Yount, 2003; Mahlapuu *et al.*, 2016). Dalším specifickým znakem, který definuje typické vlastnosti AmPs, je až poloviční poměr v zastoupení hydrofobních residuí vzhledem k celému peptidu (Pasupuleti *et al.*, 2011). Vztaženo na rozdíly v sekundární struktuře těchto peptidů, AmPs jsou rozděleny na 3 druhy: helikální (tvořeny α -helixem), peptidy tvořené β -skládaným listem a peptidy s tzv. „random-coil“ strukturou (Nguyen *et al.*, 2011; Pasupuleti *et al.*, 2011; Mahlapuu *et al.*, 2016).

Sekundární struktura helikálních AmPs je podmíněna okolním prostředím. Ve vodném prostředí ztrácí α -helix svou strukturu, jelikož tento typ peptidů je složen z asi 50 % z hydrofobních residuí (Pasupuleti *et al.*, 2011). Při přiblížení a kontaktu s lipidovou membránou ovšem dochází k její interakci s těmito residui, což způsobí znovuoobnovení helikální struktury peptidu. Tento AmP má nyní amfifilní vlastnosti, které jsou závislé právě na vzniklé helikální struktuře – hydrofobní rezidua se nacházejí vně peptidu, tvořící hydrofilní prostředí ve vnitřní části struktury (Gesell *et al.*, 1997).

AmPs, jejichž sekundární struktura je tvořena β -skládaným listem, jsou v kontrastu s helikálními AmPs uspořádanější ve vodném prostředí. Při průniku do membrán cizorodých organismů také, v porovnání s předešlými, nedochází k majoritním změnám v jejich struktuře (Mahlapuu *et al.*, 2016). Mají pevnou a většinou cyklickou strukturu,

kteřá je mimo jiné způsobena disulfidovými můstky (Pasupuleti *et al.*, 2011). Jejich přítomnost souvisí se zachováním stability struktury peptidu (Yeaman a Yount, 2003).

Poslední druh AmPs, v závislosti na rozdělení podle jejich sekundární struktury, představují peptidy s „náhodnou“ či „flexibilní“ strukturou neboli random-coil structure AmPs. Zmíněný druh neobsahuje doposud známé typy sekundárních struktur, jeho typickým znakem je ovšem vyšší obsah AMK prolinu, tryptofanu a argininu, přičemž také nabývá amfifilního charakteru po interakci s lipidovou membránou patogenu (Nguyen *et al.*, 2011). Takahashi *et al.* (2010) ve své práci uvádí, že je tento typ peptidů také mnohdy obohacen o AMK histidin a glycin.

Tyto peptidy mohou být ovšem klasifikovány dle mnoha dalších kritérií, kterými jsou zdroje AmPs, jejich prekurzory, míra intramolekulárních vazeb a mnoho dalších (Yeaman a Yount, 2003).

4.3.5 ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY VČELY MEDONOSNÉ

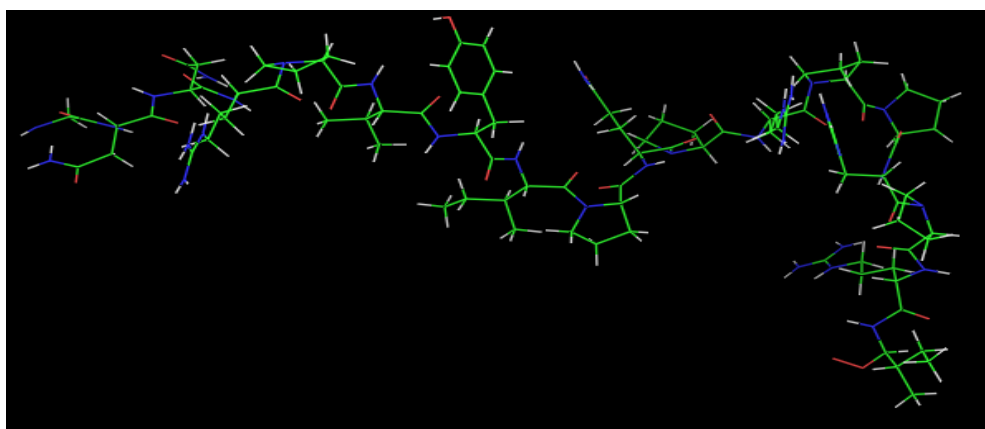
Při porovnání s doposud objevenými AmPs bylo v hemolymfě *Apis mellifera* objeveno pouze malé množství těchto biologicky aktivních látek, pod které spadá 7 konkrétních AmPs: apidaeciny (Ia, Ib a II), abaecin, defensiny (I a II) a hymenoptaecin (Daníhlík *et al.*, 2016; Tab. 2). Míra exprese genů AmPs u *Apis mellifera* je aktivována příslušnými bakteriálními infekcemi, které aktivují signální dráhy pro konkrétní AmPs (Casteels-Josson *et al.*, 1993; Randolt *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2012; Daníhlík *et al.*, 2016).

Tabulka 2: Přehled významných AmPs včely medonosné se zaměřením na uspořádání sekvencí AMK v jejich struktuře; vytvořeno podle: Daníhlík *et al.*, 2016.

Název AmP	Sekvence AMK	Počet AMK
Apidaecin Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	18
Apidaecin Ib	GNNRPVYIPQPRPPHPRL	18
Apidaecin II	GNNRPIYIPQPRPPHPRL	18
Abaecin	YVPLPNVPQPGRRPFPTFPQGQPFNPKIKWPQGY	34
Defensin I	VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEKGVCI CRKTSFKDLWDKRF	51
Defensin II	SVPKVVDGPIYELRQIEEENIEPDTLMDSNEPLLP LRHRRVTCDVLSWQSKWLSINHSACAIRCLAQRKGG SCRNGVCICRK	85
Hymenoptaecin	QERGSIVIQGTKEGKSRPSLDIDYKQRVYDKNGMTGD AYGGLNIRPGQPSRQHAGFEFGKEYKNGFIKGGQSEVQ RGPGRRLSPYFGINGGFRF	93
Jellein I	PFKISIH	8
Jellein II	TPFKISIH	9
Jellein IV	TPFKISIH	8

4.3.5.1 Apidaeciny

Apidaeciny vznikají z jediného prekurzorového proteinu, který je dělen nejprve na polypeptidické řetězce, následně pak na jednotlivé peptidy složené většinou z 18 AMK s vyšším obsahem prolinu (Daníhlík *et al.*, 2016; Tab. 2). Přirozeně se vyskytují 4 formy apidaecinu, ovšem v těle včely jsou přítomny jen 3 – apidaecin Ia, apidaecin Ib a apidaecin II (Obr. 3), jež vznikají z 3 různých prekurzorů mRNA: apidaecin-type 73 (obsahuje apidaecin, apidaecin Ia a Ib) apidaecin-type 22 (obsahuje apidaecin Ia a Ib) a apidaecin-type 14 (obsahuje všechny 3 typy apidaecinu) (Casteels *et al.*, 1989; Daníhlík *et al.*, 2016).



Obrázek 3: Strukturální vzorec apidaecinu Ia se sekvencí AMK: GNNRPVYIPQRPPHPRI; možno porovnat se sekvencí AMK apidaecinu Ib (GNNRPVYIPQRPPHPRL) a apidaecinu II (GNNRPIYIPQRPPHPRL) (Daníhlík *et al.*, 2016); vytvořeno v programu PyMOL.

Apidaeciny vykazují antimikrobiální aktivitu především vůči Gram-negativním bakteriím, přičemž důležitým pro aktivitu nejen apidaecinu, ale i ostatních antimikrobiálních peptidů je složení AMK především na C-konci peptidického řetězce, kdy může jen malá změna ve struktuře vést k rapidnímu poklesu antimikrobiální aktivity těchto peptidů. N-konec pak zajišťuje adaptaci aktivity peptidů na konkrétní bakterie a také schopnost předejít rezistenci bakterie na tento peptid (Czihal a Hoffmann, 2009).

4.3.5.2 Abaecin

Stejně jako apidaeciny je abaecin řazen do skupiny peptidů obsahujících prolin ve vyšším množství. Jeho prekurzorem je peptid obsahující mimo jiné i signální peptid skládající se z 19 AMK. Po odtrhnutí této signální molekuly vzniká AmP abaecin o celkové délce 33 až 34 AMK (Daníhlík *et al.*, 2016; Tab. 2). Xu *et al.* (2009) ve své práci popsali také další formu abaecinu (abaecin II), která se liší od klasické formy složením AMK na sedmé a deváté pozici peptidu – peptid obsahuje na sedmé pozici izoleucin místo valinu

a postrádá glycin na deváté pozici. Tato forma abaecinu byla ovšem identifikována v jiném druhu včely, a sice ve včele východní (*Apis cerana*).

Abaecin je cílen na Gram-pozitivní bakterie. Jeho prekurzor se nachází jak u dospělých, tak u mladých jedinců v hemolymfě a při napadení těmito bakteriemi dochází k jeho aktivaci a sekreci v tukovém tělese (Casteels *et al.*, 1990; Danihlík *et al.*, 2016).

4.3.5.3 Defensiny

Jedná se bioaktivní peptidy bohaté na AMK cystein. Obě izoformy defensinu I jsou složeny z 51 AMK, přičemž obsahují 6 cysteinových reziduí, které spolu tvoří 3 disulfidické můstky. Defensin I, známý také jako royalisin, se od své druhé izoformy liší v uspořádání AMK – oproti royalisinu obsahujícímu na 50. místě C-konce trosin, obsahuje tato izoforma na daném místě arginin. Defensin II je pak složen ze sekvence 85 AMK (Danihlík *et al.*, 2016; Tab. 2).

Za jejich expresi jsou zodpovědné 2 alely (Evans *et al.*, 2006). Tyto alely jsou exprimovány v závislosti na rozdílných stresových podmínkách včel. Geny pro tvorbu defensinů jsou v těle *Apis mellifera* exprimovány při jeho vystavení LPS, což vede k jejich tvorbě v mateří kašičce a hemolymfě – např. při propuknutí bakteriální infekce (Richard *et al.*, 2012).

4.3.5.4 Hymenoptaecin

Hymenoptaecin je včelí 93 AMK dlouhý AmP (Tab. 2) vyskytující se ve zvýšeném množství při indikaci bakteriální infekce u mladých i dospělých jedinců. Genová exprese tohoto AmP je dle Chana *et al.* (2006) signifikantně snížena u larev *Apis mellifera* oproti dospělým včelám (královna, dělnice, trubci). Je produkován za účelem obrany hostitele vůči Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (Danihlík *et al.*, 2016).

Ve studii Xu *et al.* (2009) byla popsána diference v obsahu různých typů hymenoptaecinů v těle *Apis mellifera* a *Apis cerana*, přičemž bylo zjištěno, že druhý z uvedených druhů obsahuje 13 různých typů hymenoptaecinu, kdežto první pouze 1 typ. Tato skutečnost je vysvětlena rozdílnou mírou domestikace jednotlivých druhů v průběhu let, kterážto má negativní vliv na diverzitu imunity včelstev.

4.3.5.5 Další významné antimikrobiální peptidy u včel

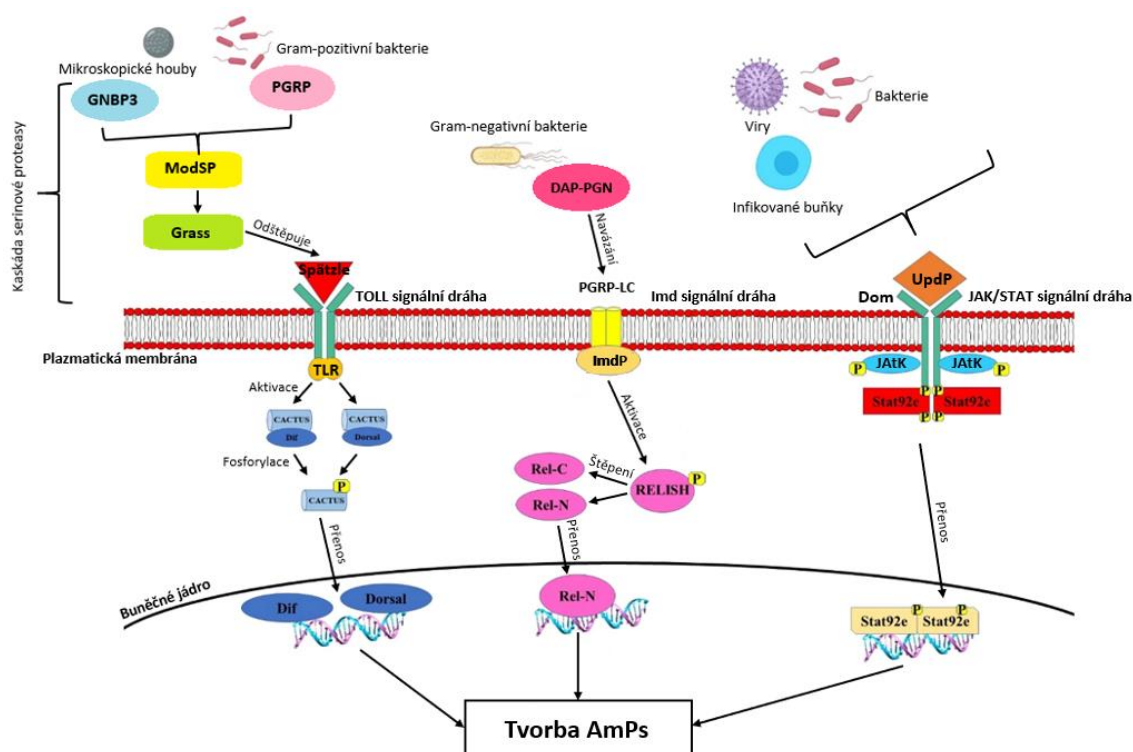
V mateří kašičce se nachází také AmPs zvané jelleiny, které existují ve čtyřech izoformách (jelleiny 1, 2, 3, 4 – Tab. 2). Jsou nejprve produkovány dělnicemi, které následně obohacují mateří kašičku o tyto peptidické molekuly, které také napomáhají aktivaci imunitní odpovědi na cizorodé komponenty u včel – vykazují antimikrobiální aktivitu vůči Gram-pozitivní i Gram-negativním bakteriím a kvasinkám (Daníhlík *et al.*, 2016). Nicméně 4. izoforma jelleinu ve studii Fontana *et al.* (2004) tuto aktivitu nevykazovala. Po prozkoumání struktury bylo zjištěno, že tento typ jelleinu neobsahuje na svém C-konci AMK leucin (Tab. 2), jenž je v tomto případě hlavní komponentou pro vykazování antimikrobiální aktivity daného peptidu (Romanelli *et al.*, 2011).

Dalším významné AmPs se nacházejí ve včelím jedu. Apitoxin je totiž složen z několika látek, mezi které patří jeho hlavní komponenta melittin (40 až 50 % apitoxinu), apamin, adolapin a peptid působící degranulaci mastocytů (de Lima a Bronchetto-Braga, 2003). Melittin sestává z 26 AMK a účinkuje proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím – citlivější na melittin jsou však Gram-pozitivní bakterie (Fennell *et al.*, 1968). Jiná složka apitoxinu, apamin, který je složen z 18 AMK, působí ostatním živočichům neurotoxické potíže (Baracchi *et al.*, 2011). Obsah jednotlivých složek včelího jedu se liší v závislosti na věku dělnic (de Lima a Bronchetto-Braga, 2003).

4.3.6 BUNĚČNÉ SIGNÁLNÍ DRÁHY ZAPOJENÉ V REGULACI ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ

Při porovnání genů zodpovědných za vyvolání imunitní reakce při stresových podmínkách u jednotlivých druhů hmyzu bylo zjištěno, že včela medonosná obsahuje v genomu v porovnání s hmyzem z rodu *Drosophila* či *Anopheles* asi o 65 % méně těchto genů (Evans *et al.*, 2006). Expresi AmPs regulují signální dráhy (Obr. 4): signální dráha Toll spojená s TLRs, poté IMD-JNK, která dostala svůj název podle mutace genu způsobující imunitní deficienci (Lemaître *et al.*, 1995) a JAK/STAT nazvána podle Janus kinas, které mají za úkol fosforylovat proteiny se společným názvem Signal Transducer and Activator of Transcription – tedy STAT (Kisseleva *et al.*, 2002; Daníhlík *et al.*, 2016).

Většina znalostí o signálních drahách spojených s hladinou AmPs u včel ovšem nevychází ze studií zaměřujících se na danou problematiku v rámci tohoto rodu, nýbrž u homologních genových sekvencích jiných rodů hmyzu, jako jsou *Drosophila*, *Anopheles* a *Tineola* (Evans *et al.*, 2006).



Obrázek 4: Schematické znázornění mechanismů buněčných signálních drah zapojených v regulaci antimikrobiálních peptidů (AmPs) (GNBP3 – Gram-negative binding protein 3; PGRP – peptidoglycan recognition protein; ModSP – serine protease-like protein (EC 3.4.21.-); Grass – serine protease grass (EC 3.4.21.-); Spätzle – molekula proteinové povahy podobající se cytokinu; TLR – toll-like receptor; CACTUS – nukleární transkripční faktor kappa B = NF- κ B; Dif – Dorsal-related immune factor; Dorsal – transkripční faktor; DAP-PGN – peptidoglykan obsahující kyselinu diaminopimelovou ; PGRP-LC – peptidoglycan recognition protein LC; ImdP – immune deficiency protein; RELISH – transkripční faktor; Rel-C a Rel-N – fragmenty transkripčního faktoru RELISH; Dom – cytokinový receptor Domeless; UpdP – unpaired protein; JatK – Janus-tyrosinkinasa; Stat92e – transkripční faktor); upraveno z Manniello *et al.*, 2021.

4.3.6.1 Toll signální dráha

Tato signální dráha je spolu s TLRs spojena nejen s imunitní odpovědí hmyzu, ale i se samotným vývojem jedince (Beutler, 2004). Obranný mechanismus startuje rozpoznání cizorodých částic či organismů, kdy je spuštěna konkrétně v těle octomilky (*Drosophila melanogaster*) kaskáda serinové proteasy (EC 3.4.21.-) působící na molekulu proteinové povahy podobající se cytokinu (tzv. „Spätzle“) (Shia *et al.*, 2009). Při interakci molekuly „Spätzle“ s transmembránovým TLR nacházejícím se vně buňky dochází k aktivaci Toll signální dráhy. Spätzle-related proteiny jsou kódovány v genomu octomilky. Předpokládá se, že Spätzle-related proteiny mají následně sloužit jako ligandy jejím TLRs (Evans *et al.*, 2006). Změny v konformaci nyní aktivovaného receptoru způsobí uvnitř buňky vznik receptorového komplexu, který je tvořen pomocí tzv. „death-domain“ (DD). V závislosti

na vzniku tohoto komplexu je spuštěna degradace inhibitoru nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NF- κ B) – nazývaného také CACTUS – a translokace samotného nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NF- κ B) do jádra buňky. NF- κ B má tři homology označované jako Dorsal-related immune factor (Dif), Dorsal (D1) a RELISH (reguluje IMD signální dráhu – viz kapitola 4.3.6.2), které se však vyskytují pouze u rodu *Drosophila* (Royet *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Obr. 4).

V těle hmyzu z rodu *Anopheles* (a pravděpodobně i u *Apis mellifera*) se nachází molekuly alternativní k faktoru D1 a RELISH nazvané REL 1 a REL 2, které jsou svázaný s proteiny Tollip, Pellino, Cactin a faktor 2 spojený s tumor-necrosis-factor receptorem (TRAF-2) (Shin *et al.*, 2005). Tyto 4 proteiny se nacházejí uvnitř buňky a jsou pro celou signální dráhu klíčové, jelikož stojí na počátku tvorby a sekrece AmPs (Evans *et al.*, 2006). Toll signální dráha reguluje expresi genů zodpovědných za tvorbu peptidů především ze skupiny defensinů, ovšem není vyloučena korelace mezi jednotlivými drahami a mezi jednotlivými geny AmPs – míra genové exprese defensinů souvisí také s mírou genové exprese hymenoptaecinu (Daníhlík *et al.*, 2016); pomocí transkripčního faktoru Dorsal je regulována exprese genu zodpovědného za tvorbu abaecinu (Lourenço *et al.*, 2013).

4.3.6.2 IMD-JNK signální dráha

IMD-JNK signální dráha není výlučně spojena se samotným vývojem jedince. IMD gen a LC-protein rozpoznávající peptidoglykan (peptidoglycan-recognition protein LC – PGRP-LC) představují velmi důležité molekuly pro aktivaci signalizace v těle octomilky (Hultmark, 2003). AmPs jsou zde následně transkribovány v závislosti na specifikaci patogenu, který daného jedince napadl, prostřednictvím transkripčního faktoru RELISH, jenž je analogem NF- κ B (Evans *et al.*, 2006; Obr. 4). IMD-JNK signální dráha je totiž dle Wenera *et al.* (2003) cílena především na Gram-negativní bakterie. Ovšem Gram-pozitivní bakterie, které mají v peptidoglykanu zakomponovanou kyselinu diaminopimelovou, také aktivují tuto dráhu. Vůči jiným Gram-pozitivním bakteriím a mikroskopickým houbám vykazuje tato dráha ne tak velkou specifitu (Evans *et al.*, 2006). Specifita signální dráhy je způsobena PGRP-LC, respektive jeho třemi různými formami, které obsahují lehce odlišné domény. Tyto domény jsou poté specifické k odlišným typům peptidoglykanu, což má za následek pokrytí širšího spektra mikrobů (Werner *et al.*, 2003).

Uvedený název IMD-JNK signalizuje, že IMD signální dráha nejen aktivuje výše zmíněný transkripční faktor RELISH, ale i kooperuje se signální dráhou c-Jun N-terminálních kinas (EC 2.7.11.24; JNKs), jejíž prostřednictvím může být také aktivována či inhibována transkripce AmPs (Boutros *et al.*, 2002).

V těle *Apis mellifera* jsou obsaženy analogické komponenty IMD-JNK signální dráhy, což vede k předpokladu, že se tato signalizace velmi podobá signalizaci octomilek (Evans *et al.*, 2006). Signalizace souvisí s transkripcí AmPs defensinů, a tedy i hymenoptaecinu (stejně jako u Toll signální dráhy). Transkripční faktor RELISH také ovlivňuje expresi genu AmP abaecinu (Lourenço *et al.*, 2013).

4.3.6.3 JAK/STAT signální dráha

Podle práce Agaisse a Perrimona (2004) je JAK/STAT signální dráha nedílnou součástí vrozené imunity hmyzu rodu *Drosophila* a jejím hlavním úkolem je aktivace komplementu a complement-like faktorů, což mimo jiné zahrnuje i zvýšení proliferace hemocytů a jejich schopnost fagocytovat cizorodé komponenty. Aktivátorem této signální dráhy je tzv. „unpaired (Upd) protein“, který je glykosylován. Jejím prostřednictvím tedy dochází k obraně jedince vůči mikrobům i virům (Evans *et al.*, 2006). Nicméně má také vliv na expresi Turandot-related (Tot) genů, které umožňují reagovat jedinci na stresové podmínky (Agaisse *et al.*, 2003; Obr. 4).

U rodu *Apis* bylo pozorováno podobné složení komponent signální dráhy JAK/STAT, které zahrnuje konkrétně u *Apis mellifera* cytokinový receptor Domeless (Dom). Dom receptor je ovlivňován aktivátory Janus-tyrosinkinasa (EC 2.7.11.24; JAtK), transkripční faktor STAT92E) a inhibitory (suppressor of cytokine signalling – SOCS, protein inhibitor of activated STAT – PIAS) (Baeg, 2005; Evans *et al.*, 2006). Tím pádem je, i přes nepřítomnost Upd proteinu a Tot-faktorů u včely medonosné, předpokládán velmi podobný způsob JAK/STAT signalizace nejen mezi rody *Drosophila* a *Apis*, ale i mezi ostatními hmyzími rody (Evans *et al.*, 2006).

V závislosti na odpovědi na stresové podmínky, které byly vyvolány injekcí LPS či fosfátového pufru, a také na zranění u různých rodů hmyzu bylo odhaleno, že jsou s JAK/STAT signální dráhou spojeny hmyzí AmPs apidaeciny, abaecin, defensiny a hymenoptaecin (Choi *et al.*, 2008; Erler *et al.*, 2011, Danihlák *et al.*, 2016).

4.4 Hmyzí peptidové hormony

4.4.1 HISTORIE OBJEVU

První známý záznam o HPHs je dochován z roku 1922 (Konopińska *et al.*, 1992). V uvedeném roce totiž došlo při studii neuroendokrinní soustavy hmyzu rodu *Lymantria* k objevu doposud neznámé biomakromolekuly, o které bylo vypořádováno, že svou sekrecí z oblasti cerebrálního ganglionu do hemolymfy spouští proces metamorfózy u tohoto jedince (Kopeć, 1922). Do roku 1984 bylo známých velmi málo HPHs spolu s jejich sekvencemi AMK, ovšem s postupným vývojem nových metod docházelo k objasnění fungování hmyzího hormonálního systému spolu s objevem mnoha dalších hormonů (Konopińska *et al.*, 1992).

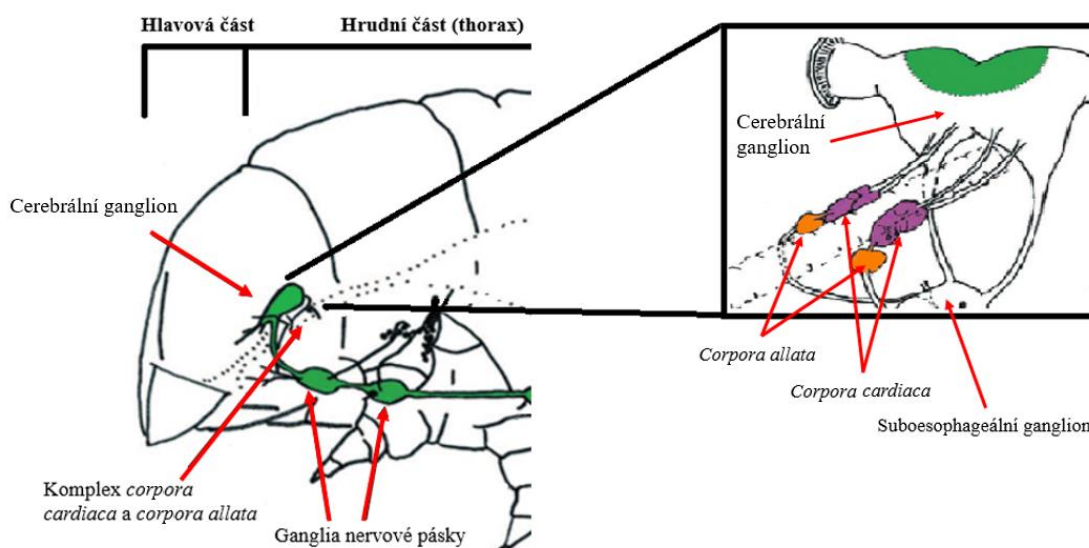
Za pomoci analogických metod jako při identifikaci, purifikaci a kvantifikaci nových AmPs bylo objeveno obrovské množství doposud neznámých HPHs. Oproti roku 1984, ve němž byly známy přibližně 4 HPHs a jejich struktura (Konopińska *et al.*, 1992), je dnes známo asi 50 různých skupin těchto hormonů vyskytujících se u více než 400 různých hmyzích druhů (Yeoh *et al.*, 2017), které byly podle svých prekurzorů, struktur a lokace působení rozděleny do tří obsáhlých skupin (viz kapitola 4.4.2).

4.4.2 PŮVOD A FUNKCE

Hormony obsažené v těle hmyzu obecně souvisí s metabolismem lipidů. Ty jsou ukládány v tukovém tělese hmyzu a mají za úkol distribuovat energii do cílových míst těla jedince, kde dochází k jejich transformaci na energii využitelnou mnoha způsoby. Kodrík (2017) a Toprak (2020) dělí ve svých pracích doposud identifikované hmyzí hormony podle struktury jejich prekurzorů na tři velké skupiny. Ekdysteroidy představují první skupinu hmyzích hormonů. Jejich základ tvoří cholesterol nebo rostlinné steroidy. Druhou skupinou hmyzích hormonů jsou juvenilní hormony, které mohou být zařazeny z chemického hlediska do terpenoidních látek mající podobnou strukturu jako farnesol. Tyto dvě podmnožiny hmyzích hormonů mimo metabolismus lipidů ovlivňují nepřímo např. svlékání, metamorfózu, rozmnožování a dospělost jedince (Toprak, 2020).

Nicméně je v této práci věnována největší pozornost třetí a poslední skupině hormonů u hmyzu. Nese název hmyzí peptidické neurohormony, je ovšem také známá pod označením HPHs, přičemž jsou tvořeny v několika různých endokrinních centrech hmyzu. Hlavním centrem je neurosekretorický systém cerebrálního ganglionu konjugovaný žlázami *corpora cardiaca* a *corpora allata* (Obr. 5). Dalšími centry jsou

následně neurosekretorické buňky nacházející se v jiných gangliích, pohlavních žlázách, v endokrinních buňkách střeva a jiných žlázách – jedná se o jiné samostatné endokrinní žlázy, které jsou také schopné sekrece hormonů (Kodrík, 2014). S HPHs jsou spojeny, kromě zpracování lipidů, životně důležité funkce jedince, kterými jsou např. reprodukce, postnatální vývoj, růst a svlékání, trávení, produkce jiných hormonů a jeho chování (Toprak, 2020; Kodrík 2017; Hou *et al.*, 2017). Při porovnání HPHs a lidských peptidových hormonů je také možno pozorovat, jak velký vliv mají příslušné biomolekuly na fungování celého hmyzího organismu. V těle hmyzu bylo totiž identifikováno ne méně než 100 peptidických hormonů, kdežto v lidském těle se nacházejí pouze 2 biomolekuly, které můžeme právem nazývat peptidické neurohormony, a to vasopresin a oxytocin (Kodrík, 2017).



Obrázek 5: Neuroendokrinní soustava hmyzu – schematické znázornění se zaměřením na komplex cerebrálního ganglionu s *corpora cardiaca* a *corpora allata*; upraveno z Kodrík, 2014.

4.4.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ JEDNOTLIVÝCH ZÁSTUPCŮ A PRINCIP JEJICH ÚČINKU

Peptidové hormony obsažené v těle hmyzu mohou být rozděleny do konkrétních podskupin a zástupců, které poté disponují specifickými vlastnostmi. Jejich jednotliví zástupci se liší jak ve své chemické struktuře a účincích v cílových místech působení, tak v rozdílné tvorbě a metabolismu těchto látek. Ovlivňují samotný metabolismus lipidů, dále pak biologické události spojené s životním cyklem jedince a stresovými podmínkami, a nakonec obranu a bojeschopnost jedince vůči škůdcům a patogenům (Toprak, 2020). Podskupin a zástupců HPHs je mnoho (Yeoh *et al.*, 2017), ovšem hlavními jsou: AKHs, peptidové hormony podobné insulinu (insulin-like peptides – ILPs), hormon způsobující diapauzu a také aktivaci biosyntézy hmyzích

feromonů (diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide – DH-PBAN), neuropeptid F (NPF), krátký neuropeptid F (short neuropeptide F – sNPF), allatostatin-A (AstA), corazonin (Crz), leukokinin (Lk), CCH-amid-2 (CCHa2), tachykininy (Tks), cytokiny (adipokiny) (Cyks) a limostatin (Lst) (Toprak, 2020). Souhrnný přehled doposud zjištěných informací o HPHs je uveden v tabulce (Tab. 3a, 3b).

Tabulka 3a: Přehled nejdůležitějších HPHs a současných poznatků s nimi spojených (část první); vytvořeno podle: Toprak, 2020.

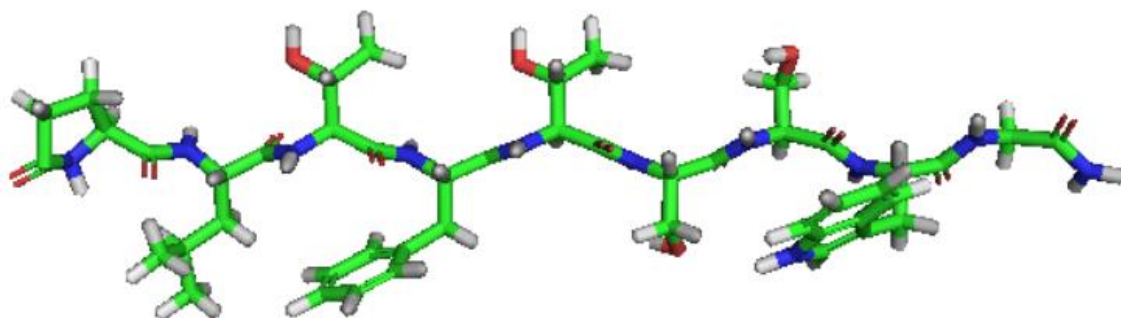
Název	Hlavní tkáň zodpovědná za syntézu	Další tkáně, ve kterých probíhá syntéza	Velikost (rod <i>Drosophila</i> výjimka: DH-PBAN)	Fyziologická funkce	Vliv na metabolismus lipidů
AKH	<i>Corpora cardiaca</i>	Ganglie ve vaječnicích; střeva; tukové těleso; svaly	79 AMK (aktivní peptid: 8-10 AMK)	Tlukot srdce; svalový stah; lokomoce; imunitní odpověď organismu; obrana vůči oxidačnímu stresu; mobilizace lipidů za účelem rozmnožování, letu, diapauzy a hladovění	Lipolýza
ILP2	IPCs	Střeva; slinné žlázy	137 AMK	Regulace metabolismu sacharidů; inhibice aktivity foxO; rozmnožování; akumulace lipidů v závislosti na přípravě na diapauzu	Lipogeneze
ILP6	Tukové těleso	Slinné žlázy; srdce; neuroglie	107 AMK	Inhibice ILPs v cerebrálním ganglionu; aktivace příjmu nadbytku lipidů; vytvoření tolerance na hladovění	Lipolýza
DH-PBAN	Neuroendokrinní buňky subesofageálního ganglionu	–	192 AMK (rod <i>Bombyx</i>); 194 AMK (rod <i>Helicoverpa</i>)	Aktivace diapauzy; aktivace fosforylace ERK	Lipogeneze
sNPF	Laterální buňky cerebrálního ganglionu	Střeva; tykadla; vaječnícíky; Malpighiho trubice	281 AMK (aktivní peptid: 6-19 AMK)	Regulace krmení; regulace lokomoce a denního rytmu; kontrola sekrece hormonů; čichové impulzy; stimulace vývoje vaječníků	Lipogeneze
NPF	Cerebrální ganglion	Subesofageální ganglion; střeva	102 AMK (aktivní peptid: menší a rovno 28 AMK)	Regulace chování spojeného s krmením a výběrem jídla; bdělost; rozmnožování; inhibice aktivity Ast-A	Lipolýza
Ast-A	Cerebrální ganglion	Střeva	151 AMK	Inhibice chování spojeného s krmením, které nastává při hladovění; regulace AKH a ILP signalizace	Lipolýza

Tabulka 3b: Přehled nejdůležitějších HPHs a současných poznatků s nimi spojených (část druhá); vytvořeno podle: Toprak, 2020.

Název	Hlavní tkáň zodpovědná za syntézu	Další tkáň, ve kterých probíhá syntéza	Velikost (rod <i>Drosophila</i> výjimka: DH-PBAN)	Fyziologická funkce	Vliv na metabolismus lipidů
Crz	Laterální buňky cerebrálního ganglionu	–	154 AMK (aktivní peptid: 11 AMK)	Činnost srdce; regulace svlékání a melanizace; pohlavní spojení jedinců a přenos spermatu; regulace metabolismu ethanolu a aktivace příjmu potravy	Lipolýza (při hladovění)
Lk	Cerebrální ganglion; ventrální IPCs; ventrální ganglie	–	160 AMK (aktivní peptid: 6-15 AMK)	Regulace hospodaření s vodou a ionty v Malpighiho trubicích; regulace krmení, velikosti porcí a chování spojeného s krmením; lokomoce a kontrakce svalů	Lipolýza (při hladovění)
CCH a2	Tukové těleso; střeva	–	136 AMK	Aktivace insulinové signalizace; stimulace krmení	Lipogeneze
Tk	Střeva	Centrální nervový systém	297 AMK	Lokomoce; čichová odpověď; homeostáza střev; inhibice insulinové signalizace a ukládání lipidů	Lipolýza
UPD1	Cerebrální ganglion	–	413 AMK	Signalizace pocitu sytosti; aktivace exkrece insulinu	–
UPD2	Tukové těleso	–	406 AMK	Signalizace pocitu sytosti; aktivace exkrece insulinu	Lipogeneze v adipózní tkáni; lipolýza v ocnocytech
Lst	<i>Corpora cardiaca</i>	Tukové těleso	139 AMK	Inhibice exkrece insulinu	Lipolýza

4.4.3.1 Adipokinetické hormony (AKHs)

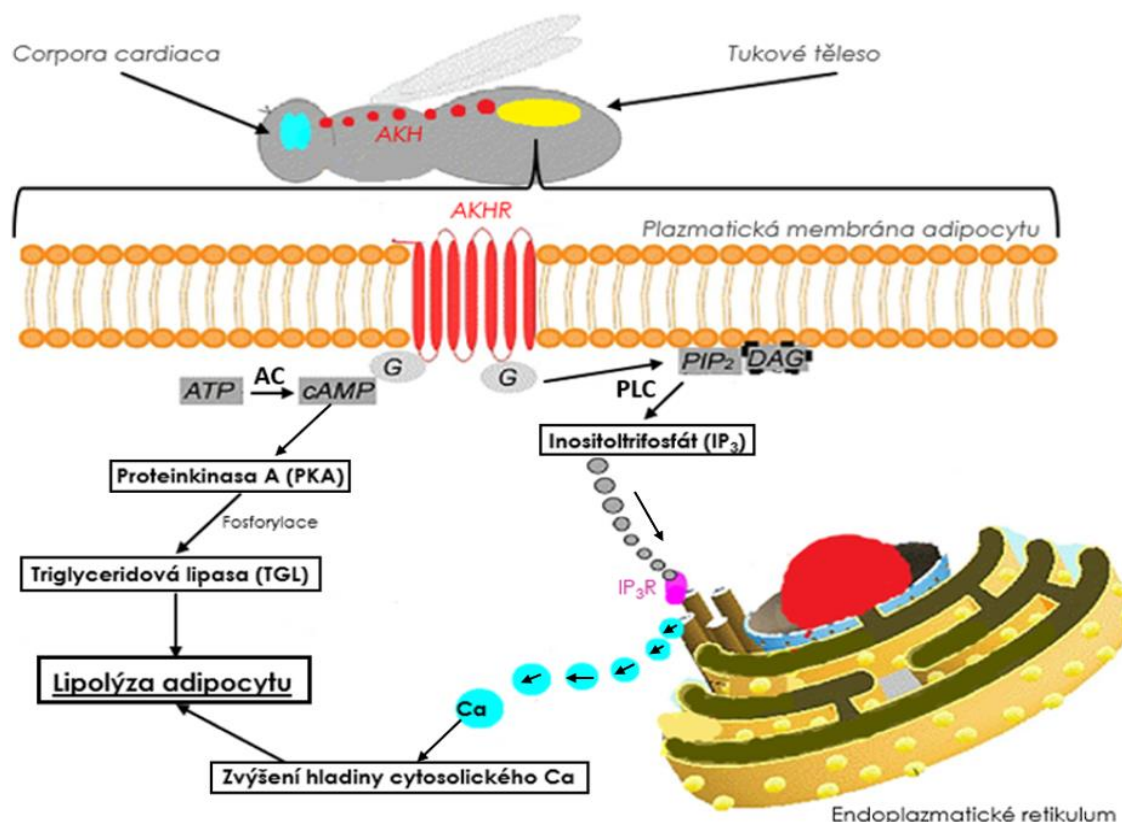
Tvoří skupinu biologicky aktivních peptidů, které vykazují určitou podobnost s glukagonem a jsou primárně (ne však výlučně) produkovány neurosekretorickými buňkami žlázy *corpora cardiaca* (Goldsworthy *et al.*, 1997). Další ganglie spojené s produkcí AKHs jsou lokalizovány ve svalech, tukovém tělese, vaječnicích, střevech, ale také např. v semenných váčcích hmyzu (Kaufmann *et al.*, 2009). Doposud bylo popsáno kolem 60 lišicích se AKHs u různých druhů hmyzu (Toprak, 2020). Jejich vznik je založen nejprve na syntéze preprohormonu – známého také jako peptid podobný prekurzoru AKH (AKH precursor-related peptide, či APRP) – složeného ze samotného bioaktivního neuropeptidu, peptidu přidruženému k AKH a z hydrofobního signálního peptidu, přičemž je celý preprohormon (pro rod *Drosophila* složen ze sekvence 79 AMK; Tab. 3a) nejprve syntetizován a až následnou kotranslační modifikací dojde k odtržení prohormonu AKH (Van der Horst, 2003; Oudejans *et al.*, 1999). Ten je uložen v *corpora cardiaca* a v případě potřeby je aktivován sekrecí do hemolymfy, kdy dojde k jeho rozštěpení na samotný AKH (Oudejans *et al.*, 1999). Takto vzniklý neurohormon se obvykle skládá z 8 až 10 AMK a je na obou koncích blokován – C-konec peptidu je blokován amidem a N-konec je blokován kyselinou pyroglutamovou (Gäde *et al.*, 1997; Kodrík, 2017; Obr. 6). Typickým znakem je také přítomnost aromatických AMK na pozicích 4 a 8 a přítomnost glycinu na pozici 9 v peptidickém řetězci (Gäde *et al.*, 1997). Při přihlédnutí k faktu, že mohou existovat až 3 různé AKHs v těle jednoho živočicha (Oudejans *et al.*, 1993), není překvapením, že jsou tyto molekuly spojeny s širokým spektrem pochodů v těle jedince – ovlivňují lokomoci a s ní spojenou kontrakci svalů (O'Shea *et al.*, 1984; Socha *et al.*, 1999), nervovou signalizaci (Toprak, 2020), mají pozitivní vliv na kontrakci srdečního svalu (Scarborough *et al.*, 1984), imunitu organismu (Goldsworthy *et al.*, 2002b) a jeho vyrovnání se s oxidačním stresem (Bednářová *et al.*, 2013).



Obrázek 6: Strukturální vzorec AKH *Apis mellifera* (*Apm*-AKH) se sekvencí AMK: pELTFTSSWG-NH₂ (Audsley a Weaver, 2006; Kodrík, 2017); vytvořeno v programu PyMOL.

Nicméně stálým hlavním úkolem AKHs v těle hmyzu je aktivace, přesun a spotřeba lipidů (v menší míře i sacharidů) uložených v tukovém tělese, což zahrnuje značně složité procesy (Toprak, 2020). Na začátku procesu stojí tvorba a ukládání AKH, jak již bylo výše zmíněno. Následně může docházet v organismu k jeho aktivaci, která je spuštěna různorodými stresory. Při exkreci AKH dojde jeho prostřednictvím k mobilizaci lipidů, konkrétněji triacylglycerolů, či triglyceridů (TAGs), která probíhá aktivací triglyceridové lipasy (EC 3.1.1.-; TGL) (Grönke *et al.*, 2005). K tomuto procesu může dojít také jinou cestou, a to prostřednictvím aktivace tzv. brummer lipasy (EC 3.1.1.3; bmmL), která je strukturně příbuzná savčí adipózní triglyceridové lipase (EC 3.1.1.3; adipose triglyceride lipase, ATGL) (Arrese a Soulages, 2010). TGL a bmmL se ovšem značně liší v principu svého účinku – TGL spojená s AKH reaguje pouze na potřebu velkého množství lipidů, kdežto bmmL má schopnost regulovat množství lipidů, aby nedošlo k jejich snížení pod hladinu potřebnou pro zachování metabolických pochodů v těle jedince (Grönke *et al.*, 2007). AKHs stojí na počátku celé kaskády degradace lipidů a ovlivňují ji prostřednictvím signální transdukce (Canavoso a Wells, 2001; Toprak, 2020). Nejprve se AKH naváže na příslušný receptor spřažený s G-proteinem (G-protein-coupled receptor, GPCR), což je receptor adipokinetického hormonu (adipokinetik hormone receptor, AKHR) (Toprak, 2020). AKHR je podobný savčímu receptoru konjugovanému s hormonem uvolňujícím gonadotropin a je také produkován primárně v tukovém tělese (Lindemans *et al.*, 2009; Arrese a Soulages, 2010). Spojení AKH a jeho receptoru aktivuje sekreci 2 různých druhých posílů, kteří ovlivňují 2 rozdílné metabolické systémy (Park *et al.*, 2002, Toprak 2020).

V dráze, ve které figuruje fosfolipasa C (EC 3.1.4.3; PLC) dochází po konjugaci AKH s AKHR k její aktivaci, což má za následek odštěpení jednak diacylglycerolu (DAG), ale hlavně inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃) z fosfatidylinositol-4,5-difosfátu (PIP₂) uloženého v buněčné membráně (Toprak, 2020). Vzniklý IP₃ se poté váže na svůj receptor (IP₃R), který v místě své lokalizace a působení – tedy v endoplazmatickém retikulu – ovlivňuje mobilizaci a sekreci vápenatých kationtů do cytosolu buňky (Gäde a Auerswald, 2003). Finální krok této dráhy není doposud zcela přesně známý, ovšem je předpokládáno, že navýšení vápenatých kationtů v cytosolickém prostoru buňky vede k mobilizaci lipidů, a dokončuje tedy celou kaskádu přenosu signálu z AKH způsobující lipolýzu (Arrese *et al.*, 1999; Obr. 7).



Obrázek 7: Schéma účinku AKH v těle hmyzu – modelový rod *Drosophila* (AKH – adipokinetický hormon; G – G protein; AKHR – receptor AKH spřažený s G proteinem; PLC – fosfolipasa C; AC – adenylátcyklasa; ATP – adenosintrifosfát; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; IP₃R – receptor IP₃; DAG – diacylglycerol; PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát; Ca – vápenaté kationty); upraveno z Toprak, 2020.

Alternativou je kaskáda, při níž na počátku dochází k aktivaci enzymu adenylátcyklasa (EC 4.6.1.1; AC) prostřednictvím navázání AKH na svůj receptor, přičemž dochází k přeměně adenosinmonofosfátu (AMP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Vzniklý cAMP je spřažen s enzymem zvaným cAMP-dependentní proteinkinasa A (EC 2.7.11.24; PKA), který je schopen katalyzovat fosforylaci lipidových kapiček (adiposomy), TGL a proteinu perilipin 1 (PLIN1) (Arrese *et al.*, 1999). Následně dochází ke spolupráci zmíněných tří produktů při lipolýze, jelikož je míra mobilizace lipidů ovlivněna přístupností lipidových kapiček pro TGL. Tato přístupnost je pak závislá na množství fosforylovaného PLIN1 (Beller *et al.*, 2010; Toprak, 2020; Obr. 7).

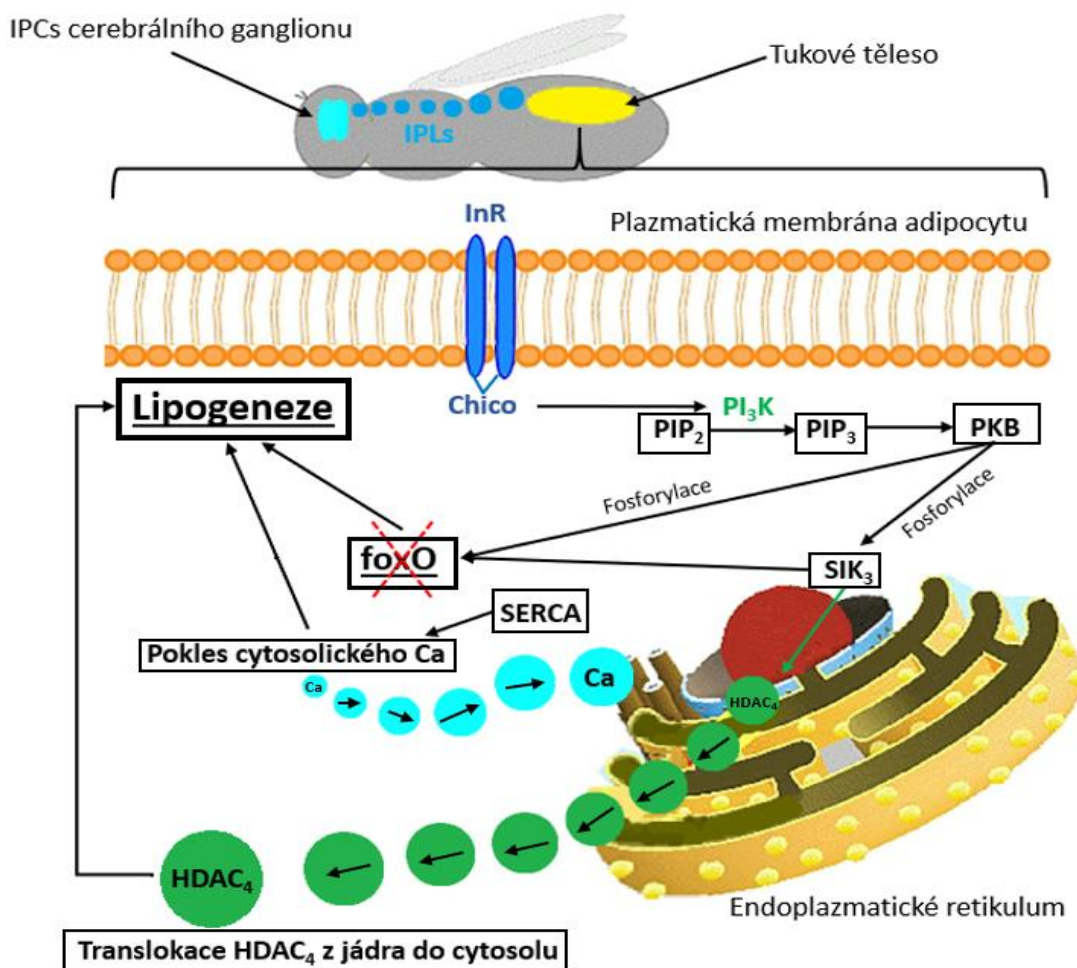
4.4.3.2 Peptidové hormony podobné insulinu (ILPs)

Jak uvádí název, lze srovnávat ILPs se savčím insulinem. Míra tvorby a exkrece těchto látek je tedy ovlivněna hladinou sacharidů v hemolymfě hmyzu, přičemž stejně jako u savců dochází k jejich inhibici při hladovění a k jejich aktivaci při nadbytku energie, respektive sacharidů (Wu a Brown, 2006). Jejich úlohou je ukládání přebytečné energie

do formy, která může být využita později při nepříznivých podmínkách – do lipidů (Choi *et al.*, 2015). Konkrétní procesy ve hmyzím těle, které jsou na ILPs závislé (a tedy ovlivněné přísunem živin), jsou odpovědi jedince na stresové podmínky, jeho rozmnožování, růst a také životní cyklus (Toprak, 2020). Hlavní části těla hmyzu, ve kterých jsou ILPs produkovány, jsou neurosekretorické buňky (také insulin produkující buňky, IPCs) cerebrálního ganglionu a žlázy *corpora cardiaca* (Ikeya *et al.*, 2002). Jak již bylo výše zmíněno, mohou být do produkce příslušných HPHs zapojeny i neurosekretorické buňky nacházející se v jiných částech těla jedince. Produkce ILPs je nadto ovlivňována také tukovým tělesem, konkrétně Target of Rapamycin, či TOR signální dráhou (Géminard *et al.*, 2009). Chemická struktura těchto bioaktivních peptidů vykazuje velmi podobné znaky jako insuliny identifikované ze savčích jedinců (Tab. 3a) – ať už se jedná o sekvenci jednotlivých AMK, lokaci jejich specifických residuí (např. cystein) nebo podobná chemická struktura jejich prekurzorů (Grönke *et al.*, 2010; Nässel a Broeck, 2015). Od objevu prvního ILP bombyxinu bylo popsáno mnoho dalších látek patřících do této skupiny bioaktivních látek, přičemž dnes je známo jen např. u hmyzu rodu *Drosophila* 8 různých ILPs, které mají mírně odlišné místo produkce a funkce v těle jedince (Nässel a Broeck, 2015; Toprak, 2020).

Signální dráha spojená s ILPs je podmíněna dostatkem živin. V prvním kroku dochází k uvolnění ILP z cerebrálního ganglionu a jeho navázání na buněčnou membránu adipocytu prostřednictvím insulinového receptoru (InR) (Chen *et al.*, 1996). Böhni *et al.* (1999) ve své práci uvádějí, že po jejich spojení dojde k aktivaci receptorového substrátu „Chico“, který aktivuje enzym fosfoinositid-3-kinasa (EC 2.7.1.153; PI₃K). Enzym následně katalyzuje fosforylaci PIP₂ za tvorby fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP₃) (Brown a Auger, 2011). Zvýšení jeho hladiny v organismu vede k aktivaci proteinkinasy B (EC 2.7.11.1) a k jejímu přesunu do buněčné membrány (Britton *et al.*, 2002). Ta má schopnost inhibovat transkripční faktory „Forkhead Box Class O“ (foxO) dvěma způsoby. Prvním způsobem je jeho přímá fosforylace (Wang *et al.*, 2008). Dalším způsobem je nepřímá kaskáda vedoucí přes fosforylaci enzymu zvaného „Salt-Inducible kinase 3“ (EC 2.7.11.-; SIK₃) a mnoha dalších meziproduktů, které ve výsledku způsobují také inhibici transkripčního faktoru foxO (Wang *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2015; Toprak, 2020; Obr. 8). Jeho inhibice ovlivňuje bmmL, jejíž aktivita následně klesá, což má za následek hromadění lipidů v tukovém tělese jedince během příjmu potravy (Wang *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2015). Mimo enzym SIK₃ je také aktivován enzym „Sarco/Endoplasmic

Reticulum Calcium-ATPase“ (EC 7.2.2.10; SERCA), který je zodpovědný za transport vápenatých kationtů z cytosolu do endoplazmatického retikula adipocyty, což také způsobuje lipogenezi (Toprak, 2020; Obr. 8). Dle Heiera a Kühnleina (2018) tato zjištění dokazují, že hlavní komponentou kaskády propojující metabolismus TAGs a ILPs je právě transkripční faktor foxO.



Obrázek 8: Schéma účinku ILPs v těle hmyzu – modelový rod *Drosophila* (IPCs – buňky produkující ILPs; ILPs – peptidové hormony podobné insulinu; InR – receptor ILPs; PI₃K – fosfoinositid-3-kinasa; PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát; PIP₃ – fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát; PKB – proteinkinasa B; SIK₃ – enzym „Salt inducible kinase 3“; Chico – substrát InR; foxO – transkripční faktor „Forkhead Box Class O“; SERCA – enzym „Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase“; HDAC₄ – histonová diacetylasa 4 (EC 3.5.1.98); Ca – vápenaté kationty); upraveno z Toprak, 2020.

4.4.3.3 Hormon způsobující diapauzu a aktivaci biosyntézy hmyzích feromonů (DH-PBAN)

Tento HPH složený z 24 AMK (Sato *et al.*, 1993) byl identifikován v mnoha hmyzích rodech – hlavními studovanými rody byly *Helicoverpa* a *Bombyx* (Saito *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004), přičemž bylo prokázáno, že jeho hlavním účelem

v hmyzím těle je kontrolovat proces známý pod názvem diapauza, při němž dochází u jedince, nehledě na jeho vývojové stádium, k utlumení metabolismu za účelem vypořádání se s nepříznivými okolními podmínkami (Toprak, 2020; Tab. 3a). DH-PBAN je produkován neurosekretorickými buňkami subesophageálního ganglionu. Jeho C-konec je zodpovědný za biologickou aktivitu a na N-konci dochází při aktivaci ke konjugaci s příslušným receptorem (diapause hormone receptor, DHR) (Saito *et al.*, 1994; Toprak, 2020). Celý název DH-PBAN je odvozen od skutečnosti, že hormon spojený s diapauzou (DH) má stejnou strukturu jako hormon ovlivňující biosyntézu samičích feromonů (PBAN), tedy jejich transkripce i translace souvisí se stejným genem (Sato *et al.*, 1993).

Metabolická dráha spojující DH-PBAN a katabolismus lipidů je odstartována aktivací hormonu a jeho navázáním na DHR. Receptor obsahuje G-protein propojený s proteinkinasou C (EC 2.7.11.13; PKC), PLC a PI₃K. Dojde tedy k propojení receptoru s G-proteinem za uvolnění DAG (aktivující PKC) a IP₃, který má vliv na exkreci vápenatých kationtů z endoplazmatického retikula do cytosolu adipózní buňky. Pomocí PKC je aktivována mimobuněčná signálem regulovaná kinasa (EC 2.7.11.24; ERK), která společně s nadbytkem cytosolického kalcia způsobuje mobilizace a spotřebu lipidů (Jiang *et al.*, 2016).

4.4.3.4 Neuropeptid F (NPF) a krátký neuropeptid F (sNPF)

Ze zmíněné dvojice HPHs je více prozkoumaným bioaktivním peptidem sNPF. Oba hormony jsou široce rozšířeny nejen u hmyzu, ale i u celého kmenu *Arthropoda* (členovci) (Toprak, 2020). Jsou rozpoznatelné od ostatních svou specifickou sekvencí AMK na C-konci peptidu – v sNPF je obsaženo pořadí methionin, threonin, leucin, fenylalanin, arginin, fenylalanin (také tryptofan) zakončené amidovou skupinou (MTLFRF(W)-amid sekvence); C-konec NPF je pak složen z argininu, aminokyseliny typické pro daného živočicha, argininu, fenylalaninu (také tyrosinu) a amidové skupiny (RXRF(Y)-amid sekvence) (Fadda *et al.*, 2019).

K produkci sNPF dochází v neurosekretorických buňkách po celém těle jedince – v cerebrálním ganglionu, Malpighiho trubicích, tykadlech, ve střevech a vaječnicích (Reiher *et al.*, 2011; Caers *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017). Ve velkém množství živočišných druhů existují jeho různé izoformy, jež pochází z objemného prekurzoru obsahujícího přibližně 281 AMK (Tab. 3a). Sám aktivní peptid po odštěpení obsahuje 6 až 19 AMK a výše zmíněnou C-terminální sekvenci AMK (Fadda *et al.*, 2019;

Toprak, 2020). Jejich hlavní úkoly v hmyzím těle souvisí s kontrolou lokomoce jedince (Kahsai *et al.*, 2010), regulují také krmení a chování s ním spojené (Dillen *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2017), denní rytmus (Johard *et al.*, 2009) a uvolňování ostatních důležitých hormonů, zejména ILPs a AKHs (Nässel *et al.*, 2008).

V závislosti na mnoha studiích hmyzího rodu *Drosophila* bylo konstatováno, že je sNPF také začleněn do lipidového metabolismu tohoto jedince, kdy je jeho exprese vázána na hladinu ILPs – při hladovění dochází ke snížení ILPs za současné zvýšené exprese sNPF, což vede k příslušnému chování a jedinec se vydává hledat zdroj potravy (Root *et al.*, 2011). Klíčovým je dle Honga *et al.* (2012) enzym „minibrain/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1a“ (EC 2.7.12.1; Mnb/Dyrk1a), který se nachází v neuronech zodpovědných za expresi sNPF. Mnb/Dyrk1a je totiž schopen aktivovat transkripční faktor foxO, což poukazuje na nepřímé spojení s metabolismem lipidů (Toprak, 2020). Aktivace samotného enzymu Mnb/Dyrk1a obsahuje kroky, do kterých jsou začleněny cAMP, PKA a transkripční faktor „cAMP response element-binding protein“ (CREB), které mají pozitivní vliv na lipolýzu (Hong *et al.*, 2012).

Hmyzí hormon pojmenovaný NPF je tvořen ze svého prekurzoru o struktuře přesahující 100 AMK. Po odštěpení neaktivního zbytku vzniká peptid o délce alespoň 28 AMK s typickou RXRF(Y)-amid sekvencí na svém C-konci (Fadda *et al.*, 2019). Konkrétně u rodu *Drosophila* byl izolován NPF složený z 36 AMK (Brown *et al.*, 1999). K přeměně na NPF z jeho prekurzoru dochází především ve střevech, cerebrálním a subesofageálním ganglionu hmyzu (Brown *et al.*, 1999; Onken *et al.*, 2004). Je zodpovědný za reprodukci, bdělost (Chung *et al.*, 2017) a dlouhověkost jedince (Toprak, 2020). Také je zajímavé, že oproti sNPF slouží nejen k reakci na hladovění vydáním se za potravou, ale dokonce i k výběru získaného jídla dle vlastních preferencí – chrání tak jedince vůči potenciálně toxické, či znehodnocené potravě (Wu *et al.*, 2005).

Role NPF v lipidovém metabolismu není zcela jasná, jelikož jí nebylo věnováno velké množství studií. Chung *et al.* (2017) ve své práci ovšem tvrdí, že dochází k lipolýze a snižování množství TAGs v závislosti na aktivaci neuronů, které jsou zodpovědné za expresi NPF.

4.4.3.5 Allatostatin-A (AstA)

Jedná se o HPH vznikající z prekurzorového proteinu, jehož složení se pohybuje v blízkosti 151 AMK (Toprak, 2020; Tab. 3a). Lokace neurosekretorických buněk

zodpovědných za tvorbu AstA je především v cerebrálním ganglionu, méně pak ve střevech (Hentze *et al.*, 2015). Yoon a Stay (1995) prokázali negativní účinek této biomakromolekuly na tvorbu juvenilních hormonů. Ovšem novější studie poukazují na fakt, že tomu tak není u všech hmyzích druhů, u kterých byl navíc zjištěn vliv AstA na příjem potravy, přičemž dochází k vzájemnému ovlivňování neuronů produkujících NPF a AstA (Hergarden *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016).

Na jedincích rodu *Drosophila* bylo také popsáno využití AstA v metabolismu lipidů, když bylo zjištěno, že jejich prostřednictvím dochází k regulaci AKH a ILPs (Nässel a Broeck, 2015). Dochází ke konjugaci AstA s buňkami produkujícími AKHs a ILPs prostřednictvím allatostatinového receptoru 2 (DAR2), který posiluje tvorbu obou druhů látek v jejich příslušných buňkách (Hentze *et al.*, 2015). AstA tedy jednak kontroluje prostřednictvím dalších HPHs efektivní využití živin přijmutých z potravy, ale i samotnou vyváženost produkce AKHs a ILPs (Hentze *et al.*, 2015; Nässel a Broeck, 2015; Toprak, 2020).

4.4.3.6 Corazonin (Crz)

Tento hmyzí hormon příbuzný AKH vzniká ze svého 154 AMK obsahujícího prekurzoru převážně v neurosekretorických buňkách cerebrálního ganglionu (Choi *et al.*, 2005; Toprak, 2020; Tab. 3b). Při odštěpení samotného Crz tvořeného 11 AMK dochází k ovlivňování metabolismu nejen lipidů, ale i sacharidů (Choi *et al.*, 2005; Kubrak *et al.*, 2016). U hmyzího jedince je popsáno jeho uplatnění při stresových situacích (Kubrak *et al.*, 2016), pohlavním spojení jedinců (Tayler *et al.*, 2012), svlékání (Kim *et al.*, 2004), melanizaci patogenů související s jeho imunitní odpovědí (Toprak, 2020), sociálním chováním (Gospovic *et al.*, 2017) a zpracování ethanolu (Sha *et al.*, 2014).

Na hmyzí organismus má katabolický účinek, nehledě na metabolismus lipidů, či sacharidů (Kubrak *et al.*, 2016). Toprak (2020) ve své práci popisuje, že při navázání Crz na jeho receptor (CrzR) dochází ke snižování zásob TAGs v adipocytech tukového tělesa. Lipolytický mechanismus je zprostředkován nepřímo přes kaskády AKHs a ILPs, přičemž Crz ovlivňuje jejich tvorbu. TAGs jsou následně vyplavovány do hemolymfy a dochází k jejich spotřebě za tvorby energie. V hemolymfě dochází při signalizaci Crz kaskády také ke snížení hladiny sacharidů, konkrétně glukosy, ovšem pouze u hladovějících jedinců (Kubrak *et al.*, 2016). Ze zjištěných poznatků bylo tedy

stanoveno, že inaktivace Crz či CrzR vyústí v snížení energetických zásob hmyzího jedince (Zhao *et al.*, 2010).

4.4.3.7 Leukokinin (Lk)

Lks jsou neurohormony složené většinou z 6 až 15 AMK, které obsahují na svém C-konci specificky uspořádané AMK (fenylalanin, 2 AMK typické pro daného živočicha, tryptofan, glycin blokován amidem – FXXWG-amid sekvence) způsobující jejich biologickou aktivitu (Radford *et al.*, 2002). Relativně krátký HPH vzniká ze svého prekurzoru složeného ze 160 AMK na vícero místech: v neurosekretorických buňkách v cerebrálním ganglionu, ventrálním ganglionu a v IPCs (Radford *et al.*, 2002; Zandawala *et al.*, 2018; Tab. 3b). Jeho hlavní funkcí je regulace rovnováhy vody v těle prostřednictvím Malpighiho tubic a pohybu živin ve střevech (Schoofs *et al.*, 1992). Lks mají také nemalý vliv na krmení, stravování a chování spojené s těmito procesy, lokomoci, spánek a rychlost probíhajících metabolických dějů (Zandawala *et al.*, 2018; Yurgel *et al.*, 2019).

Svým vznikem v IPCs jsou provázány s produkcí ILPs, tím pádem i s metabolismem lipidů, přičemž byl objeven vliv Lk na produkci insulinu v těchto buňkách (Zandawala *et al.*, 2018). Z této příčiny je tedy předpokládáno, že jsou Lks zakomponovány do procesu lipolýzy při hladovění hmyzího jedince (Toprak, 2020).

4.4.3.8 CCH-amid-2 (CCHa2)

Při studiu hmyzího rodu *Drosophila* byl identifikován peptidový hormon CCHa2 složený z 13 AMK (Ren *et al.*, 2015). K expresi tohoto hormonu z jeho prekurzoru (136 AMK) dochází ve střevech, mozku a tukovém tělese, přičemž jeho přítomnost má pozitivní vliv na krmení jedince (Ren *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2015; Toprak 2020; Tab. 3b).

Doposud není přesně známá role CCHa2 v metabolismu lipidů, je ovšem možné, že jeho prostřednictvím dochází k regulaci insulinové signalizace, tedy ke kontrole a provázání kaskád ILPs a AKHs (Gáliková *et al.*, 2017). Dle současných studií je předpokládán pozitivní účinek CCHa2 na lipogenezi v jedincích rodu *Drosophila* (Toprak, 2020).

4.4.3.9 Tachykininy (Tks)

V neurosekretorických buňkách střev a cerebrálního ganglionu hmyzu dochází k expresi hormonů Tks, jejichž úkoly jsou přenosy signálů z čichové soustavy, lokomoční pohyb, ale hlavně vyvážená hladina lipidů v těle jedince (Reiher *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014).

K tvorbě Tks, které jsou složeny obvykle počtu AMK pohybujícím se kolem čísla 10, dochází na polypeptidickém řetězci jeho prekurzoru složeného asi z 297 AMK (Reiher *et al.*, 2011; Toprak, 2020; Tab. 3b).

Ze všech šesti Tks izolovaných z jedince rodu *Drosophila* byla prokázána spojitost s metabolismem lipidů pouze u jednoho z nich (Reiher *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014). Jedná se o Tk produkovaný ve střevech tohoto hmyzu, jenž má po navázání na svůj receptor (TkR) spřažený s G-proteinem za následek inaktivaci dvou stěžejních enzymů zodpovědných za tvorbu lipidů – syntasa mastných kyselin (EC 2.3.1.85; FAS) a acetyl-CoA karboxylasa (EC 6.4.1.2; ACC), což je tedy prokazatelným důkazem, že Tks svou přítomností inhibují lipogenezi (Song *et al.*, 2014). Jejich nepřítomnost také indukuje expresi určitých ILPs v hladovějících i nasycených jedincích, což by mohlo poukazovat na efekt Tks na ILP signální dráhu ve střevech octomilek (Birse *et al.*, 2011).

4.4.3.10 Cytokiny (adipokiny) (Cyks)

V závislosti na studiu této skupiny HPHs u rodu *Drosophila* do ní byly zařazeny 2 hormony. Hormon s názvem „Unpaired 2“ (UPD2) se od své později objevené izoformy „Unpaired 1“ (UPD1) mírně liší sekvencí AMK. Oba peptidové hormony se podobají leptinu (Rajan a Perrimon, 2012; Beshel *et al.*, 2017). Jiným Cyk je hormon adiponektin (Adip), který ovšem stále nebyl u tohoto jedince identifikován, byl nicméně objeven jeho receptor (AdipR), jehož podstatě byly věnovány některé práce (Kwak *et al.*, 2013; Laws *et al.*, 2015).

UPD2 je hormon tvořený 406 AMK, který je produkován v tukovém tělese jedince (Toprak, 2020; Tab. 3b). Jeho hlavní funkcí je rozpoznání pocitu sytosti, který je následován aktivací IPCs, a tedy spuštění kaskády ILPs (Rajan a Perrimon, 2012). Následně dochází k tvorbě lipidů v adipocytech (Toprak, 2020). Mechanismus účinku UPD2 začíná rozpoznáním pocitu sytosti. Toho je dosaženo při nakrmení jedince, kdy v důsledku dochází ke zvýšení hladiny lipidů v jeho hemolymfě, což vede k uvolnění UPD2 z tukového tělesa (Brown *et al.*, 2001; Rajan a Perrimon, 2012). UPD2 se následně konjuguje se svým receptorem Dom za současné aktivace signální dráhy JAK/STAT v IPCs cerebrálního ganglionu, které obsahují kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) (Lin *et al.*, 2019). Prostřednictvím JAK/STAT signalizace je blokována exkrece GABA z těchto buněk vedoucí ke snížení jejich náboje, což vyústí v sekreci ILPs z buněk, tedy aktivaci tvorby lipidů (Rajan a Perrimon, 2012; Lin *et al.*, 2019; Toprak, 2020). K celému

procesu dochází v dospívajících jedincích. Dospělý hmyz daného rodu má poté UPD2 inaktivován a jeho funkci přebírá izoforma UPD1. Ta má stejnou funkci, je ovšem produkována cerebrálním ganglionem jedince s výslednou sekvencí obsahující 413 AMK (Beshel *et al.*, 2017; Toprak, 2020; Tab. 3b).

Druhým ze skupiny Cyks je hmyzí hormon Adip, jehož funkcí u jiných živočišných říší je kontrola hladiny glukosy a lipolýza (Toprak, 2020). U rodu *Drosophila* nebyl Adip identifikován, došlo ale k objevení AdipR, který je produkován IPCs cerebrálního ganglionu (Kwak *et al.*, 2013; Laws *et al.*, 2015). Jeho účelem je kontrolovat metabolismus lipidů prostřednictvím ovlivňování exkrece insulinu (Kwak *et al.*, 2013).

4.4.3.11 Limostatin (Lst)

Tento HPHs se sekvencí obsahující 139 AMK zodpovídá za inhibici sekrece insulinu v těle hmyzu při hladovění – lipolytickém ději (Alfa *et al.*, 2015; Toprak, 2020; Tab. 3b). Je produkován hlavně neurosekretorickými buňkami žlázy *corpora cardiaca*, dále pak v tukovém tělese (Alfa *et al.*, 2015). V závislosti na žláze *corpora cardiaca*, ve které je Lst produkován, souvisí jeho hladina v těle také hladinou AKH – při jeho snížené hladině v těle jedince dochází také ke snížení množství Lst, nicméně nadbytek AKH na Lst nemá vliv (Toprak, 2020).

4.4.4 HMYZÍ PEPTIDOVÉ HORMONY VČELY MEDONOSNÉ

Na studium jednotlivých včelích peptidových hormonů a jejich struktur bylo nahlíženo dvěma různými způsoby – analýzou genomu *Apis mellifera* a proteomickým studiem peptidů obsažených v jejím těle (THGSC, 2006; Predel a Neupert, 2007; Boerjan *et al.*, 2010).

Ve včelím genomu bylo následně odhaleno 36 genů kódujících až 100 různých peptidových sekvencí (Predel a Neupert, 2007; Boerjan *et al.*, 2010; Galizia a Kreissl, 2012). Mnoho experimentů bylo také zaměřeno na kvantifikaci těchto peptidů přímo ve vybraných tkáních včel, které se nacházejí v okolí centrální nervové soustavy – cerebrální ganglion, tykadla, *corpora pedunculata*, *corpora cardiaca* a *corpora allata* (Audsley a Weaver, 2006; Galizia a Kreissl, 2012). Tímto způsobem bylo objeveno 20 rozdílných skupin peptidových hormonů *Apis mellifera* s celkovým počtem 67 lišících se peptidových sekvencí (Boerjan *et al.*, 2010).

Rozdílné výsledky dvou uvedených metod jsou způsobeny několika faktory. Bylo zjištěno, že se mnohé peptidové hormony nacházejí v těle včel pouze ve stopovém

množství a za jejich produkci jsou zodpovědné i buňky nacházející se v jiných částech těla. Nabízí se však také možnost, že některé z uvedených 36 genů postrádají svou primární funkci a ve včelím genomu jsou obsaženy pouze z evolučního hlediska (Galizia a Kreissl, 2012). Přehled významných peptidových hormonů v konkrétních tkáních centrální nervové soustavy *Apis mellifera* a způsoby jejich detekce jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4), přičemž se jedná pouze o strohý výčet včelích peptidových hormonů a jejich funkce se může poněkud lišit např. od hormonů detekovaných u rodu *Drosophila* z důvodu rozdílných energetických nároků jedinců a způsobu jejich života.

Tabulka 4: Přehled významných peptidových hormonů v konkrétních tkáních centrální nervové soustavy *Apis mellifera* a způsoby jejich detekce; vytvořeno podle: Galizia a Kreissl, 2012.

Název peptidu	Lokalizace v těle <i>A. mellifera</i>	Detekční metoda
AKH	Cerebrální ganglion – <i>corpora cardiaca</i>	Hmotnostní spektrometrie
ILPs	IPCs cerebrálního ganglionu; IPCs <i>corpora cardiaca</i>	Imunohistochemie
PBAN	Subesofageální ganglion	Hmotnostní spektrometrie
NPF	Cerebrální ganglion; subesofageální ganglion	<i>In situ</i> hybridizace
sNPF	Cerebrální ganglion; subesofageální ganglion	<i>In situ</i> hybridizace
AstA	Cerebrální ganglion – <i>corpora pedunculata</i> ; tykadla	Hmotnostní spektrometrie; imunohistochemie
Crz	Cerebrální ganglion	Hmotnostní spektrometrie; imunohistochemie
Tk	Cerebrální ganglion – <i>corpora pedunculata</i> ; tykadla	Hmotnostní spektrometrie; imunohistochemie; <i>in situ</i> hybridizace

4.5 Metody

4.5.1 PURIFIKAČNÍ A SEPARAČNÍ METODY PEPTIDŮ

4.5.1.1 AMICON® filtrace

AMICON® filtry mohou být velmi užitečným nástrojem pro zakoncentrování určitého peptidu či proteinu ve vzorku. Je známo mnoho AMICON® filtrů s různými velikostmi pórů od rozdílných dodavatelů. Pro správnou optimalizaci těchto filtrů je ovšem nutno zohlednit mnoho kritérií – vhodnost vzorku pro filtraci, množství vzorku, jeho komplexita, a především volbu samotného filtru, a to nejen vhodnou velikost jeho pórů, ale i dodavatele (Johnsen *et al.*, 2016). Johnsen *et al.* (2016) totiž ve své práci pomocí skenovacího elektronového mikroskopu objevil značné rozdíly AMICON® filtrů se stejnými specifikacemi, ale od různých dodavatelů.

Použití této filtrační aparatury může výrazně snížit časovou náročnost oproti alternativním procedurám separace peptidů, kterými jsou gelová elektroforéza a tzv. size-exclusion chromatografie (Johnsen *et al.*, 2016). Principem je nanesení specifického množství vzorku (stanoveného dodavatelem) s dokazovaným analytem (peptid, protein) do speciálně upravené centrifugační kyvety obsahující AMICON® filtr s příslušnou velikostí pórů. Velikosti pórů obsahují vždy určitou „cut-off“ hodnotu, podle které je možno vybrat požadovaný filtr (3 000, 10 000, 30 000, 50 000, 100 000 – tyto hodnoty souvisí s molekulovou hmotností uváděnou v Da). Následuje umístění vzorku do centrifugy, kde dochází k jeho centrifugaci při požadovaném zrychlení (uvedeno v jednotkách gravitačního zrychlení – g) požadovanou dobu. Prošlý filtrát je poté možno dále analyzovat, biomakromolekuly, které nebyly filtrem propuštěny, zůstávají na povrchu filtru.

V případě biologicky aktivního peptidu apidaecinu Ia o molekulové hmotnosti lehce přesahující 2 000 Da (Daníhlík *et al.*, 2016), je vhodné použití AMICON® filtru s „cut-off“ hodnotou 3 000, což bude mít při centrifugaci za následek oddělení tzv. „balastních proteinů“ od apidaecinu Ia a jemu podobných látek. „Balastní proteiny“ – tedy proteiny s výrazně větší molekulovou hmotností, než je „cut-off“ hodnota – zůstanou zachyceny na filtru, kdežto peptidy s molekulovou hmotností 3 000 Da a nižší budou obsaženy ve filtrátu. Takto lze efektivně oddělit požadovaný analyt od velmi komplexního vzorku, ovšem může nastat problém se selektivitou biomakromolekul s molekulovou hmotností pohybující se v oblasti „cut-off“ hodnot – zejména pak u filtrů s většími póry (Johnsen *et al.*, 2016). Z toho důvodu je vhodné použití AMICON® filtrů k prepurifikační úpravě

vzorku, která je následována dalšími purifikačními kroky, zahrnující chromatografické metody – především různé druhy kapalinové chromatografie (viz kapitola 4.5.1.2; 4.5.1.3).

4.5.1.2 Iontoměničová chromatografie – Ion-exchange chromatography (IEC)

Jedná se o metodu kapalinové chromatografie, jež je schopna dělit peptidy a proteiny v závislosti na jejich náboji, s klasickým uspořádáním – pevná stacionární fáze a kapalná mobilní fáze. Porézní kuličky tvořící stacionární fázi jsou obvykle složeny ze zesíťovaných molekul nesoucích kladný (anex) či záporný náboj (katex). Typické materiály používané pro tvorbu stacionární fáze IEC jsou polysacharidy, anorganické materiály a syntetické organické polymery, na které je pevně vázán kladně či záporně nabitý ligand poskytující požadované vlastnosti (Boone a Adamec, 2016).

Dle náboje stacionární fáze je také možno rozlišovat silnou („strong“) či slabou („weak“) iontoměničovou chromatografií. Silné iontoměniče mají schopnost zachovat si svůj náboj bez ohledu na pH v koloně, kdežto slabé iontoměniče zůstávají ionizovány pouze v určitém rozmezí pH, čehož je využíváno při tvorbě pH gradientů v kolonách při chromatofokusaci za účelem eluce (Boone a Adamec, 2016). V závislosti na náboji tedy rozlišujeme silnou aniontovou výměnu (SAX), slabou aniontovou výměnu (WAX), silnou kationtovou výměnu (SCX) a slabou kationtovou výměnu (WCX). Vzorek proteinů a peptidů je následně unášen mobilní fází v koloně. Vhodná volba mobilní fáze je hlavním faktorem úspěšného provedení IEC, jelikož pH mobilní fáze ovlivňuje náboj samotných molekul proteinové povahy ve vzorku – pH mobilní fáze nižší, než je izoelektrický bod (pI) samotného proteinu způsobí jeho kladný náboj, a tedy navázání na katex. Při pH hodnotě vyšší, než pI proteinu dojde k vazbě proteinu na anex. V závislosti na množství obsažených ionizovaných skupin proteinu (a tedy i síle jednotlivých interakcí s pevnou fází) poté dochází k jeho úměrnému zachycení v koloně následováno elucí proteinu. Doba, jež je měřena od nanesení konkrétního proteinu spolu s celým vzorkem v mobilní fázi do kolony po jeho eluci, se nazývá eluční čas. Dle elučních časů jednotlivých složek vzorku je možno následně izolovat a purifikovat konkrétní biomakromolekuly pro jejich následnou kvantifikaci.

Včelí AmPs apidaeciny, jež jsou silně kationické ($pI > 11$), lze pomocí IEC efektivně oddělit od ostatních látek. Kupříkladu by bylo možné po AMICON® filtraci připravit IEC-kolonu, na které by probíhala WCX. Peptidy by byly přeneseny do pufru s nižším

pH, než je jejich *pI* (byl by zajištěn jejich kladný náboj) – např. pomocí pufru hydrogenuhličitanu amonného (pH = 9), přičemž by byla zároveň zajištěna eluce peptidů a proteinů s nižším *pI* (Daníhlík *et al.*, 2014).

4.5.1.3 Chromatografie s reverzní fází – Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC)

Velmi účinným a také značně rozšířeným nástrojem při analýze biomakromolekul je RP-LC, jež umožňuje jejich izolaci ze vzorku související s povrchovou hydrofobicitou (Boone a Adamec, 2016). Chromatografická kolona obsahuje stacionární pevnou fázi, která je tvořena hydrofobním, nebo nepolárním materiálem – obvykle se připravuje reakcí silikagelu s alkylsilany o délce řetězce až 18 atomů uhlíku (jiným nepolárním materiálem pro přípravu stacionární fáze u RP-LC je např. divinylbenzen a neporézní oxid křemičitý). Pokud je záměrem RP-LC separace neporušených proteinů, je vhodné zvolit kombinaci silikagelu a alkylsilanů, které mají kratší uhlíkový řetězec (C4 a C8) – kratší řetězec způsobí menší množství interakcí mezi stacionární fází a analytem a bude docházet k nižší retenci analytu v koloně (Capriotti *et al.*, 2011). Naopak při studiu pouze lehce hydrofobních, kratších a molekulově ne příliš velkých proteinů (do 10 000 Da) a peptidů je vhodné použití alkylsilanů s delším uhlíkovým řetězcem (C18) – k těmto alkylsilanům se ovšem velmi silně poutají větší proteiny z důvodu vyšší hydrofobicity, přičemž není tyto biomakromolekuly možné následně eluovat (Boone a Adamec, 2016). Je proto nutné vhodně volit molekuly tvořící stacionární fázi.

Mobilní fáze RP-LC, ve které je unášen vzorek kolonou, musí být hydrofilní, či polární. Typickým příkladem polární mobilní fáze pro nanesení proteinů a peptidů na RP-LC kolonu je zředěná (0,1 – 0,5% v/v) kyselina mravenčí (FA). Po nanesení vzorku na kolonu dochází k interakci hydrofobních molekul vzorku s hydrofobní stacionární fází. Tyto biomakromolekuly jsou adsorbovány na povrch stacionární fáze kolony a eluovány v závislosti na míře hydrofobních interakcí. Nejprve je eluována mobilní hydrofilní fáze spolu s hydrofilními molekulami ze vzorku. S klesající polaritou, jež je docílena použitím organického rozpouštědla – obvykle směs 100% acetonitrilu (ACN) a 0,1% FA, jsou narušeny hydrofobní interakce solutu a mobilní fáze a podle míry hydrofobicity jednotlivých biomakromolekul dochází k jejich eluci (Capriotti *et al.*, 2011). Po skončení purifikace určitého proteinu je důležité RP-LC kolonu dostatečně promýt (použitím až 100% (v/v) ACN a 0,1% (v/v) FA), aby nedošlo k možné interferenci při dalším pokusu, a také ji znova ekvilibrovat pomocí 0,1% (v/v) FA (Boone a Adamec, 2016).

Na rozdíl od IEC je RP-LC tzv. „inline“ metodou, což znamená, že ji lze přímo propojit s detekčními přístroji – konkrétně s hmotnostními spektrometry. Výhodou oproti „offline“ metodám (IEC) je vysoká průchodnost, automatizovaný přenos a dávkování vzorku. Při RP-LC je také možnost záměny solventu za jiný, který je následně také použitelný pro hmotnostní spektrometrii (Boone a Adamec, 2016). IEC má jako „offline“ metoda výhodu ve sběru samotných vzorků, kvůli čemuž je možná analýza vzorku nezávislá na čase, dále v různých fragmentačních technikách vzorku a určité flexibilitě celého procesu – je možno zasahovat do eluce (není automatizována jako u RP-LC), možná následná injekce vzorku do hmotnostního analyzátoru (Capriotti *et al.*, 2011).

RP-LC je možno použít pro separaci AmPs *Apis mellifera* analogicky jako IEC, ovšem v závislosti na jiné typické vlastnosti těchto peptidů – hydrofobicity. Propojení RP-LC s hmotnostním spektrometrem, který využívá ionizaci vzorku elektrosprejem (ESI-MS), dává vzniknout „liquid chromatography-mass spectrometry“ metodě (LC-MS), jež je v současné době hlavní používanou metodou v oblasti vědního oboru proteomika (Capriotti *et al.*, 2011; Boone a Adamec, 2016).

4.5.2 DETEKČNÍ METODY PEPTIDŮ

4.5.2.1 Hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace elektrosprejem (ESI-MS)

Technika ESI-MS umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu vzorku biomolekul (proteinu a peptidu nevyjímaje) – pomocí této metody je tedy možné určit strukturu dané molekuly a také ji kvantifikovat. Jak již bylo zmíněno, je vhodné kombinovat ESI-MS s chromatografickými metodami, nejčastěji s plynovou chromatografií (GC) a hlavně RP-LC. Průběh ESI-MS detekce sestává ze čtyř kroků – nejprve je vzorek proteinu ionizován technikou ESI, následně dochází k přesunu nabitých částic přes hmotnostní analyzátor až k detektoru, na jehož různé části naráží ionty v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Signály z detektoru jsou okamžitě převáděny na počítačová data, které jsou prostřednictvím vhodného softwaru zaznamenána a poté vyhodnocena personálem laboratoře (Ho *et al.*, 2003).

Ionizaci elektrosprejem předchází prepurifikační a purifikační metody (viz kapitola 4.5.1.1; 4.5.1.3). Vhodně připravený vzorek, nebo spíše požadovaná frakce k analýze, je rozpuštěn v těkavém solventu a putuje z chromatografické aparatury do kovové, či skleněné mikrostříkačky s kovovým pístem. Poté dochází prostřednictvím nabitě mikrostříkačky k rozprašení vzorku na jemnou mlhu jednotlivých kapek analytu jeho

vysoušení. K vysoušení je v ESI využit silný proud suchého dusíku – dochází ke zmenšování objemu kapek a k růstu hustoty jejich náboje. S hustotou náboje jednotlivých kapek analytu vzrůstá i síla elektrického pole. Při překročení kritické hodnoty síly elektrického pole dojde k tzv. Coulombické explozi, jež uvolní ionty, které jsou typicky vícenásobně nabitě, do hmotnostního analyzátoru (Bruins, 1998).

Hmotnostní analyzátor typicky kombinovaný s ESI se nazývá kvadrupól (Q). Je složen ze dvou párů paralelních kovových tyčí, které se navzájem od sebe nacházejí ve stejné vzdálenosti. Na procházející ionty působí kovové tyče Q stejnosměrným a radiofrekvenčním napětím o stejné velikosti, ale opačném znaménku, což způsobí oscilaci iontu v jeho x-osách a y-osách (po z-ose se iont pohybuje – tedy v této ose neosciluje). Na základě míry oscilace iontu při určitém stejnosměrném a radiofrekvenčním napětí a jeho rychlosti nárazu na detektor lze pomocí patřičných počítačových softwarů zjistit hodnotu m/z pro konkrétní iont. Hodnota jednotlivých napětí je nastavena v závislosti na kvantifikovaném iontu, může se tedy stát, že nežádoucí ionty s větší oscilační amplitudou na x-osách či y-osách narazí do kovových tyčí a zůstanou v Q uvězněny (Ho *et al.*, 2003).

Mimo Q analyzátor lze ESI kombinovat také s tandemovým systémem tří spolu propojených kvadrupólů (QqQ), dvou kvadrupólů spojených s tzv. „time of flight“ (TOF) analyzátozem (Qq TOF), nebo s hmotnostním analyzátozem zvaným iontová past (IT). Princip QqQ spočívá ve filtraci analyzovaných iontů pomocí Q_1 , přičemž vybrané ionty putují do q_2 , který slouží pouze jako kolizní cela pro fragmentaci těchto iontů. Pro kolizi a fragmentaci iontů je v q_2 používán tzv. „kolizní plyn“ (převážně argon), kdy jsou separované a fragmentované ionty přeneseny do Q_3 , jenž má funkci analyzátoru a zprostředkovává informace o struktuře analyzovaných iontů (Ho *et al.*, 2003). Qq TOF analyzátor s obdobným principem pak poskytuje vyšší rozlišení jednotlivých iontů oproti QqQ analyzátoru. TOF analyzátor na konci tandemového hmotnostního spektrometru totiž obvykle obsahuje elektrostatický analyzátor zvaný reflektrom, který prodlužuje čas letu iontů v závislosti na jejich náboji, a tím je možno docílit jejich lepšího rozlišení. IT je složena z prstencové a dvou „víčkových“ (cap) elektrod, které se nacházejí na vstupu a výstupu analyzátoru. Všechny hyperbolické elektrody, na které je distribuováno napětí závislé na hodnotě m/z kvantifikovaných iontů, formují dohromady dutinu, ve níž je možno tyto ionty uvěznit, analyzovat je a na základě jejich m/z hodnoty je vypustit z analyzátoru směrem k detektoru (Ho *et al.*, 2003). Stejně tak je možné ionty ponechat

uvězněné v analyzátoru a provést další cyklus analýzy za účelem přesnějšího rozlišení jednotlivých biomolekul (např. proteinů) s podobnou strukturou.

Výsledné hmotnostní spektrum zobrazené na počítači vyjadřuje relativní četnost signálů jednotlivých iontů proti jejich hodnotě m/z . Největší signál ve spektru je označen jako maximální hodnota (tedy 100 %) a ostatní signály jsou v závislosti na něm vyjádřeny procentuálně. Složitost hmotnostních spekter závisí na komplexitě měřeného vzorku – výhodné je studovanou molekulu vždy maximálně purifikovat, v opačném případě vzniká při směsi různých proteinů tzv. „raw“ hmotnostní spektrum (hmotnostní spektrum s vysokým počtem signálů), které je velmi obtížné vyhodnotit (Ho *et al.*, 2003).

Při kvantifikaci analytu pomocí ESI-MS je podle Kinga *et al.* (2000) nutné dbát na to, aby nebyla na počátku potlačena jeho ionizace přítomností molekul, které nejsou těkavé (soli a lipidy v biologických materiálech). Této interferenci je v současné době předcházeno právě použitím vhodných purifikačních a separačních metod, zejména pak RP-LC. Iontový signál je při kvantifikaci závislý na koncentraci analytu, nikoliv na jeho objemu a rychlosti jeho průtoku (Bruins, 1998). Odlišným důležitým faktorem docílení přesné kvantifikace je použití interních standardů. Interní standardy jsou molekuly strukturně podobné analytu, které jsou přidávány do analyzované směsi (typicky izotopově značené molekuly) a slouží ke kompenzování ztrát způsobených přípravou analytu a ke zvýšení citlivosti při detekci pomocí ESI-MS (Ho *et al.*, 2003).

4.5.2.2 Kvantifikace v hmotnostní spektrometrii s využitím interních značených standardů

Interní standardy jsou molekuly podobné struktuře kvantifikovaného analytu. Nejvhodnějším způsobem kvantifikace pomocí interních standardů je nejprve příprava interního standardu se stejnou strukturou jako má analyt a dále inkorporace stabilních izotopů do struktury této molekuly – příkladem pro pochopení zmíněného principu je kvantifikace nízkomolekulárního karnitinu, při které bylo využito karnitinového standardu se třemi vodíky nahrazenými jejich těžším izotopem, tedy deuteriem (Stevens *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2003). Dalším možným přístupem, jenž se provádí při nedostupnosti interního standardu, je kvantifikace pomocí strukturního analogu analytu, tedy molekuly, která má podobnou strukturu jako analyt – Zhang *et al.* (1997) ve své studii imunopresivní molekuly s názvem tacrolimus použil k její kvantifikaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie jako interní standard ascomycin.

Při kvantifikaci objemných biomakromolekul (proteiny, peptidy) pomocí interních standardů je celý proces tvorby standardu značně složitější. Oproti relativně snadné organické syntéze standardů menších molekul je získání proteinu touto cestou velmi komplikovaný a mnohdy nemožný z důvodu charakteristického uspořádání AMK v polypeptidickém řetězci, intramolekulárních disulfidových vazeb ve struktuře proteinu a také z důvodu posttranslačních modifikací proteinu, které probíhají v nativních buňkách a synteticky je nemožné je vytvořit (Bronsema *et al.*, 2012).

Pro tvorbu interních standardů proteinů byla tedy vyvinuta inovativní metoda, při které jsou kultivovány modifikované kultury bakterií či kvasinek produkující specifický požadovaný protein, přičemž je růstové médium obohaceno o AMK s inkorporovanými těžkými izotopy prvků (^{15}N a ^{13}C) (Ong *et al.*, 2002; Heudi *et al.*, 2008). Protein je následně syntetizován mikroorganismy včetně posttranslačních modifikací, izotopy jsou pak inkorporovány do struktury proteinů.

Následuje důkladná purifikace vzniklého proteinu, za účelem odstranění proteolytických enzymů. Syntéza proteinů pomocí v bakteriálních a kvasničných je ve srovnání s nebuněčnou syntézou spolehlivější – v syntéze za nepoužití buněčných kultur nedochází k posttranslačnímu modifikování proteinu, v mnohých případech je tedy tento protein odlišný od proteinu analyzovaného, a tedy méně ideální pro roli standardu v kvantifikaci (Bronsema *et al.*, 2012).

Jiným použitím interních standardů při kvantifikaci proteinů a peptidů je využití strukturního analogu zkoumaného proteinu jako standardu. Výhodou je volba komerčně syntetizovaných proteinů, které jsou relativně cenově dostupné. Experiment tedy vyžaduje menší časovou náročnost. Důležitými faktory pro výběr vhodného analogu studovaného proteinu je jeho molekulová hmotnost, počet AMK obsahující náboj na postranním řetězci, pI proteinu a schopnost odštěpení specifického peptidu prostřednictvím trávicích enzymů (Bronsema *et al.*, 2012). Nevýhodou použití standardů s analogickou strukturou kvantifikovaného proteinu je značná nepřesnost stanovení, jelikož daný standard nevykompenzuje všechny ztráty při krocích přípravy vzorku. Signál analytu a standardu se také může lišit v závislosti na potlačení určitých iontů, neúplné digesci standardu, rozdílech v adsorpci biomakromolekul a návratnosti jejich extrakce (Bronsema *et al.*, 2012).

Za nedostupnosti proteinových standardů mohou být při kvantifikaci proteinů jako standardy použity také peptidy (ovšem s nižší citlivostí kvantifikace). Standardy peptidů jsou syntetizovány na pevné fázi za použití AMK s izotopovými značkami, nebo značením pomocí odštěpitelných skupin (Nilsson *et al.*, 2005; Bronsema *et al.*, 2012). K nejméně přesné kvantifikaci proteinu pomocí peptidových interních standardů dochází při použití standardu peptidu obsahujícího pouze podobnou (nikoliv stejnou) strukturu jako určitá část proteinu (Stokvis *et al.*, 2004).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato kapitola navazuje na literární rešerši studované problematiky a přináší navrhovaný postup experimentální činnosti.

5.1 Navržený protokol izolace, purifikace a následné detekce s kvantifikací včelího antimikrobiálního peptidu apidaecinu I

5.1.1 IZOLACE APIDAECINU I Z TĚLA *APIS MELLIFERA* – PREPURIFIKAČNÍ KROKY

Pro porovnání hladiny apidaecinu v těle *Apis mellifera* v závislosti na jejím věku je možno shromažďovat dvě skupiny včel – čerstvě vylíhlé a žijící v úlu, přičemž je také nutno rozlišovat letní a zimní populace včel, které se mohou lišit v množství exprese jednotlivých AmPs (Daníhlík *et al.*, 2014; Dostálková *et al.*, 2021). Míra tvorby AmPs se také liší v závislosti na zdravotním stavu včel (Daníhlík *et al.*, 2014).

5.1.1.1 Sběr hemolymfy a hrudní části ze včelího těla

Hemolymfa se získává z hrudi (*thorax*) včel, která je pitvou oddělena od zbytku těla včely, a následně je hemolymfa vytlačena a odpipetována (Stránská, 2007; Daníhlík *et al.*, 2018; Dostálková *et al.*, 2021). Alternativním způsobem lze vzorek odebírat vpichem kapiláry pod kutikulu jedince a samovolně nechat hemolymfu odkapávat.

5.1.1.2 Nutné prepurifikační kroky

K izolaci peptidů ze vzorku hemolymfy je doporučováno použít srážecích činidel. Stránská (2007) ve své práci použila dvě rozdílné chemikálie, a sice síran amonný a aceton. Srážení ovšem předchází centrifugace samotné hemolymfy za snížené teploty (4 °C) při přetížení asi 18 000 × g. Po 15 minutách by mělo dojít k odstranění buněčných komponent a lipidů ze vzorku. Při srážení pomocí síranu amonného je používáno 30% nasyceného roztoku, jenž je přidán do zkumavky – ta je přenesena do lednice, kde je směs precipitována po dobu 1 hodiny. Následuje přenos směsi do centrifugační kyvety a centrifugace směsi při přetížení asi 18 000 × g po dobu přibližně 5 minut při snížené teplotě (4 °C). Celý proces je následně opakován za použití 80% nasyceného roztoku síranu amonného, který je přidán k supernatantu zcentrifugovaného vzorku. Výsledkem izolace je rozlišení proteinové frakce na dně kyvety a peptidové frakce nacházející se v supernatantu, který je možno skladovat v mrazícím boxu při nízké teplotě (-80 °C).

Pro srážení acetonem, je použito dvou roztoků – při tvorbě roztoku A je v acetonu smíchána 20% (v/v) trichloroctová kyselina (TCA) s 0,2% dithiotreiolem (DTT); roztok

B tvoří samotný 0,2% (v/v) DTT v acetonu. Nejprve je ke vzorku hemolymfy přidán roztok A v objemovém poměru 1:8. Roztok je přenesen do lednice, kde probíhá precipitace obvykle 24 hodin (či stačí pouze přes noc). Po precipitaci je vzorek přenesen do centrifugační kyvety a centrifugován stejným způsobem jako vzorek precipitovaný síranem amonným, ovšem s časovým rozdílem (centrifugační doba 15 minut). Po odstranění supernatantu zcentrifugovaného vzorku je nutno k sedimentu přidat roztok B (stejný objem jako roztok A) a tuto centrifugaci opakovat (Stránská, 2007). Proteiny i peptidy se v tomto případě nacházejí v jedné společné frakci, která je obsažena v supernatantu – skladování při nízké teplotě (-80 °C) do doby dalšího využití.

Prepurifikace vzorků obsahující včelí *thorax* je založena nejprve na jejich homogenizaci v prostředí trifluoroctové kyseliny (TFA) s použitím keramických kuliček v kuličkovém mlýnku. Následně je při laboratorní teplotě homogenát centrifugován po dobu 10 minut při 15 000 × g. Po přenesení supernatantu do zkumavky a jeho zahřívání po dobu 10 minut při 100 °C je centrifugace opakována. Supernatant odebraný z centrifugované směsi je poté lyofilizován a skladován při teplotě -80 °C v mrazicím boxu (Daníhlík *et al.*, 2014). Mezikrok obsahující zahřívání supernatantu vzorku souvisí s typickými vlastnostmi AmPs, přičemž jejich silná bazicita přispívá k odolnosti vůči extrémním podmínkám (vysoká teplota, nízké pH) – tepelným zahříváním lze tedy efektivně oddělit silně bazické AmPs od ostatních peptidů a proteinů, které jsou denaturovány a sedimentují při centrifugaci (Casteels *et al.*, 1989).

Analogicky lze k separaci proteinů a peptidů použít AMICON® filtrů, které jsou schopny dělit tyto molekuly od ostatních komponent vzorku na základě specifické molekulové hmotnosti. Filtrace je prováděna ve speciálních aparaturách, také je možno filtrovat v mikroskopickém měřítku, kdy je filtr usazen do mikrozkušavky a při následné centrifugaci jsou přes něj propouštěny odpovídající molekuly vzorku.

5.1.2 PURIFIKACE JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ ZA ÚČELEM ZISKU CO NEJČISTŠÍ FRAKCE APIDAECINU I

Před samotnou purifikací je k lyofilizovaným vzorkům obsahujícím včelí hemolymfu, nebo *thorax* přidána 5% kyselina mravenčí (FA) – v koncentracích závislých na typu a množství vzorku – za účelem znovurozpuštění tohoto lyofilizátu. Daníhlík *et al.* (2014) ve své práci zvolil velmi účinných a přesných metod. V této práci jsou výše popsané metody upraveny a optimalizovány za účelem co nejvyšší preciznosti provedení experimentu. Je v nich zahrnuta slabá iontoměničová chromatografie na katexu

prováděná v reverzní fázi, na kterou navazuje kapalinová chromatografie v reverzní fázi a nanokapilárním provedení (RP-nLC), jež umožňuje důkladnější analýzu za současného použití sníženého objemu vzorku. RP-nLC je spojena přímo („inline“ metoda) s ESI-Qq TOF hmotnostním spektrometrem.

5.1.2.1 Slabá iontoměničová chromatografie na katexu (WCX) v reverzní fázi

Lyofilizované vzorky hemolymfy a homogenizované hrudní části *Apis mellifera* jsou pomocí této metody zakoncentrovány. Prvním krokem je příprava samotných mikrokolon za použití stacionární fáze – konkrétně Oasis® WCX 30 µm (Waters, USA), kterým je nutné tyto mikrokolony naplnit. Následně probíhá aktivace stacionární fáze promytím methanolem a destilovanou vodou, přičemž je pro prostup obou kapalin nutné použití centrifugační síly (2 minuty při $1\ 000 \times g$ za laboratorní teploty). Mikrokolony jsou z důvodu své malé velikosti při centrifugaci pevně uchyceny v mikrozkuvkách. Alikvoty vzorků jsou naředěny 5% (v/v) FA a nanášeny na aktivovanou stacionární fázi mikrokolony. Eluce konkrétních frakcí je postupná za použití specifických promývacích chemikálií. Nejprve je vzorek přečištěn od kyselých peptidů a proteinů promytím $30\ \text{mmol.L}^{-1}$ pufru hydrogenuhličitanu amonného (pH = 9). Dalším promývacím činidlem je methanol, jenž zbaví směs neutrálních molekul a složek interagujících s reverzní fází. Bazické AmPs jsou vymyty pomocí 50% (v/v) ACN s přidavkem 5% (v/v) FA (Daníhlík *et al.*, 2014).

Pro navazující metodu nanokapilární kapalinové chromatografie v reverzní fázi spojené přímo s ESI-Qq TOF hmotnostním spektrometrem je třeba, dle experimentu provedeného Daníhlíkem *et al.* (2014), odsolení analyzované frakce vzorku (pomocí C8 stacionární fáze) – aktivace disků s C8 stacionární fází pomocí izopropanolu a 5% (v/v) FA následovaná centrifugací (2 minuty při $1\ 000 \times g$ za laboratorní teploty), rozpuštění eluovaných frakcí vzorků v 5% (v/v) FA a přenesení na disky s C8 stacionární fází, promytí 5% (v/v) FA následované dvojnásobným promytím 50% (v/v) ACN s přidavkem 5% (v/v) FA (vždy následováno centrifugací za laboratorní teploty – 2 minuty při $1\ 000 \times g$). Sesbírané frakce jsou vysušeny ve vakuu za nižších teplot (45 °C).

5.1.2.2 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi v nanokapilárním provedení (RP-nLC)

Identifikaci a kvantifikaci apidaecinu I pomocí RP-nLC nejprve vyžaduje rozpuštění vysušeného vzorku v 0,1% (v/v) TFA s následným promícháním, homogenizací

ultrazvukem a přenesením do skleněných vialek. Takto připravený analyt (množství řádově μl) je nanesen na kolonu s délkou 5 cm (Daníhlík *et al.*, 2014), ve které je obsažena stacionární fáze tvořená silikagelem s navázaným alkylsilanem o délce C4. Dále je připravena mobilní fáze: 0,4% (v/v) FA jako mobilní fáze A, 90% (v/v) ACN s příměsí 0,4% (v/v) FA jako mobilní fáze B. RP-nLC probíhá při zvýšeném tlaku (20 000 kPa) a po dokončení eluce balastních molekul je kolona promývána mobilní fází A (eluce neutrálních molekul a molekul interagujících s mobilní fází). Pro eluci požadovaných peptidů je použita mobilní fáze B, kdy je při rychlé gradientové eluci (25 minut, průtoková rychlost $400 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$) dle elučních časů standardů apidaecinu I sbírána frakce vzorku pro ESI-Qq TOF detekci.

5.1.3 MĚŘENÍ HMOTNOSTNÍHO SPEKTRA APIDAECINU I S NÁSLEDNOU KVANTIFIKACÍ

Hmotnostního spektra je v experimentu Daníhlíka *et al.* (2014) docíleno pomocí pozitivního módu MS v rozmezí hodnot m/z 350-2 200. Kalibrace MS je provedena v rozsahu m/z od 118 do 2 772 při rozlišení 25 000 (při plné šířce a polovině maxima) za použití kalibračního iontu s hodnotou m/z 922,001. Kalibrace probíhá při zdrojovém napětí 4 500 V, tlaku desolvatačního plynu 40 kPa, proudu suchého plynu $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a teploty sušení $180 \text{ }^\circ\text{C}$. Získaná data jsou zpracována pomocí patřičného softwaru (DataAnalysis software v 4.0 SP5 – Bruker Daltonik). Je porovnán eluční čas standardu apidaecinu I a vzorku.

5.1.3.1 Externí kalibrace

Pomocí interního standardu apidaecinu I, který je zpracován analogicky jako vzorky ze včel, a navíc značen pomocí ^{13}C a ^{15}N , je vytvořena kalibrační křivka v závislosti na jeho vzrůstající koncentraci (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 a 5 pmol). Podle kalibrační křivky je poté možno určit koncentraci apidaecinu I v jednotlivých vzorcích (Daníhlík *et al.*, 2014).

5.1.3.2 Kvantifikace

Ze získaných dat a kalibrační křivky je možno kvantifikovat apidaecin I ve vzorcích včelí hemolymfy a hrudní části těla (obsahující mimo jiné i tukové těleso). Při počítání množství apidaecinu I v jednotlivých vzorcích je nutno dbát na patřičné zředění vzorku (Daníhlík *et al.*, 2014):

Kvantifikace apidaecinu I ve včelích vzorcích (př. odebráno 10 μ L ze 100 μ L vzorku):

$m_{\text{apidaecinu I}} \text{ (ng)} = \text{látkové množství apidaecinu I (pmol)} \times \text{faktor zředění (1/10)} \times$
 $\text{molekulová hmotnost (Da)} \times 0,001.$

5.2 Navržený protokol izolace, purifikace a následné detekce s kvantifikací včelího adipokinetického hormonu (*Apm-AKH*)

Studiu *Apm-AKH* doposud nebylo věnováno příliš mnoho publikací, tím pádem jsou informace o tomto hmyzím hormonu stále neúplné. V této kapitole je navrhnout pracovní postup izolace, purifikace a následné kvantifikace s MS detekcí vycházející s dosud provedených studií na podobné téma. Níže uvedený pilotní protokol by mohl být využíván pro co nejpřesnější izolaci a kvantifikaci *Apm-AKH*. V budoucnu je však potřeba jej prakticky vyzkoušet v laboratoři.

5.2.1 IZOLACE VČELÍHO ADIPOKINETICKÉHO HORMONU Z TĚLA *APIS MELLIFERA* – PREPURIFIKAČNÍ KROKY

Včely použité pro tento experiment mohou být shromažďovány analogicky s předchozím protokolem. V předchozích studiích byly ovšem vybrány dospělé včely, které byly sbírány v letních měsících – konkrétně dělnice a létavky (Lorenz *et al.*, 1999; Audsley a Weaver, 2006).

5.2.1.1 Kolekce tkání neuroendokrinní soustavy – cerebrálního ganglionu bez komplexu *corpora cardiaca-corpora allata* a samotného komplexu *corpora cardiaca-corpora allata*

Pitva výše zmíněných dvou tkání je prováděna v závislosti na předchozích studiích, když byla prokázána velmi nízká hladina AKH v hemolymfě (Goldsworthy *et al.*, 2002a) a zároveň jeho hlavní výskyt v hlavové části hmyzu (Goldsworthy *et al.*, 1997).

Samotný úkon je prováděn po prudkém zmrazení kapalným dusíkem, na které navazuje oddělení hlavové části od hrudi a zadečku. Z hlavové části je následně pomocí pitvy vypreparován mozek s komplexem *corpora cardiaca-corpora allata* (Obr. 5), které je od sebe možno oddělit (úkon je obvykle prováděn na Petriho misce s voskem na dně misky, na kterém je včela imobilizována – např. entomologickým špendlíkem). Vzorky 2 rozdílných tkání jsou poté vloženy do mikroskopových vložek – v práci Lorenze *et al.* (1999) bylo použito od 50 po 80 jedinců pro tvorbu jednoho vzorku, optimálním počtem by mohlo být 60 jedinců.

5.2.1.2 Nutné prepurifikační kroky

Vzorky jednotlivých tkání jsou nejlépe dvakrát extrahovány v 80% methanolu. Poté probíhá jejich homogenizace pomocí ultrazvuku a centrifugace za snížené teploty (4 °C) při přetížení asi 15 000 × g po dobu 5 až 10 minut. Vzniklé supernatanty jsou vysušeny

ve vakuu za nízké teploty (viz kapitola 5.1.2.1) a přeneseny do mrazícího boxu (-80 °C), kde jsou uloženy do doby jejich dalšího využití (jako u prepurifikačních kroků apidaecinu I lze pro separaci *Apm*-AKH využít i AMICON® filtrů).

5.2.2 PURIFIKACE JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ ZA ÚČELEM ZISKU CO NEJČISTŠÍ FRAKCE VČELÍHO ADIPOKINETICKÉHO HORMONU

Na rozdíl od postupu týkajícího se purifikace apidaecinu I je vhodnější v tomto případě nahradit WCX v reverzní fázi tzv. „size-exclusion“ chromatografií (SEC), která dělí biomakromolekuly v závislosti na jejich molekulové hmotnosti – je tedy využito poměrně nižší molekulové hmotnosti *Apm*-AKH (přibližně 1 160 Da) oproti např. apidaecinu I a dalším AmPs, které se nacházejí ve včelí hemolymfě. Následující postup je (s drobnými obměnami) analogický s postupem zpracování apidaecinu I – na SEC navazuje RP-nLC spojená s ESI-Qq TOF hmotnostním spektrometrem.

5.2.2.1 „Size-exclusion“ chromatografie (SEC)

Pomocí SEC je dělena směs biomakromolekul stejným principem jako u gelové permeační chromatografie. Hlavní podmínkou správného provedení experimentu je volba vhodného gelu, kterým extrakt proniká. Pro tento experiment je vhodné použití jemného či extra jemného Bio-Gel® P-2 gelu (Bio-Rad), či jeho analogů. Tento gel propouští molekuly mezi molekulovými hmotnostmi 100 až 1 800 Da (Bio-Rad, 2000). Jedná se o polyakrylamidový gel, který je použitelný v pH rozmezí 2 až 10, silně hydrofilní a bez náboje, což jsou esenciální vlastnosti ke gelové filtraci *Apm*-AKH (Bio-Rad, 2000).

Jako první je tedy připraven gel, kterým je naplněna chromatografická kolona (dle instrukcí distributora). Následně jsou vzorky tkání vyjmuty z mrazícího boxu, rozmrazeny na laboratorní teplotu. Podle množství vzorku je volena délka a průměr kolony. V případě použití Bio-Gel® P-2 gelu je možno využít také vyššího tlaku při SEC z důvodu dobrých vlastností a elasticity gelu (Vagenina *et al.*, 1999). Na připravenou chromatografickou kolonu je nanesen vzorek za použití 0,1% TFA jako solventu (Siegert *et al.*, 1985). Po kolekci frakcí vzorků cerebrálního ganglionu a komplexu *corpora cardiaca-corpora allata* obsahující *Apm*-AKH je třeba odsolení analyzovaných frakcí pomocí C8 stacionární fáze (postup – viz kapitola 5.1.2.1). Sesbírané frakce dvojího typu jsou vysušeny ve vakuu za nižších teplot (45 °C).

5.2.2.2 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi v nanokapilárním provedení (RP-nLC)

Identifikaci a kvantifikace *Apm*-AKH probíhá analogickým způsobem, jako bylo zmíněno v protokolu zpracování apidaecinu I. Úvodem je nutné rozpuštění vzorků (cerebrální ganglion, komplex *corpora cardiaca-corpora allata*) v 0,1% (v/v) TFA (Audsley a Weaver, 2006) a jeho následná homogenizace ultrazvukem. Stacionární fáze kolony RP-nLC je tvořena silikagelem, na který je v souladu s prepurifikačními kroky a SEC purifikací možno navázat alkylsilan o délce C18 (Lorenz *et al.*, 1999). V závislosti na experimentu Lorenze *et al.* (1999) je vhodné použít tyto mobilní fáze: mobilní fáze A – 0,1% (v/v) TFA, mobilní fáze B – 0,1% (v/v) TFA s příměsí 20% až 32% ACN za tvorby gradientové eluce (pH = 7, průtoková rychlost 400 nL.min⁻¹).

Z důvodu blokace peptidu kyselinou pyroglutamovou bylo v experimentu Lorenze *et al.* (1999) využito enzymatického odštěpení této kyseliny (pomocí enzymu pyroglutamát aminopeptidasa (EC 3.4.19.3)) za účelem získání přesné AMK sekvence daného peptidu. Cílem této práce je kvantifikace *Apm*-AKH, pro kterou není tento úkon nutný. Vzorek je tedy spolu se standardem *Apm*-AKH nanesen na připravenou kolonu o délce 5 cm. Probíhá vysokotlaká kapalinová chromatografie s gradientem mobilních fází. Frakce vzorku jsou sbírány k ESI-Qq TOF detekci v závislosti na elučním čase standardu *Apm*-AKH.

5.2.3 MĚŘENÍ HMOTNOSTNÍHO SPEKTRA VČELÍHO ADIPOKINETICKÉHO HORMONU S NÁSLEDNOU KVANTIFIKACÍ

V práci Audsleyho a Weavera (2006) byl hmotnostní spektrometr (MALDI-TOF MS) kalibrován v pozitivním módu (rozmezí hodnot m/z 500-3 500). Při provedení měření hmotnostního spektra pomocí ESI-Qq TOF MS je potřeba přístroj kalibrovat v podobném rozmezí. Je možno také vycházet z analýzy apidaecinu I (Daníhlík *et al.*, 20014), která by mohla posloužit jako jakási šablona pro optimalizaci kalibrace.

5.2.3.1 Externí kalibrace

Kalibrační křivku pro kvantifikaci *Apm*-AKH je možné konstruovat pomocí interního standardu *Apm*-AKH, který je (stejně jako interní standard apidaecinu I) možno syntetizovat, či spíše nechat vytvořit na zakázku specializovanou laboratoří zaměřenou na syntézu biomakromolekul. Poté je (analogicky s protokolem zpracování apidaecinu I) standard izotopově značen (¹³C a ¹⁵N) a v závislosti na jeho vzrůstající koncentraci je vytvořena kalibrační křivka *Apm*-AKH.

5.2.3.2 Kvantifikace

Při proložení získaných dat kalibrační křivkou je možno kvantifikovat *Apm*-AKH ve vzorcích cerebrálního ganglionu a komplexu *corpora cardiaca-corpora allata*. Lze postupovat podobným způsobem jako při kvantifikaci apidaecinu I (nutno zohlednit zředění) – viz kapitola 5.1.3.2.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly v několika kapitolách shrnuty současné poznatky o hmyzích bioaktivních peptidech (se zaměřením na konkrétní hmyzí druh *Apis mellifera*), jejich struktuře, modifikacích funkcích a biologickém významu. V této části práce byly podrobně rozpracovány dvě hlavní skupiny bioaktivní peptidů, jimiž jsou antimikrobiální peptidy (AmPs) a hmyzí peptidové hormony (HPHs). V závislosti na jejich struktuře a specifických funkcích byly tyto peptidy popsány samostatně, či v rámci biologicky aktivních peptidů s charakteristickými společnými znaky. Byly také vysvětleny mechanismy působení bioaktivních peptidů v těle hmyzu a signální dráhy zapojené do tvorby AmPs a HPHs v souvislosti s imunitní a obrannou odpovědí.

Experimentální část byla věnována konkrétním zástupcům bioaktivních peptidů z AmPs a HPHs, přičemž byl popsán postup jejich izolace z těla *Apis mellifera*, následné purifikace a detekce s kvantifikací.

Ze včelích AmPs byl zvolen zástupce zvaný apidaecin I, jehož zpracování bylo již popsáno Danihlíkem *et al.* (2014). Postup, který sestává z izolace včelí hemolymfy a hrudi hmyzu za použití prepurifikačních kroků (případně AMICON® filtrace), purifikace vzniklých extraktů WCX v reverzní fázi, nanokapilární RP-LC purifikace a detekce s kvantifikací pomocí metody ESI-Qq TOF hmotnostní spektrometrie, byl při vypracování teoretického protokolu zhodnocen a drobně obměněn. Hlavním důvodem zpracování tohoto teoretického protokolu byla ovšem jeho analogická aplikace pro zpracování *Apm-AKH* ze skupiny HPHs. Optimalizace kompletního zpracování *Apm-AKH* totiž v literatuře doposud nebyla popsána.

Teoretický postup zpracování *Apm-AKH* byl započat popisem jeho izolace z dvou odlišných tkání včely medonosné – cerebrálního ganglionu a *komplexu corpora cardiaca-corpora allata*. V popisu prepurifikačních kroků bylo zpracování vzorků obměněno v závislosti na charakteru analyzovaného peptidu. V protokolu je také nahrazena purifikační metoda WCX (vhodná pro silně bazické AmPs) metodou SEC, pomocí níž je *Apm-AKH* vhodnějším způsobem a šetrněji purifikován. I do postupu zpracování *Apm-AKH* byla začleněna metoda, která kombinuje RP-nLC s ESI-Qq TOF hmotnostní spektrometrií. Způsob kvantifikace dvou zmíněných bioaktivních peptidů popsáný v této práci je založen na izotopickém značení interních standardů jednotlivých peptidů.

Vypracované teoretické protokoly byly vytvořeny za účelem sjednocení současných poznatků o zpracování vybraných bioaktivních peptidů a mohou být využity pro studie zabývající se podobnou problematikou. Vhodným uplatněním by mohlo být například navazující studium bioaktivních peptidů *Apis mellifera* v rámci diplomové práce.

7 LITERATURA

- Agaisse H., Perrimon N. (2004): The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews* **198**, 72-82 (DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x).
- Agaisse H., Petersen U.-M., Boutros M., Mathey-Prevot B., Perrimon N. (2003): Signaling Role of Hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. *Developmental Cell* **5**, 441-450 (DOI: 10.1016/S1534-5807(03)00244-2).
- Alfa R.W., Park S., Skelly K.-R., Poffenberger G., Jain N., Gu X., Kockel L., Wang J., Liu Y., Powers A.C., Kim S.K. (2018): Suppression of Insulin Production and Secretion by a Decretin Hormone. *Cell Metabolism* **27**, 323-334 (DOI: 10.1016/j.cmet.2018.01.003).
- Arrese E.L., Flowers M.T., Gazard J.L., Wells M.A. (1999): Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. *Journal of Lipid Research* **40**, 556-564 (DOI: 10.1016/S0022-2275(20)32460-3).
- Arrese E.L., Soulages J.L. (2010): Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* **55**, 207-225 (DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085356).
- Audsley N., Weaver R.J. (2006): Analysis of peptides in the brain and *corpora cardiaca*–*corpora allata* of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Peptides* **27**, 512-520 (DOI: 10.1016/j.peptides.2005.08.022).
- Baeg G.-H. (2005): Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes & Development* **19**, 1861-1870 (DOI: 10.1101/gad.1320705).
- Baracchi D., Francese S., Turillazzi S. (2011): Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon* **58**, 550-557 (DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.08.017).
- Bazinet L., Firdaus L. (2009): Membrane Processes and Devices for Separation of Bioactive Peptides. *Recent Patents on Biotechnology* **3**, 61-72 (DOI: 10.2174/187220809787172623).
- Becker G.W. (2008): Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **7**, 371-382 (DOI: 10.1093/bfpg/eln047).
- Bednářová A., Kodrík D., Krishnan N. (2013): Adipokinetic hormone exerts its anti-oxidative effects using a conserved signal-transduction mechanism involving both PKC and cAMP by mobilizing extra- and intracellular Ca²⁺ stores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **158**, 142-149 (DOI: 10.1016/j.cbpc.2013.07.002).
- Beller M., Bulankina A.V., Hsiao H.-H., Urlaub H., Jäckle H., Kühnlein R.P. (2010): Perilipin-Dependent Control of Lipid Droplet Structure and Fat Storage in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **12**, 521-532 (DOI: 10.1016/j.cmet.2010.10.001).
- Beshel J., Dubnau J., Zhong Y. (2017): A Leptin Analog Locally Produced in the Brain Acts via a Conserved Neural Circuit to Modulate Obesity-Linked Behaviors in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **25**, 208-217 (DOI: 10.1016/j.cmet.2016.12.013).
- Beutler B. (2004): Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* **40**, 845-859 (DOI: 10.1016/j.molimm.2003.10.005).
- Bio-Rad (2000): *Bio-Gel® P Polyacrylamide Gel Instruction Manual*. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, U.S.A., 21 stran.
- Birse R.T., Soderberg J.A.E., Luo J., Winther A.M.E., Nassel D.R. (2011): Regulation of insulin-producing cells in the adult *Drosophila* brain via the tachykinin peptide receptor DTKR. *Journal of Experimental Biology* **214**, 4201-4208 (DOI: 10.1242/jeb.062091).
- Boerjan B., Cardoen D., Bogaerts A., Landuyt B., Schoofs L., Verleyen P. (2010): Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*. *Neuropharmacology* **58**, 248-258 (DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.026).
- Böhni R., Riesgo-Escovar J., Oldham S., Brogiolo W., Stocker H., Andruss B.F., Beckingham K., Hafen E. (1999): Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a *Drosophila* Homolog of Vertebrate IRS1–4. *Cell* **97**, 865-875 (DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80799-0).
- Boman H.G., Nilsson I., Rasmuson B. (1972): Inducible Antibacterial Defence System in *Drosophila*. *Nature* **237**, 232-235 (DOI: 10.1038/237232a0).

- Boone C., Adamec J. (2016): Top-Down Proteomics. In: *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. 2nd ed., (Ciborowski P., Silberring J.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 175-191 (DOI: 10.1016/B978-0-444-63688-1.00010-0).
- Boone E., Brandtzaeg O.K., Vehus T., Roberg-Larsen H., Bogoeva V., Ademi O., Hildahl J., Lundanes E., Wilson S.R. (2016): A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **120**, 106-111 (DOI: 10.1016/j.jpba.2015.12.010).
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N. (2002): Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Developmental Cell* **3**, 711-722 (DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00325-8).
- Britton J.S., Lockwood W.K., Li L., Cohen S.M., Edgar B.A. (2002): *Drosophila's* Insulin/PI3-Kinase Pathway Coordinates Cellular Metabolism with Nutritional Conditions. *Developmental Cell* **2**, 239-249 (DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00117-X).
- Bronsema K.J., Bischoff R., van de Merbel N.C. (2012): Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **893-894**, 1-14 (DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.021).
- Brown J.R., Auger K.R. (2011): Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 1-14 (DOI: 10.1186/1471-2148-11-4).
- Brown M.R., Crim J.W., Arata R.C., Cai H.N., Chun C., Shen P. (1999): Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides* **20**, 1035-1042 (DOI: 10.1016/S0196-9781(99)00097-2).
- Brown S., Hu N., Hombria J.C.-G. (2001): Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene domeless. *Current Biology* **11**, 1700-1705 (DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00524-3).
- Bruins A.P. (1998): Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* **794**, 345-357 (DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01110-2).
- Caers J., Peymen K., Van Hiel M.B., Van Rompay L., Van Den Abbeele J., Schoofs L., Beets I. (2016): Molecular characterization of a short neuropeptide F signaling system in the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *General and Comparative Endocrinology* **235**, 142-149 (DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.06.005).
- Canavoso L.E., Wells M.A. (2001): Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 783-790 (DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00183-1).
- Capriotti A.L., Cavaliere C., Foglia P., Samperi R., Laganà A. (2011): Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics. *Journal of Chromatography A* **1218**, 8760-8776 (DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.094).
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391 (DOI: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x).
- Casteels P., Ampe C., Riviere L., Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x).
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1993): Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *The EMBO Journal* **12**, 1569-1578 (DOI: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05801.x).
- Conlon M.J. (2013): Amphibian/Skin Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 321-406 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Czihal P., Hoffmann R. (2009): Mapping of Apidaecin Regions Relevant for Antimicrobial Activity and Bacterial Internalization. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **15**, 157-164 (DOI: 10.1007/s10989-009-9178-z).

- Danihlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (2016): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research* **54**, 123-136 (DOI: 10.1080/00218839.2015.1109919).
- Danihlík J., Šebela M., Petřivalský M., Lenobel R. (2014): A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1374**, 134-144 (DOI: 10.1016/j.chroma.2014.11.041).
- Danihlík J., Škrabišová M., Lenobel R., Šebela M., Omar E., Petřivalský M., Crailsheim K., Brodschneider R. (2018): Does the Pollen Diet Influence the Production and Expression of Antimicrobial Peptides in Individual Honey Bees? *Insects* **9**, 73 (DOI: 10.3390/insects9030079).
- de Lima P.R., Brochetto-Braga M.R. (2003): *Hymenoptera* venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**, 149-162 (DOI: 10.1590/S1678-91992003000200002).
- Dillen S., Zels S., Verlinden H., Spit J., Van Wielendaele P., Broeck J.V., Vaudry H. (2013): Functional Characterization of the Short Neuropeptide F Receptor in the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *PLoS ONE* **8**, e53604 (DOI: 10.1371/journal.pone.0053604).
- Dostálková S., Dobeš P., Kunc M., Hurychová J., Škrabišová M., Petřivalský M., Titěra D., Havlík J., Hyršl P., Danihlík J. (2021): Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune responses than summer populations after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology* **224**, jeb.232595 (DOI: 10.1242/jeb.232595).
- Dubos R.J. (1939): Studies on Bactericidal Agent Extracted From a Soil *Bacillus*. *Journal of Experimental Medicine* **70**, 1-10 (DOI: 10.1084/jem.70.1.1).
- Duquesne S., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Rebuffat S. (2007): Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports* **24**, 708-734 (DOI: 10.1039/b516237h).
- Erlor S., Popp M., Lattorff H.M.G., Cordaux R. (2011): Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLoS ONE* **6**, e18126 (DOI: 10.1371/journal.pone.0018126).
- Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.-L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656 (DOI: 10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x).
- Fadda M., Hasakiogullari I., Temmerman L., Beets I., Zels S., Schoofs L. (2019): Regulation of Feeding and Metabolism by Neuropeptide F and Short Neuropeptide F in Invertebrates. *Frontiers in Endocrinology* **10**, 1-17 (DOI: 10.3389/fendo.2019.00064).
- Fennell J.F., Shipman W.H., Cole L.J. (1968): Antibacterial Action of Melittin, a Polypeptide from Bee Venom. *Experimental Biology and Medicine* **127**, 707-710 (DOI: 10.3181/00379727-127-32779).
- Finking R., Marahiel M.A. (2004): Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual Review of Microbiology* **58**, 453-488 (DOI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123615).
- Fontana R., Mendes M.A., de Souza B.M., Konno K., César L.M.M., Malaspina O., Palma M.S. (2004): Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* **25**, 919-928 (DOI: 10.1016/j.peptides.2004.03.016).
- Gäde G., Auerswald L. (2003): Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology* **132**, 10-20 (DOI: 10.1016/S0016-6480(03)00159-X).
- Gäde G., Hoffmann K.H., Spring J.H. (1997): Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews* **77**, 963-1032 (DOI: 10.1152/physrev.1997.77.4.963).
- Gáliková M., Klepsatel P., Xu Y., Kühnlein R.P. (2017): The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology* **119**, 1600138 (DOI: 10.1002/ejlt.201600138).
- Galizia C.G., Kreissl S. (2012): Neuropeptides in Honey Bees. In: *Honeybee Neurobiology and Behavior*, 1st ed., (Galizia G., Eisenhardt D., Giurfa M.), Springer Netherlands, Heidelberg,

- Německo, 211-226 (DOI kapitola: 10.1007/978-94-007-2099-2_17; ISBN: kniha: 978-94-007-2098-5).
- Géminard C., Rulifson E.J., Léopold P. (2009): Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **10**, 199-207 (DOI: 10.1016/j.cmet.2009.08.002).
- Gesell J., Zasloff M., Opella S.J. (1997): Two-dimensional ^1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *Journal of Biomolecular NMR* **9**, 127-135 (DOI: 10.1023/A:1018698002314).
- Goldsworthy G., Opoku-Ware K., Mullen L. (2002b): Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology* **48**, 601-608 (DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00085-9).
- Goldsworthy G.J., Kodrík D., Comley R., Lightfoot M. (2002a): A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology* **48**, 1103-1109 (DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00203-2).
- Goldsworthy G.J., Lee M.J., Luswata R., Drake A.F., Hyde D. (1997): Structures, Assays and Receptors for Locust Adipokinetic Hormones*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **117**, 483-496 (DOI: 10.1016/S0305-0491(97)00186-7).
- Gospocic J., Shields E.J., Glastad K.M., Lin Y., Penick C.A., Yan H., Mikheyev A.S., Linksvayer T.A., Garcia B.A., Berger S.L., Liebig J., Reinberg D., Bonasio R. (2017): The Neuropeptide Corazonin Controls Social Behavior and Caste Identity in Ants. *Cell* **170**, 748-759.e12 (DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.014).
- Grönke S., Clarke D.-F., Broughton S., Andrews T.D., Partridge L., Rulifson E. (2010): Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genetics* **6**, e1000857 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1000857).
- Grönke S., Mildner A., Fellert S., Tennagels N., Petry S., Müller G., Jäckle H., Kühnlein R.P. (2005): Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **1**, 323-330 (DOI: 10.1016/j.cmet.2005.04.003).
- Grönke S., Müller G., Hirsch J., Fellert S., Andreou A., Haase T., Jäckle H., Kühnlein R.P., O'Rahilly S. (2007): Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biology* **5**, e137 (DOI: 10.1371/journal.pbio.0050137).
- Hackenberger C. P. R., Schwarzer D. (2008): Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 10030-10074 (DOI: 10.1002/anie.200801313).
- Hahn M., Stachelhaus T. (2004): Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15585-15590 (DOI: 10.1073/pnas.0404932101).
- Hancock R.E.W. (2013): Bacterial/Antibiotic Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 77-157 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Hancock R.E.W., Chapple D.S. (1999): Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323 (DOI: 10.1128/AAC.43.6.1317).
- Hancock R.E.W., Sahl H.-G. (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* **24**, 1551-1557 (DOI: 10.1038/nbt1267).
- Heier C., Kühnlein R.P. (2018): Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **210**, 1163-1184 (DOI: 10.1534/genetics.118.301583).
- Hentze J.L., Carlsson M.A., Kondo S., Nässel D.R., Rewitz K.F. (2015): The Neuropeptide Allatostatin A Regulates Metabolism and Feeding Decisions in *Drosophila*. *Scientific Reports* **5**, 11680 (DOI: 10.1038/srep11680).
- Hergarden A.C., Tayler T.D., Anderson D.J. (2012): Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 3967-3972 (DOI: 10.1073/pnas.1200778109).

- Hertweck C. (2011): Biosynthesis and Charging of Pyrrolysine, the 22nd Genetically Encoded Amino Acid. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 9540-9541 (DOI: 10.1002/anie.201103769).
- Heudi O., Barteau S., Zimmer D., Schmidt J., Bill K., Lehmann N., Bauer C., Kretz O. (2008): Towards Absolute Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibody in Serum by LC-MS/MS Using Isotope-Labeled Antibody Standard and Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 4200-4207 (DOI: 10.1021/ac800205s).
- Ho C. S., Lam C. W., Chan M. H., Cheung R. C., Law L. K., Lit L. C., Ng K. F., Suen M. W., Tai H. L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist (Reviews)* **24**(1), 3-12 (PMCID: PMC1853331).
- Hong S.-H., Lee K.-S., Kwak S.-J., Kim A.-K., Bai H., Jung M.-S., Kwon O.-Y., Song W.-J., Tatar M., Yu K., Kapahi P. (2012): Minibrain/Dyrk1a Regulates Food Intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY Pathway in *Drosophila* and Mammals. *PLoS Genetics* **8**, e1002857 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002857).
- Hou Q.-L., Chen E.-H., Jiang H.-B., Wei D.-D., Gui S.-H., Wang J.-J., Smaghe G. (2017): Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol mobilization and sexual behavior in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **90**, 1-13 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.09.006).
- Hultmark D. (2003): *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* **15**, 12-19 (DOI: 10.1016/S0952-7915(02)00005-5).
- Chan Q.W.T., Howes C.G., Foster L.J. (2006): Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 2252-2262 (DOI: 10.1074/mcp.M600197-MCP200).
- Chen C., Jack J., Garofalo R.S. (1996): The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* **137**, 846-856 (DOI: 10.1210/endo.137.3.8603594).
- Chen J., Reiher W., Hermann-Luibl C., Sellami A., Cognigni P., Kondo S., Helfrich-Förster C., Veenstra J.A., Wegener C., Taghert P.H. (2016): Allatostatin A Signalling in *Drosophila* Regulates Feeding and Sleep and Is Modulated by PDF. *PLOS Genetics* **12**, e1006346 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1006346).
- Choi S., Lim D.-S., Chung J., Taghert P.H. (2015): Feeding and Fasting Signals Converge on the LKB1-SIK3 Pathway to Regulate Lipid Metabolism in *Drosophila*. *PLOS Genetics* **11**, e1005263 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1005263).
- Choi Y.J., Lee G., Hall J.C., Park J.H. (2005): Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. *The Journal of Comparative Neurology* **482**, 372-385 (DOI: 10.1002/cne.20419).
- Choi Y.S., Choo Y.M., Lee K.S., Yoon H.J., Kim I., Je Y.H., Sohn H.D., Jin B.R. (2008): Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 141-146 (DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.02.007).
- Chung B.Y., Ro J., Hutter S.A., Miller K.M., Guduguntla L.S., Kondo S., Pletcher S.D. (2017): *Drosophila* Neuropeptide F Signaling Independently Regulates Feeding and Sleep-Wake Behavior. *Cell Reports* **19**, 2441-2450 (DOI: 10.1016/j.celrep.2017.05.085).
- Ikeya T., Galic M., Belawat P., Nairz K., Hafen E. (2002): Nutrient-Dependent Expression of Insulin-like Peptides from Neuroendocrine Cells in the CNS Contributes to Growth Regulation in *Drosophila*. *Current Biology* **12**, 1293-1300 (DOI: 10.1016/S0960-9822(02)01043-6).
- Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F. (2009): Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **109**, 2455-2504 (DOI: 10.1021/cr800323s).
- Jiang H.-B., Gui S.-H., Xu L., Pei Y.-X., Smaghe G., Wang J.-J. (2017): The short neuropeptide F modulates olfactory sensitivity of *Bactrocera dorsalis* upon starvation. *Journal of Insect Physiology* **99**, 78-85 (DOI: 10.1016/j.jinsphys.2017.03.012).
- Jiang X., Yang J., Shen Z., Chen Y., Shi L., Zhou N. (2016): Agonist-mediated activation of *Bombyx mori* diapause hormone receptor signals to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through Gq-PLC-PKC-dependent cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **75**, 78-88 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2016.06.005).

- Johard H.A.D., Yoishii T., Dircksen H., Cusumano P., Rouyer F., Helfrich-Förster C., Nässel D.R. (2009): Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: Ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *The Journal of Comparative Neurology* **516**, 59-73 (DOI: 10.1002/cne.22099).
- Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984): Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations 1983). *European Journal of Biochemistry* **138**, 9-37 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb07877.x).
- Kahsai L., Kapan N., Dircksen H., Winther Å.M.E., Nässel D.R., Callaerts P. (2010): Metabolic Stress Responses in *Drosophila* Are Modulated by Brain Neurosecretory Cells That Produce Multiple Neuropeptides. *PLoS ONE* **5**, e11480 (DOI: 10.1371/journal.pone.0011480).
- Kastin, A.J. (2013): *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., Elsevier, San Diego, U.S.A., 2032 stran (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Kaufmann C., Merzendorfer H., Gäde G. (2009): The adipokinetic hormone system in *Culicinae* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 770-781 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.09.002).
- Kim Y.-J., Spalovska-Valachova I., Cho K.-H., Zitnanova I., Park Y., Adams M.E., Zitnan D. (2004): Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 6704-6709 (DOI: 10.1073/pnas.0305291101).
- King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **11**, 942-950 (DOI: 10.1016/S1044-0305(00)00163-X).
- Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., Schindler C.W. (2002): Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24 (DOI: 10.1016/S0378-1119(02)00398-0).
- Kitts D., Weiler K. (2003): Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design* **9**, 1309-1323 (DOI: 10.2174/1381612033454883).
- Kodíček M. (2007a): Modifikace kotranslační. *Biochemické pojmy*. Výkladový slovník. VŠCHT Praha, Česká republika (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=modifikace_kotranslacni – cit. 9. 1. 2021).
- Kodíček M. (2007b): Modifikace posttranslační. *Biochemické pojmy*. Výkladový slovník. VŠCHT Praha, Česká republika (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=modifikace_posttranslacni – cit. 9. 1. 2021).
- Kodíček M. (2007c): Modifikace posttranskripční. *Biochemické pojmy*. Výkladový slovník. VŠCHT Praha, Česká republika (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=modifikace_posttranskripcni – cit. 9. 1. 2021).
- Kodíček M. (2007d): Čepička mRNA. *Biochemické pojmy*. Výkladový slovník. VŠCHT Praha, Česká republika (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=cepicka_mrna – cit. 9. 1. 2021).
- Kodřík D. (2017): Přehled hmyzích hormonů a jejich úloha ve stresových situacích. *Moderní včelař*, **14**, 40-43 (ISSN: 1214-5793).
- Kodřík, D. (2014): Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu. *Živa* **62**, 206-208 (ISSN: 0044-4812).
- Konopińska D., Rosiński G., Sobótka W. (1992): Insect peptide hormones, an overview of the present literature. *International Journal of Peptide and Protein Research* **39**, 1-11 (DOI: 10.1111/j.1399-3011.1992.tb01548.x).
- Kopeć S. (1922): Studies on the Necessity of the Brain for the Inception of Insect Metamorphosis. *The Biological Bulletin* **42**, 323-342 (DOI: 10.2307/1536759).
- Korhonen H. (2009): Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* **1**, 177-187 (DOI: 10.1016/j.jff.2009.01.007).
- Korhonen H., Pihlanto A. (2003): Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design* **9**, 1297-1308 (DOI: 10.2174/1381612033454892).

- Kubrak O.I., Lushchak O.V., Zandawala M., Nässel D.R. (2016): Systemic corazonin signalling modulates stress responses and metabolism in *Drosophila*. *Open Biology* **6**, 160152 (DOI: 10.1098/rsob.160152).
- Kwak S.-J., Hong S.-H., Bajracharya R., Yang S.-Y., Lee K.-S., Yu K., Wolfe A. (2013): *Drosophila* Adiponectin Receptor in Insulin Producing Cells Regulates Glucose and Lipid Metabolism by Controlling Insulin Secretion. *PLoS ONE* **8**, e68641 (DOI: 10.1371/journal.pone.0068641).
- Lassoued I., Mora L., Barkia A., Aristoy M.-C., Nasri M., Toldrá F. (2015): Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics* **128**, 8-17 (DOI: 10.1016/j.jprot.2015.06.016).
- Laws K.M., Sampson L.L., Drummond-Barbosa D. (2015): Insulin-independent role of adiponectin receptor signaling in *Drosophila* germline stem cell maintenance. *Developmental Biology* **399**, 226-236 (DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.12.033).
- Lemaitre B., Kromer-Metzger E., Michaut L., Nicolas E., Meister M., Georgel P., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1995): A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9465-9469 (DOI: 10.1073/pnas.92.21.9465).
- Lindemans M., Liu F., Janssen T., Husson S.J., Mertens I., Gade G., Schoofs L. (2009): Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1642-1647 (DOI: 10.1073/pnas.0809881106).
- Lorenz M.W., Kellner R., Woodring J., Hoffmann K.H., Gäde G. (1999): Hypertrehalosaemic peptides in the honeybee (*Apis mellifera*): purification, identification and function. *Journal of Insect Physiology* **45**, 647-653 (DOI: 10.1016/S0022-1910(98)00158-9).
- Lourenço A.P., Guidugli-Lazzarini K.R., Freitas F.C.P., Bitondi M.M.G., Simões Z.L.P. (2013): Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 474-482 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.03.001).
- Mahlpuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. (2016): Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **6**, 194 (DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194).
- Malendowicz L. (2013): Endocrine Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 983-1044 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- 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* (DOI: 10.1007/s00018-021-03784-z).
- Matsubayashi Y. (2013): Plant Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 1-76 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Mohanty D., Jena R., Choudhury P.K., Pattnaik R., Mohapatra S., Saini M.R. (2015): Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Food Properties* **19**, 837-846 (DOI: 10.1080/10942912.2015.1048356).
- Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J. (2008): Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition* **47**, 171-182 (DOI: 10.1007/s00394-008-0710-2).
- Moody T. (2013): Cancer/Anticancer Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 489-563 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Moss G.P., Smith P.A.S., Tavernier D. (1995): Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry* **67**, 1307-1375 (DOI: 10.1351/pac199567081307).
- Murray R.K. (2002): *Harperova Biochemie*. 23rd ed. (4. české vydání). H & H, Jinočany, Česká republika, 872 stran (ISBN: 8073190133).
- Nachman R.J. (2013): Invertebrate Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 185-320 (ISBN: 978-0-12-385095-9).

- Nässel D.R., Broeck J.V. (2015): Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 271-290 (DOI: 10.1007/s00018-015-2063-3).
- Nässel D.R., Enell L.E., Santos J.G., Wegener C., Johard H.A.D. (2008): A large population of diverse neurons in the *Drosophila* central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neuroscience* **9**, 90 (DOI: 10.1186/1471-2202-9-90).
- Ng T.B. (2013): Fungal Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 157-185 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- 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**, 464-472 (DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001).
- Nilsson B.L., Soellner M.B., Raines R.T. (2005): Chemical Synthesis of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **34**, 91-118 (DOI: 10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700).
- Ong S.-E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002): Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 376-386 (DOI: 10.1074/mcp.M200025-MCP200).
- Onken H., Moffett S.B., Moffett D.F. (2004): The anterior stomach of larval mosquitoes (*Aedes aegypti*): effects of neuropeptides on transepithelial ion transport and muscular motility. *Journal of Experimental Biology* **207**, 3731-3739 (DOI: 10.1242/jeb.01208).
- Oppenheim J. (2013): Immune/Inflammatory Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 625-715 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- O'Shea M., Witten J., Schaffer M. (1984): Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence of an invertebrate peptide family. *The Journal of Neuroscience* **4**, 521-529 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.04-02-00521.1984).
- Oudejans R.C.H.M., Harthoorn L.F., Diederik J.H.B., Van der Horst D.J. (1999): Adipokinetic Hormones: Coupling between Biosynthesis and Release. *Annals of the New York Academy of Sciences* **897**, 291-299 (DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07900.x).
- Oudejans R.C.H.M., Mes T.H.M., Kooiman F.P., Van Der Horst D.J. (1993): Adipokinetic peptide hormone content and biosynthesis during locust development. *Peptides* **14**, 877-881 (DOI: 10.1016/0196-9781(93)90062-L).
- Park Y., Kim Y.-J., Adams M.E. (2002): Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 11423-11428 (DOI: 10.1073/pnas.162276199).
- Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. (2011): Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology* **32**, 143-171 (DOI: 10.3109/07388551.2011.594423).
- Phoenix D.A., Dennison S.R., Harris F. (2013): Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. In: *Antimicrobial peptides*. 1st ed., (Phoenix D.A., Dennison S.R., Harris F.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Německo, 1-37 (DOI: kapitola: 10.1002/9783527652853.ch1; ISBN: kniha: 9783527332632).
- Pirtskhalava M., Armstrong A.A., Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D.E., Tartakovsky M. (2021): DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research* **49**, D288-D297 (DOI: 10.1093/nar/gkaa991).
- Predel R., Neupert S. (2007): Social behavior and the evolution of neuropeptide genes: lessons from the honeybee genome. *BioEssays* **29**, 416-421 (DOI: 10.1002/bies.20571).
- Przybylski R., Firdaus L., Châtaigné G., Dhulster P., Nedjar N. (2016): Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry* **211**, 306-313 (DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.074).

- Radford J.C., Davies S.A., Dow J.A.T. (2002): Systematic G-protein-coupled Receptor Analysis in *Drosophila melanogaster* Identifies a Leucokinin Receptor with Novel Roles. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 38810-38817 (DOI: 10.1074/jbc.M203694200).
- Rajan A., Perrimon N. (2012): *Drosophila* Cytokine Unpaired 2 Regulates Physiological Homeostasis by Remotely Controlling Insulin Secretion. *Cell* **151**, 123-137 (DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.019).
- Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M.J., Albert S., Tautz J., Beier H. (2008): Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**, 155-167 (DOI: 10.1002/arch.20269).
- Reiher W., Shirras C., Kahnt J., Baumeister S., Isaac R.E., Wegener C. (2011): Peptidomics and Peptide Hormone Processing in the *Drosophila* Midgut. *Journal of Proteome Research* **10**, 1881-1892 (DOI: 10.1021/pr101116g).
- Ren G.R., Hauser F., Rewitz K.F., Kondo S., Engelbrecht A.F., Didriksen A.K., Schjøtt S.R., Sembach F.E., Li S., Søgaard K.C., Søndergaard L., Grimmikhuijzen C.J.P., Blenau W. (2015): CCHamide-2 Is an Orexigenic Brain-Gut Peptide in *Drosophila*. *PLOS ONE* **10**, e0133017 (DOI: 10.1371/journal.pone.0133017).
- Richard F.-J., Holt H.L., Grozinger C.M. (2012): Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **13**, 558 (DOI: 10.1186/1471-2164-13-558).
- Romanelli A., Moggio L., Montella R.C., Campiglia P., Iannaccone M., Capuano F., Pedone C., Capparelli R. (2011): Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science* **17**, 348-352 (DOI: 10.1002/psc.1316).
- Root C. M., Ko K. I., Jafari A., Wang J. W. (2011): Presynaptic Facilitation by Neuropeptide Signaling Mediates Odor-Driven Food Search. *Cell* **145**, 133-144 (DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.008).
- Royet J., Reichhart J.-M., Hoffmann J.A. (2005): Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology* **17**, 11-17 (DOI: 10.1016/j.coi.2004.12.002).
- Sabatier J.-M. (2013): Venom Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 407-488 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Saito H., Takeuchi Y., Takeda R., Hayashi Y., Watanabe K., Shin M., Imai K., Isobe M., Yamashita O. (1994): The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides* **15**, 1173-1178 (DOI: 10.1016/0196-9781(94)90139-2).
- Sánchez A., Vázquez A. (2017): Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* **1**, 29-46 (DOI: 10.1093/fqs/fyx006).
- Sano H., Nakamura A., Texada M.J., Truman J.W., Ishimoto H., Kamikouchi A., Nibu Y., Kume K., Ida T., Kojima M., Taghert P.H. (2015): The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics* **11**, e1005209 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1005209).
- Sato Y., Oguchi M., Menjo N., Imai K., Saito H., Ikeda M., Isobe M., Yamashita O. (1993): Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 3251-3255 (DOI: 10.1073/pnas.90.8.3251).
- Scarborough R.M., Jamieson G.C., Kalish F., Kramer S.J., McEnroe G.A., Miller C.A., Schooley D.A. (1984): Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the *corpora cardiaca* of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 5575-5579 (DOI: 10.1073/pnas.81.17.5575).
- Sha K., Choi S.-H., Im J., Lee G.G., Loeffler F., Park J.H., Johnson E.C. (2014): Regulation of Ethanol-Related Behavior and Ethanol Metabolism by the Corazonin Neurons and Corazonin Receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **9**, e87062 (DOI: 10.1371/journal.pone.0087062).

- Shia A.K.H., Glittenberg M., Thompson G., Weber A.N., Reichhart J.-M., Ligoxygakis P. (2009): Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *Journal of Cell Science* **122**, 4505-4515 (DOI: 10.1242/jcs.049155).
- Shin S.W., Kokoza V., Bian G., Cheon H.-M., Kim Y.J., Raikhel A.S. (2005): REL1, a Homologue of *Drosophila* Dorsal, Regulates Toll Antifungal Immune Pathway in the Female Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16499-16507 (DOI: 10.1074/jbc.M500711200).
- Schoofs L., Holman G.M., Proost P., Van Damme J., Hayes T.K., De Loof A. (1992): Locustakinin, a novel myotropic peptide from *Locusta migratoria*, isolation, primary structure and synthesis. *Regulatory Peptides* **37**, 49-57 (DOI: 10.1016/0167-0115(92)90063-Z).
- Siegert K., Morgan P., Mordue W. (1985): Primary Structures of *Locust* Adipokinetic Hormones II. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **366**, 723-728 (DOI: 10.1515/bchm3.1985.366.2.723).
- Singh B.P., Vij S., Hati S. (2014): Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* **54**, 171-179 (DOI: 10.1016/j.peptides.2014.01.022).
- Socha R., Kodrík D., Zemek R. (1999): Adipokinetic Hormone Stimulates Insect Locomotor Activity. *Naturwissenschaften* **86**, 85-86 (DOI: 10.1007/s001140050577).
- Song W., Veenstra J. A., Perrimon N. (2014): Control of Lipid Metabolism by Tachykinin in *Drosophila*. *Cell Reports* **9**, 40-47 (DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.060).
- Steiner H., Hultmark D., Engström Å., Bennich H., Boman H.G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248 (DOI: 10.1038/292246a0).
- Stevens R.D., Hillman S.L., Worthy S., Sanders D., Millington D.S. (2000): Assay for Free and Total Carnitine in Human Plasma Using Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **46**, 727-729 (DOI: 10.1093/clinchem/46.5.727).
- Stokvis E., Rosing H., López-Lázaro L., Schellens J.H.M., Beijnen J.H. (2004): Switching from an analogous to a stable isotopically labeled internal standard for the LC-MS/MS quantitation of the novel anticancer drug Kahalalide F significantly improves assay performance. *Biomedical Chromatography* **18**, 400-402 (DOI: 10.1002/bmc.392).
- Stránská E. (2007): *Izolace antimikrobiálních peptidů a proteinů z hemolymfy hmyzu a jejich charakterizace pomocí hmotnostní spektrometrie*. Diplomová práce, UK v Praze, Praha, Česká republika.
- Štern P. (2011): *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2. vydání. Karolinum, Praha, Česká republika, 268 stran (ISBN: 978-80-246-1979-8).
- 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**, 1236-1241 (DOI: 10.1016/j.biochi.2010.02.023).
- Taylor T.D., Pacheco D.A., Hergarden A.C., Murthy M., Anderson D.J. (2012): A neuropeptide circuit that coordinates sperm transfer and copulation duration in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 20697-20702 (DOI: 10.1073/pnas.1218246109).
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium – THGSC (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931-949 (DOI: 10.1038/nature05260).
- Toprak U. (2020): The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. *Frontiers in Physiology* **11**, 434 (DOI: 10.3389/fphys.2020.00434).
- Udenigwe C.C., Gong M., Wu S. (2013): *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry* **48**, 1794-1799 (DOI: 10.1016/j.procbio.2013.08.013).
- Vagenina I.V., Kozlovsky E.A., Mustaeva L.G., Gorbunova E.Y., Baru M.B. (1999): Size exclusion chromatography of polypeptides on Bio-Gel P2 in the dynamic axial compression mode. *Journal of Chromatography A* **840**, 281-288 (DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00238-1).
- Van der Horst D.J. (2003): Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **136**, 217-226 (DOI: 10.1016/S1096-4959(03)00151-9).

- Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A., Diederens J.H.B. (2001): Adipokinetic hormones of insect: Release, signal transduction, and responses. *International Review of Cytology* **211**, 179-240 (DOI: 10.1016/S0074-7696(01)11019-3).
- Van Epps H.L. (2006): René Dubos: unearthing antibiotics. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 259-259 (DOI: 10.1084/jem.2032fta).
- vanEngelsdorp D., Meixner M.D. (2010): A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80-S95 (DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011).
- Vaudry H. (2013): Brain Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 715-983 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R., Withers S.G. (2001): Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**, 835-838 (DOI: 10.1038/35090602).
- Wang B., Goode J., Best J., Meltzer J., Schilman P.E., Chen J., Garza D., Thomas J.B., Montminy M. (2008): The Insulin-Regulated CREB Coactivator TORC Promotes Stress Resistance in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **7**, 434-444 (DOI: 10.1016/j.cmet.2008.02.010).
- Wang B., Moya N., Niessen S., Hoover H., Mihaylova M. M., Shaw R. J., Yates J. R., Fischer W. H., Thomas J. B., Montminy M. (2011): A Hormone-Dependent Module Regulating Energy Balance. *Cell* **145**, 596-606 (DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.013).
- Wang W., de Mejia E.G. (2005): A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **4**, 63-78 (DOI: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x).
- Werner T., Borge-Renberg K., Mellroth P., Steiner H., Hultmark D. (2003): Functional Diversity of the *Drosophila* PGRP-LC Gene Cluster in the Response to Lipopolysaccharide and Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 26319-26322 (DOI: 10.1074/jbc.C300184200).
- Woods S. C. (2013): Ingestive Peptides. In: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed., (Kastin A. J.), Elsevier, San Diego, U.S.A., 1045-1167 (ISBN: 978-0-12-385095-9).
- Wu Q., Brown M.R. (2006): Signaling and Functions of Insulin-Like Peptides in Insects. *Annual Review of Entomology* **51**, 1-24 (DOI: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151011).
- Wu Q., Zhao Z., Shen P. (2005): Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y – and insulin-like systems. *Nature Neuroscience* **8**, 1350-1355 (DOI: 10.1038/nn1540).
- Xu P., Shi M., Chen X.-X., Ausubel F.M. (2009): Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. *PLoS ONE* **4**, e4329 (DOI: 10.1371/journal.pone.0004239).
- Xu W.-H., Sato Y., Ikeda M., Yamashita O. (1995): Stage-dependent and Temperature-controlled Expression of the Gene Encoding the Precursor Protein of Diapause Hormone and Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3804-3808 (DOI: 10.1074/jbc.270.8.3804).
- Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55 (DOI: 10.1124/pr.55.1.2).
- Yeoh J.G.C., Pandit A.A., Zandawala M., Nässel D.R., Davies S.-A., Dow J.A.T. (2017): DINeR: Database for Insect Neuropeptide Research. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **86**, 9-19 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.05.001).
- Yoon J.G., Stay B. (1995): Immunocytochemical localization of *Diploptera punctata* allatostatin-like peptide in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology* **363**, 475-488 (DOI: 10.1002/cne.903630310).
- Yurgel M.E., Kakad P., Zandawala M., Nässel D.R., Godenschwege T.A., Keen A.C., Shaw, P. (2019): A single pair of leucokinin neurons are modulated by feeding state and regulate sleep-metabolism interactions. *PLoS Biology* **17**, e2006409 (DOI: 10.1371/journal.pbio.2006409).
- Zandawala M., Yurgel M.E., Texada M.J., Liao S., Rewitz K.F., Keene A.C., Nässel D.R., Schoofs L. (2018): Modulation of *Drosophila* post-feeding physiology and behavior by the neuropeptide leucokinin. *PLoS Genetics* **14**, e1007767 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1007767).
- Zasloff M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5449-5453 (DOI: 10.1073/pnas.84.15.5449).

- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395 (DOI: 10.1038/415389a).
- Zeya H.I., Spitznagel J.K. (1963): Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification. *Science* **142**, 1085-1087 (DOI: 10.1126/science.142.3595.1085).
- Zhang L.-Y., Gallo R.L. (2016): Antimicrobial peptides. *Current Biology* **26**, R14-R19 (DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.017).
- Zhang Q., Simpson J. and Aboleneen H.I. (1997): A Specific Method for the Measurement of Tacrolimus in Human Whole Blood by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* **19**, 470-476 (DOI: 10.1097/00007691-199708000-00018).
- Zhang T.-Y., Sun J.-S., Zhang Q.-R., Xu J., Jiang R.-J., Xu W.-H. (2004): The diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide gene of *Helicoverpa armigera* encodes multiple peptides that break, rather than induce, diapause. *Journal of Insect Physiology* **50**, 547-554 (DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.03.011).
- Zhao Y., Bretz C.A., Hawksworth S.A., Hirsh J., Johnson E.C., Nitabach M.N. (2010): Corazonin Neurons Function in Sexually Dimorphic Circuitry That Shape Behavioral Responses to Stress in *Drosophila*. *PLoS ONE* **5**, e9141 (DOI: 10.1371/journal.pone.0009141).

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

aaRS	aminoacyl-tRNA synthetasa
AC	adenylátcyklasa
ACC	acetyl-CoA carboxylase (acetyl-CoA karboxylasa)
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ACN	acetonitril
Adip	adiponektin
AdipR	receptor Adip
AKH	adipokinetický hormon
AKHR	receptor AKH
AMK	aminokyseliny
AMP	adenosinmonofosfát
AmP	antimikrobiální peptid
<i>Apm</i> -AKH	adipokinetický hormon <i>Apis mellifera</i>
APRP	AKH precursor-related peptide (peptid podobný prekurzoru AKH)
AstA	allatostatin-A
ATGL	adipose triglyceride lipase (savčí adipózní triglyceridová lipasa)
bmmL	brummer lipasa
CACTUS	nukleární transkripční faktor kappa B = NF- κ B
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCHa2	CCH-amid-2
CREB	transkripční faktor cAMP response element-binding protein
Crz	corazonin
CrzR	receptor Crz
Cyk	cytokin (adipokin)

Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti biomolekul)
DAG	diacylglycerol
DAP-PGN	peptidoglykan obsahující kyselinu diaminopimelovou
DAR2	Ast-A receptor 2 přítomný v hmyzím rodu <i>Drosophila</i>
DH-PBAN	diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (hormon způsobující diapauzu a také aktivaci biosyntézy hmyzích feromonů)
DHR	diapause hormone receptor (receptor DH-PBAN)
Dif	dorsal-related immune factor (imunitní faktor příbuzný dorsal-proteinu)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dom	domeless (př. domeless receptor)
dsRNA	double-stranded (dvouvláknová) RNA
DTT	dithiotreitol
ERK	mimobuněčná signálem regulovaná kinasa
ESI-MS	electrospray ionisation-mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace elektrosprejem)
FA	kyselina mravenčí
FAS	fatty acid synthase (syntasa mastných kyselin)
foxO	transkripční faktor Forkhead Box Class O
g	gravitační zrychlení
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
GNBP3	Gram-negative binding protein 3
GPCR	G-protein-coupled receptor (receptor spřažený s G-proteinem)
Grass	serinová proteasa „Grass“

HPH	hmyzí peptidový hormon
IEC	Ion-exchange chromatography (Iontoměničová chromatografie)
ILP	insulin-like peptide (peptidový hormon podobný insulinu)
IMD	imunitní deficiencie
ImdP	immune deficiency protein
InR	insulinový receptor
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
IP ₃ R	receptor IP ₃
IPCs	insuline-producing cells (buňky produkující insulin)
IT	analyzátor zvaný iontová past
JAK	Janus kinasa
JAK	Janus-tyrosinkinasa
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
kPa	kilopascal (jednotka tlaku)
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (metoda kapalinové chromatografie propojené s hmotnostní spektrometrií)
Lk	leukokinin
LPS	lipopolysacharid
Lst	limostatin
LTA	lipoteichoová kyselina
MALDI	„matrix-assisted laser desorption ionization“ (laserová desorpční ionizace vzorku s pomocí matrice) – odlišný způsob ionizace od ESI
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein
mmol.L ⁻¹	milimol na litr (jednotka koncentrace)

Mnb/Dyrk1a	enzym minibrain/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1a
ModSP	serine protease-like protein
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (také messenger RNA)
mV	milivolt
NF- κ B	inhibitor nukleárního transkripčního faktoru kappa B
NF- κ B	nukleární transkripční faktor kappa B
NPF	neuropeptid F
NRPSs	neribosomalní peptidová syntetasa
PAK	cAMP-dependentní proteinkinasa A
PCP	peptidyl carrier protein
PGRP	peptidoglycan recognition protein (protein rozpoznávající peptidoglykan)
PGRP-LC	peptidoglycan-recognition protein LC (LC-protein rozpoznávající peptidoglykan)
pI	izoelektrický bod
PI ₃ K	fosfoinositid-3-kinasa
PIAS	protein inhibitor of activated STAT (inhibitor aktivovaného komplexu STAT na bázi proteinu)
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-difosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
Qq TOF analyzátořem	tandemový systém dvou kvadrupólů spojených s TOF analyzátořem
QqQ	tandemový systém tří spolu propojených kvadrupólů

RNA	ribonukleová kyselina
RP-LC	reversed-phase liquid chromatography (chromatografie s reverzní fází)
RP-nLC	kapalinová chromatografie na reverzní fází v nanokapilárním provedení
SAX	strong anionic exchange (silná aniontová výměna)
SCX	strong cationic exchange (silná kationtová výměna)
SEC	„size-exclusion“ chromatography (chromatografie dělicí molekuly v závislosti na jejich molekulové hmotnosti)
SIK3	Salt-Inducible kinase 3 (enzym patřící do skupiny AMP-dependentních kinas)
sNPF	short neuropeptide F (krátký neuropeptid F)
SOCS	suppressor of cytokine signalling (inhibitor cytokinové signalizace)
Spätzle	molekula proteinové povahy podobající se cytokinu
ssRNA	single-stranded (jednovláknová) RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription (signální transduktor a aktivátor transkripce)
TAG	triacylglycerol (také triglycerid)
TCA	trichloroctová kyselina
TFA	trifluoroctová kyselina
TGL	triglyceridová lipasa
Tk	tachykinin
TLR	toll-like receptor
TOF analyzátor	„time of flight“ analyzátor zaznamenávající specifické vlastnosti iontů (hodnota m/z) v závislosti na době jejich letu tímto analyzátozem

Tot	turandot, turandot-related (příbuzné turandotu) (př. turandot-related gen)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Upd	unpaired (př. unpaired protein)
UPD1	unpaired 1 – izoforma UPD2
UPD2	unpaired 2 hmyzí hormon patřící do skupiny Cyks
WAX	weak anionic exchange (slabá aniontová výměna)
WCX	weak cationic exchange (slabá kationtová výměna)