

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Mechanismy virulence houby *Pseudogymnoascus destructans*
– původce syndromu bílého nosu netopýrů**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Lucia Hronková
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Kombinovaná
Vedoucí práce:	Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.
Rok:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Mgr. Lucia Hronková
Název práce	Mechanismy virulence houby <i>P. destructans</i> -původce syndromu bílého nosu netopýrů
Typ práce	Rigorózní
Pracoviště	Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav AV ČR
Vedoucí práce	Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Syndrom bílého nosu (white-nose syndrom, WNS) je plísňové infekční onemocnění hibernujících netopýrů způsobené houbou *Pseudogymnoascus destructans*, která je odpovědná za devastující pokles populace netopýrů v Severní Americe. Předložená rigorózní práce se soustředí v teoretické části na shrnutí dosavadních poznatků o WNS, plísni *P. destructans*, principech autofluorescence a principu použitých metod. V experimentální části se tato práce zabývá identifikací fluorescenčních proteinů spojených s WNS pomocí konfokální mikroskopie, chromatografie na tenké vrstvě, elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Pomocí konfokální mikroskopie byla zjištěna emisní maxima zdravé a postižené tkáně. Jedno z emisních maxim odpovídalo svou vlnovou délkou riboflavinu, který však ve vzorku křídla netopýra pozitivního na WNS u tenkovrstvé chromatografie detekován nebyl. SDS-PAGE byla vybrána pro detekci fluorescenčních vysokomolekulárních látek, které se ve vzorku buď nevyskytovaly nebo byl jejich signál překryt nadbytkem kolagenů a keratinů, jejichž přítomnost byla potvrzena pomocí LC-MS.

Klíčová slova	Syndrom bílého nosu, fluorescence, léze
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Mgr. Lucia Hronková
Title of thesis	Mechanisms of virulence of <i>P. destructans</i> -the causal agent of white-nose syndrome
Type of thesis	Rigorosis
Department	Laboratory of genetics and fungal metabolism
Supervisor	Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.
They year of presentation	2022


Abstract

White-nose syndrome (WNS) is a fungal infectious disease of hibernating bats caused by the fungus *Pseudogymnoascus destructans*, which is responsible for a devastating decline in bat populations in North America. The presented rigorous work focuses in the theoretical part on summarizing the current knowledge about WNS, the fungus *P. destructans*, the principles of autofluorescence and the principles of the methods used. In the experimental part, this work deals with the identification of fluorescent proteins associated with WNS using confocal microscopy, thin layer chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and liquid chromatography with mass detection (LC-MS). Using confocal microscopy, the emission maxima of healthy and affected tissue were determined. One of the emission maxima corresponded with its wavelength to riboflavin, which, however, was not detected in the WNS-positive bat wing sample by thin-layer chromatography. SDS-PAGE was chosen for the detection of fluorescent high molecular weight substances that were either not present in the sample or their signal was covered by an excess of collagens and keratins, the presence of which was confirmed by LC-MS.

Key words	White-nose syndrome, fluorescence, lesions
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci, dne 1. 11. 20222



.....
Podpis studenta

Děkuji svému školiteli Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. a týmu Laboratoře genetiky a metabolismu hub Mikrobiologického ústav AV ČR za podporu a za možnost pracovat na tak zajímavém tématu. Děkuji prof. Mgr. Marku Petřivalskému, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu. Děkuji prof. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc. a jeho týmu z Laboratoře proteomiky Fyziologického ústavu AV ČR. Děkuji RNDr. Tomáši Řezankovi, CSc., DSc. za inspirativní námět a podporu. Děkuji Mgr. Lence Fikejzlové a pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za podporu. Děkuji svému otci RNDr. Jaromíru Hronkovi, CSc., že mi ukázal svět přírodních věd, jehož jsem mohla být i díky němu alespoň na chvíli součástí. Jeho vášeň pro vědu, nadšení pro hledání informací, smysl pro logiku a ochota k diskuzi o jakémkoliv tématu jsou pro mě celoživotní inspirací.

OBSAH

CÍLE PRÁCE

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Syndrom bílého nosu.....	2
2.2	Původ onemocnění	3
2.3	Patogeneze onemocnění	6
2.4	Hibernace.....	8
2.5	Charakteristika <i>P. destructans</i>	9
2.6	Biochemické a imunologické ukazatele WNS	10
2.6.1	Riboflavin.....	10
2.6.2	Oxid uhličitý	11
2.6.3	Imunologické ukazatele	12
2.7	Využití autofluorescence při studiu fyziologie živočichů.....	14
2.8	Použité metody a jejich charakteristika.....	16
2.8.1	Fluorescenční mikroskopie	16
2.8.2	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)	17
2.8.3	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	19
2.8.4	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1	Materiál	22
3.1.1	Biologický materiál	22
3.1.2	Použité chemikálie	22
3.1.3	Roztoky	23
3.1.4	Přístrojové vybavení.....	24
3.1.5	Materiál	25
3.1.6	Softwarové vybavení.....	25
3.1.7	Databáze.....	25
3.2	Použité metody	25
3.2.1	Fluorescenční mikroskopie	25
3.2.2	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	25
3.2.3	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)	27

3.2.4	1D elektroforéza.....	27
3.2.5	Štěpení proteinů v gelu (SDS-PAGE) trypsinem po odbarvení Coomassie Blue.....	30
3.2.6	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS).....	31
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Detekce fluoreskujících látek v křídlech infikovaných netopýřů metodou konfokální mikroskopie.....	34
4.2	Analýza fluoreskujících látek metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	35
4.3	Separace a detekce proteinů z extraktů netopýřích křídel metodou SDS-PAGE.....	35
4.4	Identifikace proteinů metodou kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).....	37
5	DISKUZE	39
6	ZÁVĚR	43
7	LITERATURA.....	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	49

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této rigorózní práce bylo shrnout poznatky o syndromu bílého nosu, o původu onemocnění spočívajícího v infekci psychrofilní houbou *P. destructans* a o etiologii a patogenezí choroby, která napadá netopýry během období hibernace. Syndrom bílého nosu je považován za jednu z nejhorších chorob divoké zvěře, která zabíjí a v současnosti stále decimuje miliony netopýrů v celé Severní Americe, jejíž efektivní léčba není dosud známa. Poslední část teoretického úvodu je věnována použitým metodám a jejich charakteristice.

Cílem experimentální části rigorózní práce bylo identifikovat fluorescenční proteiny spojené s WNS, v rámci autofluorescence lokalizovat a separovat fluorescenční sloučeniny a určit jejich spektra. Současně s tím se pokusit objasnit jejich patofyziologické funkce.

1 ÚVOD

White-nose syndrom neboli WNS je onemocnění způsobené plísní *P. destructans*, které jen na východě Spojených států amerických do dnešního dne zabilo stovky tisíc netopýrů. Dosavadní studie naznačují, že WNS způsobil nejdramatičtější pokles celkové populace volně žijících živočichů v Severní Americe za posledních 100 let, což může mít hrozivé důsledky pro životní prostředí. WNS byl nalezen u netopýrů v Evropě, Americe i Asii. Vzhledem k tomu, že netopýři nemigrují mezi světadily, je více než pravděpodobné, že byla plíseň do Severní Ameriky zavlečena lidmi, pravděpodobně návštěvníky jeskyní. Tento model připomíná styl šíření nemocí, který byl pozorován při kolonizaci Ameriky obyvateli Evropy, jejichž příchod negativně ovlivnil dosavadní mortalitu indiánského obyvatelstva.

Netopýři představují asi pětinu všech savců na Zemi a jsou důležití pro ekosystém. Jsou to predátoři nočního hmyzu, včetně mnoha škůdců plodin a lesů. Hrají klíčovou roli při opylování rostlin, diseminaci semen a v jeskynních ekosystémech. Trus netopýrů poskytuje životně důležité živiny a je často základem potravního řetězce jeskyně. Netopýři exkrementy jsou používány mikroorganismy a bezobratlými, kteří se zase stávají potravou pro ryby, mloky, žáby a další větší zvířata. Netopýři jsou rovněž potravou pro jiná zvířata, včetně jestřábů, mývalů, skunků a sov. Veřejnost a někteří politici však stále považují prudký pokles počtu netopýrů pouze za zájem akademické obce. Analýzy naznačují, že vzhledem k masovému vymírání netopýrů v Severní Americe by mohly být zemědělské ztráty odhadované na výši 3,7 až 53 miliard dolarů ročně. Dle odhadů jediná kolonie 150 netopýrů hnědých (*Eptesicus fuscus*) zkonsumuje téměř 1,3 milionu hmyzu za rok. Vzhledem k tomu, že mizí přirozený nepřítel hmyzu, můžeme očekávat, že v zemědělství bude nutné tyto ztráty kompenzovat používáním dražších a nebezpečnějších insekticidů. Netopýři také hrají významnou roli nejen v zemědělství, ale i ve vědě a v medicíně. Výzkum prováděný na netopýrech vedl k pokrokům ve výzkumu sonaru, vývoji vakcín, antikoagulaci krve a dalších.

Netopýři jsou ale také rezervoárem pro mnoho infekčních agens, včetně parazitů, bakterií, virů a hub. Primárními zoonotickými chorobami spojenými se severoamerickými netopýry jsou vzteklina, histoplasmóza, salmonelóza a yersinióza. Importování netopýřů mohou nést i řadu zoonotických virů včetně viru Nipah, Hendra, Ebola, koronaviru SARS a dalších, které mohou způsobit závažné a fatální onemocnění u jiných zvířat a lidí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Syndrom bílého nosu

Plísňové choroby volně žijících živočichů jsou celosvětově čím dál více rozšířené. Na rozdíl od virových a bakteriálních patogenů, které často vedou k systémovým infekcím, se fungální patogeny u živočichů často projevují jako povrchové kožní infekce. Je tomu tak zejména u poikilotermických druhů, jejichž tělesná teplota se mění s teplotou prostředí. Syndrom bílého nosu je patogenní kožní onemocnění hibernujících netopýřů způsobené plísní *P. destructans*. Tato nemoc je odpovědná za devastující pokles populace netopýřů v Severní Americe. Minnis & Lindner (2013) navrhli změnu její taxonomické klasifikace *Geomyces* na *Pseudogymnoascus destructans* na základě fylogenetické analýzy východoamerických izolátů *Geomyces* (Warnecke et al., 2012; Silvani et al., 2018).

Plíseň decimuje populace nearktických netopýřů vyskytujících se v Severní Americe, ale u palearktických druhů vyskytujících se Evropě, na severu Asie a v severní Africe se tento mikroorganismus neprojevuje tak vysokou letalitou (Frick et al., 2016; Reeder et al., 2012; Martínková et al., 2018). WNS byl poprvé zdokumentován na fotografii pořízené 16. února 2006 v Howeově jeskyni, 52 km západně od Albany v USA ve státě New York (Blehert et al., 2009; Stoyneva et al., 2016). Od dubna 2012 se WNS rozšířil na více než 200 zimovišť v 19 amerických státech a 4 kanadských provinciích. Nemocní jedinci vykazují aberantní chování a v mnoha případech mají vyčerpané tukové zásoby. Nejnápadnějším znakem je viditelné bílé mycelium *P. destructans* (Obr. 1) patrné na čenichu, křídlech a uších, které začíná být makroskopicky patrné obvykle na přelomu ledna a února (Reeder et al., 2012).

Nedávné laboratorní experimenty sice prokázaly, že kožní infekce touto plísní je příčinou WNS, není ale zcela jasné, jak tato infekce způsobuje úmrtí během hibernace. Infekce *P. destructans* narušuje normální fyziologické procesy. Postižení netopýři jsou podvyživení a předpokládá se, že během hibernace nepřejíží do stavu torporu. Torpor je stav strnulosti u hibernujících živočichů, při němž jsou utlumené fyziologické funkce, jedinci mají snížený metabolismus, srdeční frekvenci, dýchání i tělesnou teplotu. Jedná se o adaptaci endotermních obratlovců, která jim umožňuje přežít energetické nároky nehostinných prostředí.



Obr. 1: Syndrom bílého nosu u netopýra hnědavého (*M. lucifugus*). Na obrázku je možné pozorovat nahrazení chlupových folikulů a souvisejících mazových a potních žláz plísňovými hyfami, porušení bazální membrány a napadení okolní tkáně. Fotograf: Ryan von Linden/ New York Department of Environmental Conservation. Převzato z U.S. Fish & Wildlife Service. <https://www.fws.gov/media/little-brown-bat-white-nose-syndrome>

Termín torpor se vztahuje i na čas, který živočich stráví v hibernaci. Klasický torpor může trvat dny až týdny. Pokud stav trvá méně než 24 hodin, hovoříme o denním torporu (Warnecke et al., 2012; Silvani et al., 2018; Reeder et al., 2012; Wilsterman et al., 2019).

Ačkoliv už bylo publikováno mnoho informací o této nemoci, není dosud znám způsob, jak omezit šíření nemoci. Rovněž není známa účinná léčba. V Severní Americe existuje několik druhů netopýrů ohrožených vyhynutím právě kvůli WNS. Ochrana netopýrů se tak pro vědce stala závodem s časem o nalezení a implementaci tvůrčích řešení v boji proti ničivým dopadům této choroby (Frick et al., 2016).

2.2 Původ onemocnění

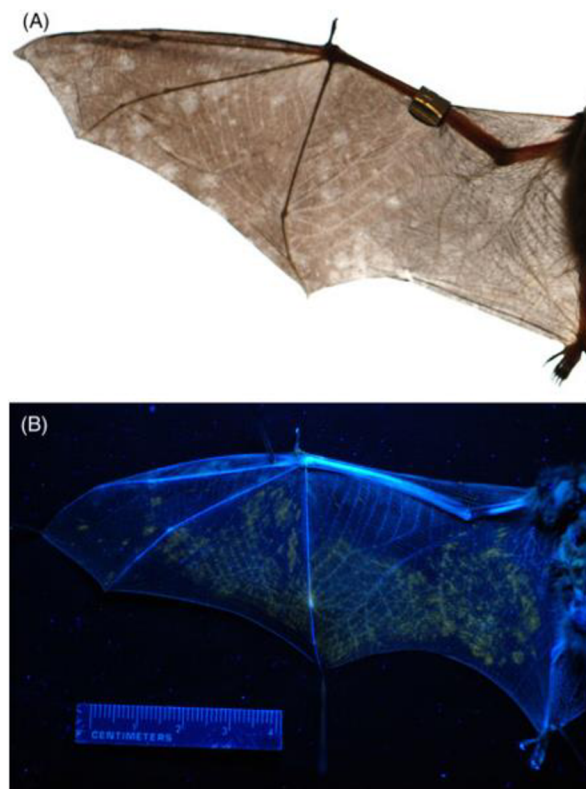
Většina netopýrů žijících v mírném podnebném pásu vstupuje do sezónní hibernace, při níž snižuje aktivitu svého metabolismu a tělesnou teplotu, dokud se nepřiblíží k okolní teplotě hibernakula. Během tohoto stavu jsou netopýři náchylní k infekci psychrofilní houbou *P. destructans* (Zukal et al., 2016). Druhem, který je nejvíce ohrožen WNS je netopýr hnědavý (*Myotis lucifugus*). Počty populací se již v pěti státech USA snížily až o 91 %. Situace je v tomto případě natolik kritická, že hrozí lokální vymírání tohoto druhu. V celosvětovém měřítku čelí velkému riziku i netopýr severní (*Myotis septentrionalis*), jenž byl v roce 2015 zařazen mezi druhy, kterým hrozí vyhynutí. Kromě těchto dvou druhů, je ohroženo dalších pět druhů jeskynních netopýrů, a to netopýr hnědý (*Eptesicus fuscus*), netopýr šídlovitý (*Myotis leibii*), netopýr hnědošedý (*Myotis*

grisescens), netopýr společenský (*Myotis sodalis*) a netopýr žlutavý (*Perimyotis subflavus*) (Alves et al., 2014).

Ne vždy však epidermální infekce *P. destructans* koreluje s letalitou netopýrů. Ta se spíše vztahuje ke konkrétním druhům. U některých netopýrů byla dokonce přítomnost plísně potvrzena, zatímco rozvoj syndromů WNS nikoli. V tomto případě se jednalo např. o netopýra stříbřitého (*Lasionycteris noctivagans*) nebo netopýra rudohnědého (*Lasiurus borealis*). Na jaře roku 2010 byla detekována *P. destructans* u netopýrů vyskytujících se západně od Apalačské plošiny. Jednalo se o netopýra jihovýchodního (*Myotis austroriparius*), netopýra hnědošedého (*M. grisescens*) a netopýra jeskynního (*M. velifer*), ale úmrtnost nebyla zaznamenána. Neletální WNS byla hlavně zdokumentována u evropských zástupců jako jsou netopýr východní (*Myotis blythii*), netopýr velký (*Myotis myotis*), netopýr vodní (*Myotis daubentonii*) a nedávno dokonce i u dalších šesti druhů v severovýchodní Číně (Zukal et al., 2014).

Dle Zukala et al. (2014) byl WNS do USA importován z Evropy. Tento předpoklad potvrzují i předchozí studie, jež prokázaly klonální rozšíření jediného genotypu *P. destructans* mezi netopýry infikovanými WNS v USA. V Severní Americe se od prvního výskytu toto onemocnění dále rozšiřuje s různou mortalitou jedinců. Přítomnost této psychrofilní houby byla navíc zjištěna i v mnoha evropských zemích. Dále bylo potvrzeno, že evropské izoláty *P. destructans* vyvolávají virulentní infekce a fokálně závažné léze (Obr. 2). V evropských podmínkách dokonce vedle sebe existují dva typy plísní, zatím co v severoamerických populacích byl zaznamenán pouze jeden heterotalický druh plísně.

Citlivost jednotlivých druhů netopýrů vůči *P. destructans* by do určité míry mohla souviset s odlišnostmi fyziologických rytmů. Hayman et al. (2016) porovnali dva severoamerické druhy netopýrů se dvěma evropskými druhy. Zjistili, že *M. lucifugus*, jehož populace na severovýchodě USA byla kvůli WNS značně zdecimována, hibernuje za jiných podmínek než větší druhy netopýrů, které nebyly nemocí tolik ovlivněny. Bylo hodnoceno vše, od tělesné velikosti a metabolismu netopýrů samotných až po vlhkost a teplotu jeskyní či délku zimních období v oblastech, kde hibernují. Dle zjištění studie větší druhy, jako je netopýr velký (*Myotis myotis*) v Evropě netrpí WNS v takové míře. Důvody tak mohou spočívat v kombinaci hmotnosti netopýra s různými povětrnostními a environmentálními podmínkami.



Obr. 2: (A) Světlé oblasti na křídlových membránách, které jsou typické u netopýrů s WNS. (B) Ultrafialové osvětlení odhaluje oranžovou fluorescenci charakteristickou pro infekci *P. destructans*. Převzato z Farina & Lankton (2018).

V USA, zejména ve vlhkých jeskyních, jež dříve poskytovaly ideální prostředí pro některé druhy netopýrů, má houba patrně vhodnější podmínky pro růst a šíření. V Severní Americe dokonce modely ukázaly, že větší netopýři, kteří zimovali v sušších, chladnějších jeskyních, měli vyšší míru přežití (Hayman et al., 2016).

Leopardi et al. (2015) získali 28 izolátů *P. destructans* z infikovaných jedinců během pěti let z oblastí v Evropě, kde byl hlášen největší počet případů WNS. Ze vzorků bylo sekvenováno osm genomických lokusů a porovnáno s publikovanými údaji ze 71 severoamerických izolátů získaných z postižených oblastí ve stejném časovém rámci. Z evropských izolátů bylo sedm z osmi sekvenovaných genů polymorfních, což kontrastuje s absencí variace v severoamerických izolátech. Získaná data potvrzují, že evropské izoláty *P. destructans* se v populaci netopýrů vyskytují déle než v populaci severoamerické. Počet sekvenovaných izolátů byl v Severní Americe větší ($n = 71$) než v Evropě ($n = 28$), což pravděpodobně vedlo k podhodnocení odhadu počtu haplotypů přítomných v Evropě. Fotografické důkazy naznačují přítomnost *P. destructans* v Evropě

po celá desetiletí bez jakékoli souvislosti s masovou úmrtností, což je v souladu s endemickým rozšířením v Evropě a koevolucí hostitel-patogen. Kombinace genových fragmentů pro každý izolát umožnila detekci osmi haplotypů genu *P. destructans* v celé Evropě. Nejběžnější *Hap_1* se vyskytuje i v severoamerických izolátech. *Hap_1* byl nalezen v západní, ale nikoli ve východní Evropě. Fylogenetická rekonstrukce identifikovala vzorky z Francie, Německa a Belgie jako primární. Nepřítomnost genetické variability v těchto osmi lokusech v severoamerických izolátech naznačuje buď nový výskyt v oblasti, nebo nedávný výskyt virulentního kmene dříve benigní houby, která nemusí být na netopýrech nutně přítomna. Skutečnost, že nejběžnější evropský haplotyp je 100% identický ve vzorkových lokusech s klonálním haplotypem ze Severní Ameriky, naznačuje nedávný mezikontinentální přenos hub z Evropy do Severní Ameriky, spíše než vznik virulentního kmene v Severní Americe (Leopardi et al., 2015).

2.3 Patogeneze onemocnění

WNS kombinuje některé z nejhorších možných epidemiologických charakteristik, včetně vysoce virulentního patogenu s přenosem závislým na hustotě a četnosti environmentálního rezervoáru, dlouhodobou perzistenci v hibernakulu a náchylnosti více hostitelů. Vyznačuje se přítomností „baňkových“ erozí na kůži, nahrazením chlupových folikulů a souvisejících mazových a potních žláz plísňovými hyfami, porušením bazální membrány a napadením okolní tkáně. Mezi typické projevy na infikovaných jedincích patří viditelný růst plísně na povrchu kůže, vyčerpání tukových rezerv a aberantní zimní chování. V porovnání s poškozením létacího ústrojí se ostatní projevy onemocnění na čumáku a hlavě jeví jako méně závažné (Blehert et al., 2009; Stoyneva et al., 2016; Zukal et al., 2016).

Dle Storm & Boyles (2011) existuje několik hypotéz, jak změny v hibernaci souvisí s úmrtností. Netopýři ovlivnění WNS se častěji probouzí z torporu, nejsou schopni udržet vodní bilanci, do hibernace vstupují s nižší hmotností a zvyšuje se jim průměrná tělesná teplota. To bylo prokázáno na výzkumu netopýřů hnědavých (*M. lucifugus*) z New Yorku a netopýřů společenských (*M. sodalis*) z Indiany (Storm & Boyles, 2011). Během studií jak volně žijících netopýřů, tak i jedinců chovaných v zajetí, bylo identifikováno množství domnělých virulentních faktorů (McGuire et al., 2017).

Dle McGuire et al. (2017) existují dva komplementární modely patofyziologie WNS, přičemž oba hovoří o tom, že infikovaní netopýři trpí rychlejší ztrátou vody odpařováním (evaporative water loss, EWL) a zvýšenou metabolickou aktivitou během torporu (torpid metabolic rate, TMR).

Patofyziologický model dle Warnecke et al. (2013) popisuje to, že se symptomy WNS vyvíjejí progresivně, přičemž ty nejvýraznější jsou patrné až ve fázi hibernace. Zvýšená frekvence probouzení se z torporu vede k nárůstu energetického výdeje a je považována za primární příčinu emaciace. Tento model předpokládá, že léze v tkáni křídla, které se objevují až v pozdějších stádiích plísňové infekce, vedou ke změně krevního obrazu a zvýšené ztrátě vody, rychlosti dýchání a spotřeby energie (McGuire et al., 2017).

Dle modelu Veranta et al. (2014) byly nalezeny důkazy o zvýšeném energetickém obratu již v dřívějším stadiu nemoci, a to ještě dříve, než je možné pozorovat častější probouzení se z torporu. Tento model naznačuje, že zvýšená rychlost metabolismu po počáteční invazi patogenu do tkáně v kombinaci se sníženým vylučováním CO₂ iniciuje kaskádu patofyziologických odpovědí pozorovaných v závěrečných fázích WNS (McGuire et al., 2017).

Za nejdůležitější faktory patogeneze obou modelů jsou považovány zvýšený energetický výdej a narušení osmotické homeostázy. Ačkoli příčina zvýšené frekvence probouzení se z torporu není známa, vyčerpání elektrolytů a tekutin vedlo k hypotéze dehydratace. Dle této teorie plísňové léze na kůži zvyšují rychlost ztrát vody, což by samo o sobě mohlo zvyšovat frekvenci probouzení a vyčerpávat zásobní látky. U zdravých hibernujících netopýřů má na trvání stavu torporu vliv zejména vlhkost okolí a EWL. Tuto hypotézu testoval McGuire et al. (2017) ve studii, v níž byla skupina jedinců infikována *P. destructans* a srovnávána s kontrolní neinfikovanou skupinou. U infikovaných netopýřů bylo vyšší jak TMR, tak EWL. Zvýšené EWL je tedy přímý důsledek infekce, a nikoliv nepřímý následek zvýšené TMR. Příčinou dehydratace je poškození křídla. Jak infekce postupuje a léze na křídlech nabývají na velikosti, rychlost EWL se dále zvyšuje, což má za následek častější probouzení se z torporu. Netopýři sice mohou během probouzení přijímat tekutiny, které jsou dostupné v daném zimovišti, aby kompenzovali ztrátu vody, ale ty ne vždy obsahují potřebné množství elektrolytů nutných pro správnou funkci metabolismu (McGuire et al., 2017). I když si příslušníci podřádu *Microchiroptera* osvojili některé behaviorální a fyziologické adaptace, jako je olizování kondenzované

vody z kožichů, nebo metabolické oteplování těl na eutherickou teplotu, nejsou tak schopni tuto dehydrataci plně kompenzovat (Zukal et al., 2016).

2.4 Hibernace

Dle Meyera et al. (2016) mohou netopýři v severních zeměpisných šířkách hibernovat až 8 měsíců. Dle Reeder et al. (2012) mají netopýři průměrnou hodnotu délky setrvání ve stavu torporu (torpor bout length, TBL) 16,3 dní, zatímco u netopýřů infikovaných WNS se hodnota TBL snižuje na 14 dnů. Ačkoliv laboratorní experimenty prokázaly, že původcem WNS je houba *P. destructans*, přesné mechanismy, proč netopýři umírají během zimního spánku, nejsou zcela objasněny. Stále se však předpokládá, že selhání organismu netopýra nastává např. v důsledku infekce, vedoucí k narušení normálních fyziologických funkcí, vodní bilance, metabolismu při stavu hibernace a samotnému navozování torporu (Reeder et al., 2012).

Pro hmyzožravé netopýry žijící v mírném pásu, kteří jsou zasaženi WNS, je potrava primárně k dispozici od konce jara do začátku podzimu, ale v zimě chybí. Netopýři překonávají tento zimní energetický deficit pomocí zásob tělesného (depotního) tuku, který získají na konci léta a začátkem podzimu, a také šetřením metabolické energie hibernací. Během hibernace pomáhá netopýřům udržet stálou tělesnou teplotu při podchlazení hnědá tuková tkáň, jejíž hlavní funkcí je produkce tepla bez fyzického třesu. U *M. lucifugus* se tělesný tuk zvyšuje z přibližně 7 % celkové hmotnosti v létě na 27 % celkové hmotnosti před hibernací. Tento depotní tuk je jediným zdrojem energie během hibernačního období, kdy je výrazně snížena tělesná teplota i rychlost metabolismu (Reeder et al., 2012).

Několikrát za zimu se musí netopýři probudit z hibernace, aby obnovili homeostatickou rovnováhu (např. musí se napít, vymočit, přemístit). Toto periodické probouzení během zimy nejvíce spotřebovává zásoby uloženého tělesného tuku. Netopýři s WNS se z hibernace probouzí častěji a na delší dobu, než je průměr, a tím předčasně spotřebovávají tukové rezervy (Foley et al., 2011).

Ačkoli eutermická období v zimě představují přibližně 1 % celkového časového intervalu, během těchto periodických probouzení ze stavu torporu se spotřebuje přibližně 80–90 % energetických zásob (resp. depotního tuku). Množství depotního tuku metabolizovaného během každého probouzení (bez letu) z hibernace *M. lucifugus* se odhaduje na cca 108 mg

(Reeder et al., 2012). Reeder et al. (2012) hodnotili zkrácení délky torporu u volně žijících infikovaných *M. lucifugus* v pozdní hibernaci. Práce Warnecky et al. (2012) totéž potvrdila u skupiny experimentálně infikovaných jedinců v zajetí.

2.5 Charakteristika *P. destructans*

P. destructans je oportunistický patogen podřádu *Microchiroptera*. Výskyt tohoto mikroorganismu je zaznamenán jak na severoamerickém, tak i na evropském kontinentu. Zdokumentované případy onemocnění WNS v Evropě, které tato plíseň způsobuje, pochází např. z Velké Británie, Francie, Belgie, Německa, Rakouska, Maďarska a České republiky. Na evropském kontinentu však nedochází k tak masivnímu vymírání netopýrů jako v USA a Kanadě. Jedním z důvodů, proč tomu tak je, může být i fakt, že v evropském prostředí si místní zástupci jednotlivých druhů po mnoho generací vyvinuli větší odolnost vůči nemoci (Zukal et al., 2014; Puechmaille et al., 2010).

P. destructans může přetrvávat v jeskynním prostředí jako saprotrof. Patogenní mechanismy *P. destructans* zůstávají neznámé zejména proto, že žádná jiná patogenní plíseň, ať již humánní nebo savčí nevykazuje virulentní atributy při tak nízkých teplotách. Jedná se o psychrofilní houbu, která může růst od 4 do 20 °C. *P. destructans* vylučuje proteolytické a lipolytické exoenzymy. Tato houba produkuje hnědo-šedé kolonie, vylučuje nahnědlý pigment (Obr. 3) a asexuálně se reprodukuje prostřednictvím charakteristicky zakřivených konidií. *P. destructans* toleruje zvýšené hladiny sloučenin síry (cystein, siřičitany a sulfidy) a roste v širokém rozmezí pH 5–11 (Chaturvedi, 2018; Gargas et al., 2009; Raudabaugh & Miller, 2013).



Obr. 3: *P. destructans* na sladínovém agaru. Houba je typická růstem hnědo-šedých kolonií a vylučováním nahnědlého pigmentu. Fotografie z Laboratoře genetiky a metabolismu hub.

P. destructans se primárně reprodukuje asexuálně a vytváří hojně haploidní konidie. Přestože je pro *P. destructans* teoreticky možné pohlavně se rozmnožovat prostřednictvím heterothalického reprodukčního systému, nebylo to dosud pozorováno. Předchozí studie o původu a šíření WNS odhalily malou nebo prakticky žádnou genetickou rozmanitost v severoamerických izolátech (Drees et al., 2017).

2.6 Biochemické a imunologické ukazatele WNS

Flieger et al. (2016), zjistili, že nadprodukce riboflavinu fungálním patogenem a jeho nadměrná kumulace v postižené hostitelské tkáni způsobuje nekrózu kůže.

2.6.1 Riboflavin

Riboflavin je vitamín (vitamín B₂), který savci nejsou schopni syntetizovat. Je však nutný pro oxidoredukční metabolické děje. Na druhou stranu jeho přítomnost v buňce může podporovat přežití intracelulárních mikrobiálních parazitů a jejich virulenci. Zdraví savci však dokáží omezit jeho nepříznivé účinky vylučováním jeho nadbytku močí (Flieger et al., 2016).

Vysoké koncentrace riboflavinu jsou za podmínek specifických pro hibernaci cytotoxické. Mají např. negativní vliv na primární fibroblasty, u kterých vyvolávají ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, polymerizaci kortikálního aktinu a nekrózu. Vlivem nadměrného hromadění riboflavinu s přispěním snížené aktivity metabolismu během hibernace a nízké saturace tkání kyslíkem, se tak přebytečný vitamín u infikovaných netopýrů neodbourává. Rozsáhlé odumírání kožních buněk, navozené zvýšeným množstvím riboflavinu ve tkáních pravděpodobně přispívá k patofyziologickým procesům WNS (Flieger et al., 2016).

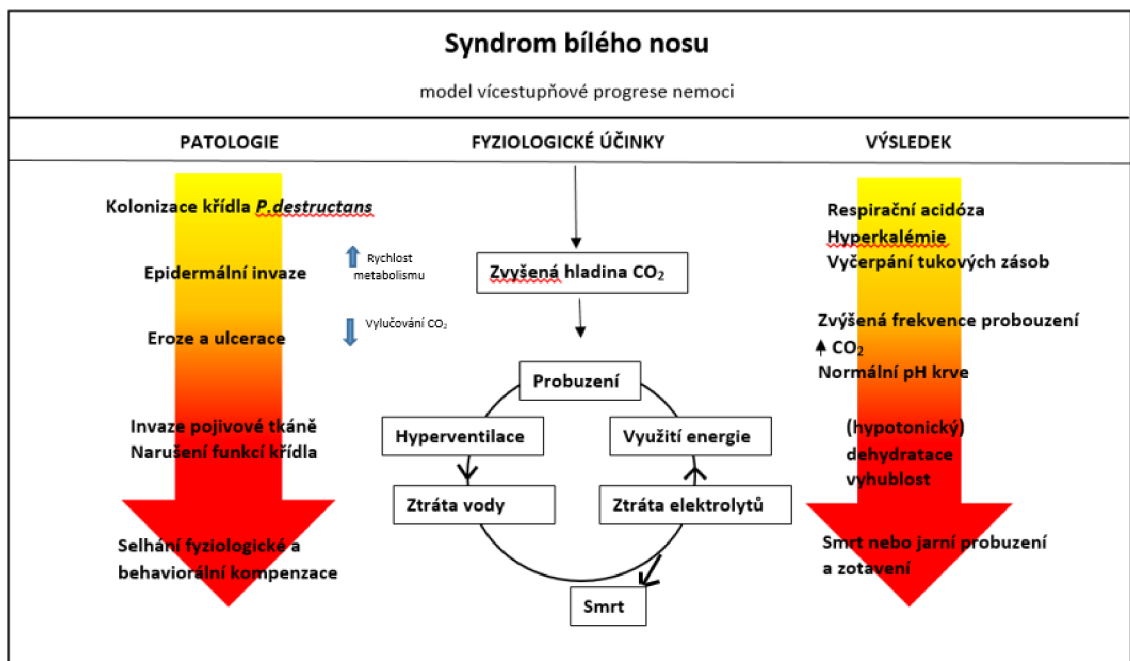
Akumulaci vitamínu riboflavinu lze tak považovat za virulenční faktor *P. destructans* při WNS. Rozsah poškození kůže v důsledku invazivního růstu *P. destructans* je viditelný při transiluminaci ultrafialovým (UV) zářením. Tato zasažená místa membrány křídel označujeme jako léze, které po osvětlení UV zářením při 360 nm UV fluoreskují jako žlutooranžové skvrny (Flieger et al., 2016).

2.6.2 Oxid uhličitý

U nehibernujících savců rostoucí koncentrace CO_2 v krvi stimuluje zvýšené dýchání vedoucí k uvolnění přebytečného CO_2 . Jedinečná fyziologie hibernujících savců však umožňuje aktivní potlačení dýchání během torporu. Hladina parciálního tlaku CO_2 (pCO_2) tak dosahuje vyšších hodnot než u metabolicky aktivních savců. Tento jev je nedílnou součástí fyziologie hibernace, neboť indukce acidotického stavu slouží ke snížení metabolické rychlosti a termogeneze. Výsledný vysoký gradient pCO_2 navíc zlepšuje ventilační účinnost, čímž minimalizuje výdaje energie na dýchání během torporu. Přes tuto toleranci vůči respirační acidóze musí být hibernující savec stále schopen regulovat pCO_2 pro správnou fyziologickou funkci. Pokud by cesty eliminace CO_2 , jako je pasivní difúze CO_2 napříč epitelem křídla, byly chorobou ohroženy, trvale rostoucí hladina pCO_2 v krvi tak způsobuje závažnou chronickou acidózu (Verant et al., 2014). Dle Veranta et al. (2014) jsou časná stadia WNS, zahrnující plísňovou kolonizaci křídlové membrány s progresí do eroze a ulcerací epidermis, navíc charakterizována acidémií a hyperkalémií (Obr. 4).

Akumulace CO_2 může být také souviset s kompenzační reakcí hostitele, jehož organismus snížil rychlost metabolismu během torporu indukcí hyperkapnické acidózy. Tato acidóza potom může přispět k pozorované hyperkalémii transportem draslíku z intracelulárního prostředí. Intracelulární draselné ionty mohou také pronikat do krve poškozenými a nekrotickými buněčnými membránami, které jsou způsobeny invazí patogenu do epidermis (Verant et al., 2014).

Z celkového patofyziologického hlediska mají tyto děje za následek nejen acidózu a hyperkalémii, ale také snížení tukových zásob netopýrů. V souladu s výsledky pozorovanými u netopýrů v pozdějších a závažnějších stádiích WNS lze předpokládat, že jakmile parciální tlak CO_2 stoupne nad mez tolerance, chemoreceptory stimulují hyperventilaci. V důsledku toho se jedinec častěji probouzí z torporu, což vede k vyloučení přebytečného CO_2 a navrácení pH krve na normální hodnoty. Na druhou stranu ale vysoká energetická náročnost procesu probouzení vede ke zrychlené spotřebě tukových zásob. Kromě toho, hyperventilace a větší rozdíl parciálního tlaku při zvýšené tělesné teplotě během probouzení přispívají k větší ztrátě vody odpařováním a následné dehydrataci (Verant et al., 2014).



Obr. 4: Model víceetapňové progresie WNS u hibernujících netopýrů, který zahrnuje současné znalosti o progresi plísňové patologie a patofyziologických následcích vedoucích k úmrtí na toto onemocnění. Převzato z Verant et al. (2014).

Jak WNS postupuje a utváří rozsáhlejší a těžší léze křídla, dehydratace progreduje, což opět stimuluje probouzení z hibernace. Následně se vytvoří pozitivní zpětnovazebné smyčky, které spojují zhoršující se patologii křídla vyvolanou onemocněním s dalším zvýšením frekvence probouzení se, ztrátou vody a spotřebou energie. To má za následek pozorované akutní patofyziologické změny – hyperkapnii, hypoglykémii, hyponatrémii, hypochlorémii a emaciaci. Jakmile jsou kompenzační mechanismy, jako je schopnost buněk udržovat elektrolytickou rovnováhu a respirační a metabolická regulace vyčerpány, nastává metabolický rozvrat a úmrtí jedince. V případě, že má infikovaný netopýr dostatečné energetické rezervy, aby setrval až do jara, může infekci překonat po návratu do metabolicky aktivnějšího stavu. K úhynu proto nemusí dojít (Verant et al., 2014).

2.6.3 Imunologické ukazatele

Dle Casadevall (2005) vytváří vysoká tělesná teplota savců nevhodné prostředí pro většinu plísňových patogenů. U savců, kteří mají schopnost hibernace, jsou určité imunologické mechanismy během tohoto období regulovány, zatímco jiné zůstávají beze změny. Snižuje se tělesná teplota a též aktivita metabolismu i imunitního systému. Klesá

počet cirkulujících leukocytů, včetně T a B lymfocytů a snižuje se aktivita proteinů komplementu (Lilley et al., 2017).

Field et al. (2015) zjistili, že *P. destructans* způsobuje významné změny v genové expresi u celé řady buněk hibernujících netopýrů. Tím dochází k aktivaci metabolických drah, ke které za normálních okolností dochází při zánětu nebo hojení ran. Nevýhody potlačení imunity během hibernace a torporu jsou pravděpodobně vyváženy úsporou energie. Periodické probouzení z hibernace naopak funkci imunitního systému obnovuje a zvyšuje počet cirkulujících leukocytů na eutermní úroveň (Anderson, 2018; Bouma et al. 2010; Biegańska 2014; Field et al., 2015).

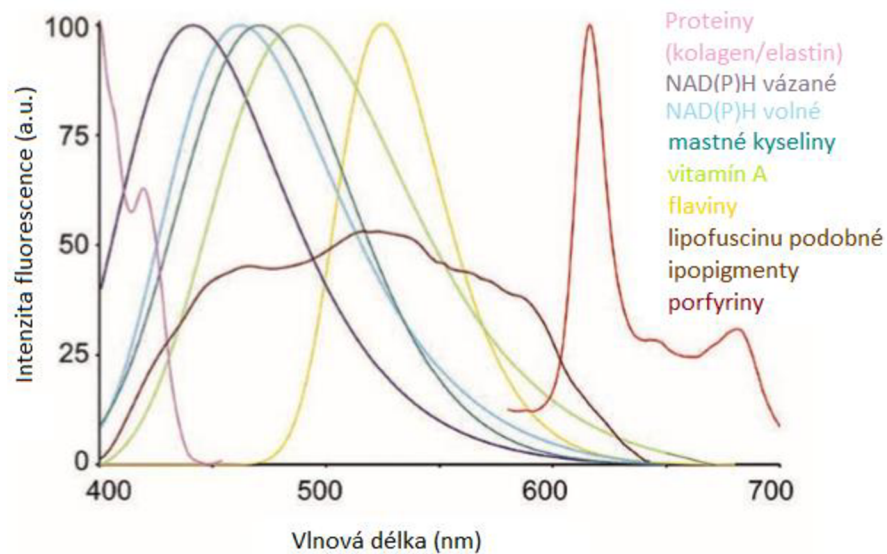
Psychofilní povaha *P. destructans* umožňuje proliferaci a invazi do kožních tkání netopýrů během hibernace v zimovištích. Při invazi jsou ale molekulární struktury asociované s patogeny (PAMP) přítomné v buněčné stěně *P. destructans* rozeznány receptory rozeznávající molekulové vzory (PRR receptory) na hostitelských epiteliálních buňkách. Mezi PRR patří například toll-like receptory, C-lektinové receptory (CLRs) a receptory vázající nukleotidy vázající oligomerující receptory nukleotidově vázané receptory oligomerizačně doménově podobní receptory (NOD-like receptory). Aktivace těchto receptorů vede k produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12). Tyto cytokiny následně stimulují aktivitu mnoha různých imunokompetentních buněk a tvorbu zánětu, a tedy formu imunitní odpovědi na infekci *P. destructans* (Anderson, 2018; Biegańska, 2014).

Vzhledem k tomu, že se zvýšená frekvence probouzení z torporu jeví jako primární příčina úmrtnosti při WNS, Field et al. (2015) zvažovali možné mechanismy, které by mohly probouzení z torporu vysvětlit. Zvýšená produkce IL-1, IL-6 a dalších prozánětlivých cytokinů indukuje lokální akutní zánětlivou odpověď na infekci *P. destructans*. Tyto cytokiny mají taktéž i systémové účinky. Kromě jiného mohou ovlivňovat i termoregulaci. Společně se zvýšením transkripce genu pro některé cytokiny a chemokiny byla zaznamenána i zvýšená transkripce genů pro cyklooxygenázu-2 a fosfolipázu A₂. Tyto enzymy katalyzují kritické kroky při syntéze zánětlivých lipidových mediátorů, jako je prostaglandin H₂. Autoři předpokládali, že eikosanoidy syntetizované těmito enzymy vyvolávají bolest a svědění, neboť lokálně aktivují neuronální nociceptory. To by mohlo ovlivnit opakované probouzení se z torporu, délku jeho trvání anebo chování během periodického stavu bdělosti (Field et al., 2015).

2.7 Využití autofluorescence při studiu fyziologie živočichů

Při studiu biochemických změn vyvolaných patogeny v buňkách a tkáních živočichů je možno využít fluorescenci nízko- i vysokomolekulárních látek. Dle Fišara (2009) je fluorescence druhem fotoluminiscence. „*Principem fluorescence je přijetí energie ve formě záření atomem, přesněji elektrony, které se excitují do vyššího, nestabilního stavu. Poté se vrací do původního stavu, energeticky stabilnějšího, přičemž emitují do okolí záření s delší vlnovou délkou, než je záření, jež bylo původně pohlceno.*“ Fluorescenci rozlišujeme na primární (přímou), kdy je látka sama schopná fluorescence a sekundární (nepřímou), při níž je fluorescence vyvolána navázáním fluorescenčního barviva či sondy. Jako primární lze označit přímo samotnou autofluorescenci neboli tkáňově endogenní fluorescenci. Jedná se o emisi světla v UV-viditelném nebo blízkém infračerveném spektrálním rozsahu biologickými strukturami (Hegyí et al., 2011; Fišar, 2009; Croce & Bottiroli, 2014).

Fluorescence byla popsána roku 1565 španělským botanikem Nicolasem Monardesem. První vědecké zprávy jsou z r. 1819, kdy Edward Clarke zkoumal emisi světelného záření u fluoridu vápenatého ve sloučeninách chininu a chlorofylu. V tomto případě ovšem nefluoreskovaly samotné krystaly fluoridu vápenatého ale příměsí. Tento děj pak vzápětí George Stokes označil jako fluorescenci. S rostoucím zájmem o fluorescenční pozorování biologických struktur se samozřejmě vyvíjelo i přístrojové vybavení, což vedlo k sestavení prvních fluorescenčních mikroskopů. V roce 1911 pozoroval autofluorescenci pod mikroskopem fyziolog Hans Stübel z Jenské university, který zkoumal autofluorescenci bakterií a prvoků, zvířecích tkání (např. zubů) a různých biologických látek. Ve srovnání s živočišnými substráty zjistil, že rostlinné endogenní fluorofory dávají mnohem výraznější emisní signály, a to díky vhodnějším spektrálním vlastnostem. V důsledku toho byla autofluorescence považována za mocný nástroj pro studium morfologie a fyziologie rostlin (Croce & Bottiroli, 2014).



Obr. 5: Typické spektrální profily emise autofluorescence z jednotlivých endogenních fluoroforů. Převzato z Croce & Bottiroli (2014).

Dále se pro tento typ pozorování začalo používat velké množství fluorochromů jako endogenní ukazatele. Zejména ty, které se přirozeně vyskytují v rostlinách, jako jsou chinony, kumariny, kyaniny, tetrapyroly a alkaloidy (Croce & Bottiroli, 2014). Na konci poloviny 20. století byla zvláštní pozornost věnována koenzymům NAD(P)H a flavinům. Sledovala se jejich redoxní rovnováha v izolovaných mitochondriích, jednotlivých kultivovaných buňkách i v intaktních tkáních za různých metabolických podmínek. Dle Kolenc & Quinn (2019) tato průkopnická zkoumání Brittona Chancea a jeho spolupracovníků rozdělila období charakterizované sporadickým autofluorescenčním pozorováním od systematického vyšetřování autofluorescence v biomedicíně, zaměřeného na specifické cíle a funkce. Dle Croce & Bottiroli (2014) obecně platí, že NAD(P)H a flaviny jsou téměř jedinečné zodpovědné za autofluorescenční signály z buněčné cytoplazmy, což velmi dobře umožňuje provádět výzkumy buněčného redoxního metabolismu, a to, aniž by bylo třeba odlišení ostatních fluoroforů. Spektrální profily endogenních fluoroforů, které jsou často užívány v biomedicínských studiích založených na autofluorescenci, jsou uvedeny na Obr. 5.

2.8 Použité metody a jejich charakteristika

2.8.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je jednou z nejvšestrannějších optických zobrazovacích metod. Při fluorescenčním zobrazování jsou fluorofory excitovány externím zdrojem záření. Následně pak emitují záření o delší vlnové délce, která je následně detekována. Výstupní optický signál se poté odvíjí od vlastností zvoleného fluoroforu (Atabaev & Hong, 2019).

Základní proces fluorescence začíná absorpcí světelné energie (neboli fotonu) indikátorem, kterým je daný fluorofor. Se zpožděním několika nanosekund následuje emise části této světelné energie ve formě jiného fotonu. Protože při tomto ději dochází ke ztrátě jistého podílu energie, emitovaný foton má nižší energii než foton absorbovaný. Světlo vyzářené fluoroforem má proto delší vlnovou délku než absorbované záření. Tato změna se nazývá Stokesův posun (Sanderson et al., 2014).

2.8.1.1 Limity fluorescenční mikroskopie

Jedním z omezení fluorescenční mikroskopie je to, že fluorofory nemají dlouhodobou životnost. Když jsou osvětleny, ztrácejí schopnost fluorescence, protože dojde k jejich tzv. vysvícení. Vysvícení je fotochemická změna barviva nebo molekuly fluoroforu tak, že trvale není schopna fluorescence. To je způsobeno štěpením kovalentních vazeb nebo nespecifickými reakcemi mezi fluoroforem a okolními molekulami. Takové nevratné modifikace kovalentních vazeb jsou způsobeny přechodem ze singletového stavu do tripletového stavu fluoroforů. Počet excitačních cyklů k dosažení úplného vysvícení se liší. V mikroskopii může fotobělení komplikovat pozorování fluorescenčních molekul, protože budou nakonec zničeny světelnou expozicí nezbytnou pro jejich stimulaci do fluorescence (Ghauharali & Brakenhoff, 2000).

Některé buňky jsou rovněž náchylné k fototoxicitě, zejména při použití kratších vlnových délek. Fototoxicita se často vyskytuje u fluorescenční mikroskopie živých buněk a její důsledky jsou často podceňovány. Poškození buněčných makromolekul při osvětlení excitačním světlem může narušit fyziologii vzorku. Fototoxicita ve fluorescenční mikroskopii může pocházet z různých zdrojů. Poškození buněčných makromolekul při osvětlení excitačním světlem může narušit fyziologii vzorku, a dokonce vést k jeho

nevratnému poškození. Organické molekuly, jako jsou flaviny a porfyriny přirozeně se vyskytující v buňkách, absorbují světlo ve viditelných vlnových délkách a mohou předávat energii nebo elektrony přes molekulární kyslík za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento proces produkuje ROS, včetně superoxidových radikálů, hydroxylových radikálů a peroxidu vodíku, může poškodit buňky různými způsoby. Mohou přímo oxidovat DNA a potenciálně způsobit mutace, nebo oxidovat proteiny a nenasycené mastné kyseliny v lipidech, což je činí nefunkční. Kromě toho může přebytek ROS oxidovat kofaktory enzymů nebo globálně změnit redoxní stav buněčné cytoplazmy a mitochondrie (Jensen, 2012; Icha et al., 2017).

2.8.1.2 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Specializovanou formou standardní fluorescenční mikroskopie je fluorescenční konfokální mikroskopie. Konfokální mikroskopie používá konkrétní optické komponenty k vytvoření snímků s vysokým rozlišením materiálu značeného fluorescenčními sondami. Ačkoliv bylo v polovině dvacátého století učiněno mnoho pokusů k dosažení lepšího rozlišení obrazu pro fluorescenční mikroskopii pomocí různých otvorů či štěrbin, byla to až dostupnost laserů s vysokou intenzitou a citlivých elektronických detektorů, která vedla na počátku 90. let k produkci komerčních konfokálních mikroskopů (Sanderson et al., 2014).

Konfokální mikroskopie se liší od konvenční širokouhlé fluorescenční mikroskopie v tom, že optická cesta je navržena tak, že je před detektor obrazu (fotonásobič) umístěna štěrbina, a to v bodě, kde je obraz zaostřen ve spojení s ohniskovou rovinou obrazu. Správným umístěním tohoto otvoru do stejné ohniskové polohy jako obraz a úpravou velikosti clony, je možné nepustit světlo z vně skutečné ohniskové roviny objektivu. Termín konfokální je odvozen od shody dvou ohniskových rovin (zaostřovací bod objektivu a zaostřovací bod, ve kterém je umístěna štěrbina). Výsledkem je eliminace světla mimo zaostření, čímž se získá ostrý obraz s maximálním možným rozlišením pro použitý objektiv (Peterson, 2010).

2.8.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

SDS-PAGE neboli elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného je technika používaná v biochemii, forenzní chemii a genetice

k oddělení biologických makromolekul, obvykle proteinů, podle jejich elektroforetické mobility. Tato schopnost pohybovat se ve stejnosměrném elektrickém poli se odvíjí od velikosti, konformace a náboje dané molekuly (Petrov et al., 2013).

Systém SDS-PAGE se skládá ze dvou gelů – zaostřovacího gelu, ve kterém jsou proteiny koncentrovány před vstupem do separačního gelu a ze separačního gelu, ve kterém jsou proteiny děleny na základě jejich molekulových hmotností. Rozdíly ve složení obou gelů a elektroforetického pufru vytváří systém, který je schopen separovat proteiny podle jejich molekulových hmotností. Po aplikaci konstantního elektrického pole protein migruje směrem k anodě, každý s jinou rychlostí, přímo úměrně dekadickému logaritmu hmotnosti proteinu. Tento jednoduchý postup umožňuje hmotnostní separaci proteinů. Malé proteiny se budou pohybovat separačním gelem rychleji než velké proteiny. SDS je detergent, který je přítomen ve vzorkovém pufru SDS-PAGE, kde spolu s redukčním činidlem narušuje terciární strukturu proteinů. Obvykle je používán dithiotreitol (DTT), které slouží k odbourávání proteinových disulfidických můstků. Tím se složené proteiny stávají lineárními molekulami. Elektroforéza může probíhat až po několik hodin. Záleží na tom, jak dlouho bude stejnosměrné napětí působit na separační gel. Pokud se SDS-PAGE provádí při vyšším napětí/proudu poskytuje lepší rozlišení pro peptidy menší velikosti. Existují tři důvody: menší molekuly podléhají během běhu difúzi, laterální i vertikální, proto budou ve vyšších proudech pásy kompaktnější a ostřejší a zvyšují rozlišení. Je zde ale další faktor ovlivňující běh polyakrylamidovou sítí, a to konformace proteinu. Není absolutní pravdou, že v zaváděcím pufru SDS jsou proteiny úplně denaturovány. Menší proteiny mají méně možných konformací než ty velké. Za třetí, obvykle jsou menší proteiny separovány na koncentrovanějších polyakrylamidových gelech. Odpor pohybu nabytých molekul tak přispívá k tvorbě tepla, což pomáhá udržovat protein v denaturovaném stavu, a snižuje tak možné strukturální konformace, které fyzicky/stericky ovlivňují běh polyakrylamidovou sítí. U větších bílkovin, zpravidla od 70–80 kDa, by měly SDS-PAGE probíhat při nižším proudu/napětí, protože dochází k menší difúzi a velké proteiny budou mít rovnoměrnější konformaci. Po uplynutí stanoveného času zůstanou molekuly, které migrovaly v elektrickém poli v různých vzdálenostech od výchozího bodu. (Steinberg, 2009; Brunelle & Green, 2014; Ninfa et al., 2010). Příprava polyakrylamidových gelů používaných k separaci biomakromolekul se zakládá na chemické polymerizaci akrylamidu s *N,N'*-methylenbisakrylamidem, což je činidlo vytvářející 3D strukturu gelu. Velikosti pórů v gelu se upravuje zvolenou

koncentrací akrylamidu. Samotné polymerizace je dosaženo, díky přítomnosti volných kyslíkových radikálů, které reagují s vinylovými skupinami v akrylamidu a bisakrylamidu. Kyslíkové radikály jsou generovány reakcí persíranu amonného (APS) s *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiaminem (TEMED) (Steinberg, 2009).

2.8.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě, z anglického Thin Layer Chromatography (TLC), se používá k oddělení netěkavých směsí. TLC je jednou z analytických kapalinových chromatografických metod v planárním provedení. Jejím předchůdcem byla papírová chromatografie (PC), jež je založená na stejném separačním principu. Stejně funguje i vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (High Performace Thin Layer Chromatography, HPTLC). U ní separace probíhá za použití stacionární fáze s malou a jednotnou velikostí částic a automatického dávkovače vzorku (Cai, 2014; Lewis & Moody, 1989).

Princip dělení analytů pomocí TLC spočívá v nanesení malého množství vzorku v roztoku na chromatografickou destičku se stacionární fází, která je následně umístěna do vyvíjecí komory s mobilní fází, kde se nechá po určitou dobu. Vzorek je unášen mobilní fází díky kapilárnímu působení. Jednotlivé složky aplikovaného vzorku pak putují různými rychlostmi a dochází tak k jejich vzájemné separaci. Po ukončení chromatografie se destička vyjme a odečte se chromatografický záznam neboli chromatogram. Detekce se zpravidla provádí buď ponořením do vhodného činidla, kterým může být například H_2SO_4 , $KMnO_4$ či I_2 , nebo je detekována fluorescence luminoforů po nasvícení UV zářením, či lze detekovat samotné zhášení fluorescence chromatografické desky obohacené fluorescenčním indikátorem. Složky daného analytu jsou identifikovány změřením dráhy, jež jednotlivé složky vzorku urazily za danou dobu od místa nanesení, podle jejich zbarvení a intenzity (Cai, 2014; Lewis & Moody, 1989).

Mobilní a stacionární fáze se od sebe liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Stacionární fáze bývá obvykle zvolena polárnější než mobilní. U stacionární fáze existují dvě možnosti. Buď je vybrána kapalina, což již není v dnešní době příliš běžné, nebo se častěji jedná o tenkou vrstvu adsorpčního materiálu, obvykle silikagelu, oxidu hlinitého nebo celulózy, která je ukotvena na fólii. Jako mobilní fáze se používá rozpouštědlo, nebo i směs rozpouštědel pro dosažení přesných elučních vlastností (Vogel et al., 1989; Cai, 2014; Lewis & Moody, 1989).

Konkrétní rozpouštědlo je voleno dle vlastností složek analyzované směsi. Na základě samotného principu TLC je pak vzorek distribuován mezi pevnou stacionární a tekutou mobilní fází, která se kapilárně pohybuje přes sorbent. Díky tomu se složky oddělují a pohybují od místa nanesení. Do jaké vzdálenosti analyt doputuje, záleží na jeho vlastních funkčních skupinách, molekulární struktuře a hmotnosti a fyzikálních a chemických vlastnostech. Čím méně dané analyty interagují se stacionární fází, tím dále putují s mobilní fází od startu. Rovněž také, čím více se jeho vlastnosti podobají mobilní fází, tedy čím více je ve zvoleném rozpouštědle rozpustnější, tím delší bude retenční vzdálenost. Naopak sloučeniny, které jsou méně rozpustné v mobilní fází a mají vyšší afinitu k částicím na chromatografické destičce, urazí od startu kratší vzdálenost (Kumar et al., 2013).

Výhodou chromatografie na tenké vrstvě je možnost pracovat i s velmi znečištěnými vzorky. Chromatogram lze vyhodnotit a tím lze ušetřit čas a náklady potřebné k přečištění a přípravě vzorku. Detekce je jednodušší, pokud jsou stanovované sloučeniny již přirozeně zbarvené, fluoreskují nebo absorbují UV záření. Pro docílení fluorescence je u většiny látek nutné použít detekční činidlo. UV záření pak absorbuje většina aromatických a konjugovaných sloučenin a některé nenasycené sloučeniny. Tyto sloučeniny mohou být detekovány jednoduše UV zářením o vlnové délce 254 nm na vrstvách impregnovaných fluorescenčním indikátorem (Sherma & Fried, 2003).

2.8.4 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Pro úspěšnou identifikaci a charakterizaci proteinů je nezbytná vhodná metoda štěpení. Obecně se k identifikaci proteinu používá enzym nebo chemická látka ke specifickému štěpení aminokyselinové sekvence na směs peptidů různých délek. Hmotnostní spektrometrie je analytická technika používaná k identifikaci a kvantifikaci analytů pomocí poměru hmotnost/náboj (m/z) iontů uvolněných ze vzorku. Tato metoda je užitečná pro analýzu široké škály analytů, včetně malých molekul, ale i proteinů a peptidů (Rockwood et al., 2018).

První hmotnostní spektrometr byl vyvinut v roce 1912. V současné době mají přístroje širokou škálu aplikací v mnoha odvětvích. Například ve farmaceutickém průmyslu (nová léčiva, farmakokinetika, metabolismus léčiv), klinické biochemii (neonatální screening, analýza hemoglobinu, testování léčiv), v oblasti ochrany životního prostředí (kvalita vody, kontaminace potravin, stanovení znečišťujících látek), geologickém průmyslu

(složení oleje, stanovení uhlovodíkových frakcí v ropném průmyslu), metalurgii, sportu, forenzním odvětví (stanovení jedů a metabolitů léčiv) a biotechnologii (proteiny, peptidy) (Baghel et al., 2017).

Hmotnostní spektrometry pracují tak, že převádějí molekuly analytu do nabitého (ionizovaného) stavu s následnou analýzou iontů a všech fragmentových iontů, které jsou produkovány během ionizačního procesu, na základě jejich poměru m/z . Pro ionizaci i analýzu iontů je k dispozici řada různých technických uspořádání a různých typů hmotnostních spektrometrů a kombinací těchto dvou procesů (Pitt, 2009).

LC-MS je rutinní analytická tandemová technika, která kombinuje separační schopnosti kapalinové chromatografie se schopností hmotnostní analýzy. Ionizace elektrosprejem (ESI) je technika používaná v hmotnostní spektrometrii k tvorbě iontů za použití elektrospreje, při kterém je na kapalinu aplikováno vysoké napětí, aby se vytvořil aerosol. ESI je považována za „měkký“ ionizační zdroj, což znamená, že analytu je dodáváno relativně malé množství energie, a proto dochází k malé fragmentaci. S ESI jsou kompatibilní typická rozpouštědla používaná v kapalinové chromatografii na reverzní i normální fázi LC, jako jsou voda, acetonitril, methanol, ethanol nebo chloroform (Pitt, 2009).

Analyzátor doby letu (time of flight, TOF) pracuje tak, že zrychluje ionty pomocí vysokého napětí. Rychlost iontů, a tedy i doba potřebná k tomu, aby se pohybovaly v letové trubici k dosažení detektoru, závisí na jejich hodnotách m/z . Analyzátor TOF může získat spektra extrémně rychle s vysokou citlivostí. Má také vysokou hmotnostní přesnost, která umožňuje stanovení sumárního složení menších molekul (Pitt, 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Odběr vzorků netopýrů ze zimovišť v České republice byl proveden v souladu s českým zákonem č. 114/1992 Sb., O ochraně přírody a krajiny. Sběr byl založen na povoleních 01662/MK/2012S/00775/MK/2012, 866/JS/2012 a 00356/KK/2008/AOPK vydaných Agenturou ochrany přírody a krajiny České republiky. Schválení všech experimentálních postupů bylo poskytnuto Etickou komisí AV ČR (č. 169/2011). K získání fibroblastů netopýří kůže byl během podzimního rojení v České republice odchycen zdravý netopýr (*M. myotis*).

3.1.2 Použité chemikálie

- 30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (30% roztok akrylamidu a bis-akrylamidu, 29:1) (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (0,25% roztok) (BIO-RAD)
- CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA)
- Aceton; (LACH-NER, Neratovice, ČR)
- Acetonitril p.a. (LACH-NER)
- Benzen (SIGMA-ALDRICH)
- 40% Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte (BIO-RAD)
- Bromfenolová modř (BIO-RAD)
- 1,4-dithiothreitol – DTT (SIGMA-ALDRICH)
- Dodecylsulfát sodný – SDS (MERCK, Darmstadt, Německo)
- Ethanol (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- Glycerol (SIGMA-ALDRICH)
- Glycin (LACH-NER)
- Hydrogenuhličitan amonný (VWR)
- Jodoacetamid (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina chlorovodíková (SIGMA-ALDRICH)

- Kyselina mravenčí (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina octová (SIGMA-ALDRICH)
- 2 -merkaptoethanol (MERCK)
- Methanol bezvodý, 99,8 % (SIGMA-ALDRICH)
- Milli-Q® IQ (MERCK)
- Pepsin (MERCK, Darmstadt)
- Peroxodisíran amonný– APS, karbamid (SIGMA-ALDRICH)
- Proteinové markery molekulové hmotnosti (BIO-RAD)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin - TEMED (SIGMA-ALDRICH)
- Thiourea (thiomočovina) (BIO-RAD)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan /Tris báze (SIGMA-ALDRICH)
- Trypsin (SIGMA-ALDRICH)
- Urea (močovina) (BIO-RAD)

3.1.3 Roztoky

- 10% APS (100 mg APS + 1 ml Milli-Q H₂O)
- Elektrodotový pufr o pH 8,3 10x zředěný (30,3 g Tris báze + 144 g glycinu + 10 g SDS + 600 ml Milli-Q H₂O, po rozpuštění byla směs doplněna destilovanou vodou do 1 l)
- 1.5 M Tris/HCl pufr o pH 8,8 (27,23 g Tris báze + 80 ml Milli-Q H₂O), pH bylo upraveno na 8,8 pomocí 6 N HCl a doplněno Milli-Q H₂O do 150 ml
- 0.5 M Tris/HCl pufr o pH 6,8 (6 g Tris báze + 60 ml Milli-Q H₂O), pH bylo upraveno na 6,8 pomocí 6N HCl a doplněno Milli-Q H₂O do 100 ml
- Neredukující vzorkový nanášecí pufr (3,55 ml Milli-Q H₂O + 1,25 ml 0,5M Tris-HCl + 2,5 ml glycerolu + 2,0 ml 10 % SDS + 0,001 g bromfenolové modři)
- Redukující vzorkový nanášecí pufr (25 µl 2-merkaptoethanolu + 475 µl neredukujícího vzorkového pufru)
- Lyzační pufr (3,55 ml 7M močoviny + 1,25 ml 4M thiomočoviny + 2,5 ml 4% CHAPS + 2,0 ml 0,6% BioLyte + 0,001 g 1% DTT)
- Odbarvovací roztok při štěpení proteinů v gelu (10 ml NH₄HCO₃ + ACN)
- Extrakční pufr (5 ml HCOOH + 95 ml H₂O + 200 ml ACN)
- 0,1 M NH₄HCO₃ (0,7906 g NH₄HCO₃ + 100 ml dH₂O)

- Mobilní fáze na TLC (3 ml CH₃COOH + 3 ml CH₃COCH₃ + 12 ml CH₃OH + 42 ml C₆H₆)
- 2% HCOOH (8 µl HCOOH + 3,2 ml dH₂O)
- Ukazatele molekulové hmotnosti proteinů (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, molekulová hmotnost od 10 do 250 kDa)
- Extrakční disk s reverzní fází C18 (Metadecyl extraction disk)

3.1.4 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy ABJ 0715 (KERN & SOHN, NĚMECKO)
- Bio-Print CX4 Edge (VILBER, FRANCIE)
- Centrifuga (EPPENDORF, NĚMECKO)
- Centrifuga MiniSpin (EPPENDORF)
- Desaga Heidelberg 220V 75W MinUVIS Duo-UV-Source for Thin-Layer and Column-chromatography (DESAGA, NĚMECKO)
- Elektroforetická vana Owl™ EasyCast™ B1A (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Denzitometr GS-800 se softwarem Quantity One® (BIO-RAD)
- Kapalinový chromatograf HPLC Agilent 1100 LC (AGILENT TECHNOLOGIES, USA)
- Laminární box FV001 (ESCO, SINGAPUR)
- Hmotnostní spektrometr MAXIS Q-TOF (BRUKER DALTONICS, NĚMECKO)
- Mikroskop Olympus FV-1000 (OLYMPUS, JAPONSKO)
- Proxeon Easy-nLC (PROXEON BIOSYSTEMS A/S, DÁNSKO)
- Předvážky PCB (KERN & SOHN)
- Koncentrátor Savant™ SP0121P SpeedVac (THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- Třepačka Mini Shaker PSU-2T (BIOSAN, LITVA)
- Ultrazvuková lázeň (BIO-RAD)
- Vana pro TLC desky (DURAN, NĚMECKO)
- Vortex Fisherbrand CLASSIC AGIT. VORTEX 100-240V (IKA, NĚMECKO)
- Vortex IKAR MS3 basic (IKA)

3.1.5 Materiál

- HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s (MERCK)
- HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK)
- Jupiter Proteo 90 A, 250×2 mm (PHENOMENEX, Torrance, Kalifornie, USA)

3.1.6 Softwarové vybavení

- DataAnalysis 4.0 (BRUKER DALTONICS)
- Fluoview FV 1000 (OLYMPUS)
- HyStar 3.2. (BRUKER DALTONICS)
- ProteinScape 3.0.0.446 (BRUKER DALTONICS)
- Quantity One® (BIO-RAD)

3.1.7 Databáze

- Swissprot (EUROPEAN BIOINFORMATICS ORGANISATIONS, USA)
- NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, USA)

3.2 Použité metody

3.2.1 Fluorescenční mikroskopie

Části infikovaných netopýřích křídel zvlhčených destilovanou vodou byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu ve Středisku cytometrie a mikroskopie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV-1000 (LSM mód, 10x zvětšení, excitace 405 nm-UV laser). Ve Středisku cytometrie a mikroskopie byla provedena i charakterizace emisního spektra (tzv. Lambda scan). Lambda skenování bylo prováděno pomocí 5nm spektrálního okna, posunovaného souvisle přes spektrum v rozmezí 415–780 nm, ve 181 krocích, tj. každý krok v šíři 2 nm.

3.2.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Jako další metoda byla provedena TLC s normální (HPTLC – Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄) i s obrácenou fází (HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s). Validace

metody byla ověřena pomocí riboflavinu, jenž byl užit jako pozitivní kontrola. V 1 ml mobilní fáze bylo rozpuštěn 1 mg riboflavinu. Při TLC s normální fází byla použita destička HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10×10 cm, jako stacionární fáze sloužila vrstva silikagelu 60 F₂₅₄ v tloušťce 0,20 mm a mobilní fázi tvořila směs obsahující kyselinu octovou, aceton, methanol a benzen v poměru 5:5:20:70 (Tab. 1). Z mobilní fáze bylo odebráno 200 µl, ve kterých bylo rozpuštěno 5 mg lyofilizovaných extraktů křídel.

TLC s obrácenou fází byla provedena na destičce HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s, 10×10 cm. Stacionární fázi zde tvořil dimethylovaný silikagel a mobilní fáze sestávala z vody a methanolu v poměru 1:1 (Tab. 2). Bylo připraveno 60 ml mobilní fáze, ze které bylo odebráno 200 µl, ve kterých bylo rozpuštěno 5 mg lyofilizovaných extraktů křídel. Jako stacionární fáze sloužila vrstva silikagelu RP-2 F₂₅₄ v tloušťce 0,20 mm.

Na TLC destičky (HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s, 10×10 cm a HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10×10 cm) bylo nanášeno 50 µl vzorku a destička byla umístěna do vyvíjecí komory nasycené parami mobilní fáze tak, aby linie startu s nadávkovaným vzorkem byla umístěna nad hladinu mobilní fáze. Separace probíhala, dokud čelo mobilní fáze nedosáhlo 1 cm pod vrchní okraj destičky. Byla provedena TLC s normální (HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄) i s obrácenou fází (HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s). V případě obou TLC destiček byl pro detekci použit přístroj 220V 75W MinUVIS Duo-UV-Source for Thin-Layer and Column-chromatography (DESAGA, NĚMECKO) s vlnovou délkou UV záření 254 nm a 366 nm

Tab. 1: Složení mobilní fáze TLC o požadovaném objemu 60 ml, normální fáze.

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Kys.octová	3 ml
Aceton	3 ml
Methanol	12 ml
Benzen	42 ml

Tab. 2: Složení mobilní fáze TLC o požadovaném objemu 60 ml, reverzní fáze

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Methanol	30 ml
Voda	30 ml

3.2.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

Tab. 3: Složení lyzačního pufru

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
7M močovina	3,55 ml
4M thiomočovina	1,25 ml
4% CHAPS	2,5 ml
0,6% BioLyte	2,0 ml
1% DTT	0,001g

Vzorky na SDS-PAGE elektroforézu byly připravovány dvěma způsoby. První způsob přípravy vzorku probíhal varem s SDS redukujícím vzorkovým pufrům. Nejprve byl připraven neredukující SDS vzorkový pufr z 0,5M Tris-HCl, glycerolu, 10% SDS, bromfenolové modři a redestilované vody. Dále bylo z neredukujícího SDS vzorkového pufru odebráno 0,5 ml, k němuž bylo přidáno 25 μ l 2-merkapt ethanolu, čímž byl připraven roztok redukujícího vzorkového pufru. Části netopýřích křídel byly nejprve na 30 minut zamrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně lyofilizovány v lyofilizátoru Alpha 1-2 LD plus. Ke 2 mg lyofilizovaného vzorku (křídlo s lézemi; křídlo bez lézí) bylo přidáno 40 μ l SDS vzorkového redukujícího pufru a společně byla směs povařena na plotně 5 minut.

Druhý způsob přípravy vzorku probíhal rozpuštěním v lyzačním pufru (Tab. 3). Ke 2 mg lyofilizovaného vzorku (křídlo s lézemi; blank) bylo přidáno 40 μ l lyzačního pufru a vzorky byly sonikovány ultrazvukem po dobu 10 minut.

3.2.4 1D elektroforéza

Prvním krokem 1D elektroforézy byla příprava separačního 11% polyakrylamidového gelu (Tab. 4) a zároveň řidšího 9% polyakrylamidového gelu (Tab. 5) pro lepší separaci větších proteinů v horní části separačního gelu.

Tab. 4: Složení 11% polyakrylamidového gelu

LÁTKA	Objem jednotlivých složek
Milli-Q H ₂ O	3,7 ml
30% akrylamid/bis-akrylamid	3,7 ml
Tris/HCl pufr (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

Uvedená množství slouží k přípravě dvou 11% polyakrylamidových gelů, rozměry: 8,6 x 6,7 cm, tloušťka gelu 1 mm.

Tab. 5: Složení 9% polyakrylamidového gelu

LÁTKA	Objem jednotlivých složek
Milli-Q H ₂ O	4,4 ml
30% akrylamid/bis-akrylamid	3,0 ml
Tris/HCl pufr (pH 6,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Uvedená množství slouží k přípravě 2 gelů

Tab. 6: Složení 4% polyakrylamidového gelu

LÁTKA	Objem jednotlivých složek
Milli-Q H ₂ O	6,1 ml
30% akrylamid/bis-akrylamid	1,3 ml
Tris/HCl pufr (pH 6,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Uvedené hodnoty slouží k přípravě 2 gelů

Vzniklé roztoky pro přípravu polyakrylamidových gelů byly odvzdušněny v přístroji Concentrator v módu DHV po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 50 µl APS a roztoky byly napipetovány mezi skla, ve kterých byly převrstveny roztokem butanolu a destilované vody v poměru 1:1. Po ztuhnutí obou dolních gelů byl připraven zaostřovací 4% polyakrylamidový gel (Tab. 6).

Vzniklý horní (zaostřovací) gel byl rovněž odvzdušněn v přístroji Concentrator v módu DHV po dobu 5 minut a následně bylo přidáno 50 µl APS a roztok byl napipetován jak na 11% polyakrylamidový dolní gel, tak na 9% polyakrylamidový dolní gel. Poté byly do horního gelu vloženy hřebínky určené k vytvoření jamek a gel se nechal 30 minut zatuhnout. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyňat a gel byl společně se skly vložen do elektroforetické vany. Mezi skla a do elektroforetické vany byl nalit elektrodotový pufr o pH 8,3 (Tab. 7).

Následně bylo do jamek vniklých po ztuhnutí horního gelu nadávkováno pipetou 10 µl jednotlivých vzorků netopýřího křídla (WNS⁺_{neredukující pufr}, WNS⁺_{lysis buffer}, WNS⁻_{neredukující pufr}, WNS⁻_{lysis buffer}) a ukazatele molekulové hmotnosti proteinů (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, molekulová hmotnost od 10 do 250 kDa), jak do 9% gelu, tak i do 11% gelu.

Tab. 7: Složení elektrodového pufru

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Tris báze	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	600 ml

Tab. 8: Složení fixačního roztoku

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Kys. octová	10 ml
Metanol	40 ml
H ₂ O	50 ml

Tab. 9: Složení barvicího roztoku Coomassie brilliant blue

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Coomassie brilliant blue R-250	2,5 g
Metanol	455 ml
Kys. octová	90 ml

Tab. 10: Složení odbarvovacího roztoku

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Kys. octová	90 ml
Metanol	455 ml
H ₂ O	455 ml

Elektroforéza byla spuštěna v první části při napětí 50 V po dobu 20 minut, aby se vzorky seřadily do úzkého pruhu v zaostřovacím gelu. Po 20 minutách byly bílkoviny v gelu separovány při napětí 200 V systémem „Mini-Protean® Tetra cell system”, dokud bromfenolová modř během 45 minut nedosáhla konce gelu. Elektroforéza byla ukončena po 45 minutách. Gely byly přeneseny do 100 ml fixačního roztoku (Tab. 8) a třepány na třepačce 20 minut při 75 rpm. Před vlastním krokem barvení gelů byly vloženy do přístroje Bio-Print CX4 Edge a byla zkontrolována případná fluorescence. Dalším krokem bylo 24hodinové barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 Stain (Tab. 9). I po tomto kroku byly gely vloženy do fluorescenčního detektoru. Následně byla barva nahrazena odbarvovacím roztokem (Tab. 10), v němž byly gely promývány na třepačce po dobu 15 minut. Potom byly gely oskenovány pomocí skeneru GS-800 Calibrated Densitometer se softwarem Quantity One®.

3.2.5 Štěpení proteinů v gelu (SDS-PAGE) trypsinem po odbarvení Coomassie Blue

Gel byl položen na skleněnou desku a byly z něj skalpelem vyříznuty proužky obsahující obarvené proteiny. Tímto způsobem bylo vyřezáno 36 proužků z každého bandu (WNS^+ neredukující pufr, WNS^+ lysis buffer, WNS^- neredukující pufr, WNS^- lysis buffer). Vyříznuté proužky byly vloženy do mikrozkušavek a nadbytečná voda byla odsáta. K proužkům bylo přidáno 100 μl odbarvovacího roztoku (Tab. 11) a za mírného třepání byly odbarvovány po dobu 20 minut. Odbarvovací roztok byl odpipetován a ke každému proužku bylo přidáno 200 μl acetonitrilu. Po 20 minutách byl acetonitril odpipetován a gelové proužky (bandy) byly dosušeny ve SpeedVacu po dobu 15 minut.

K proužkům bylo přidáno 50 μl DTT a nechaly se inkubovat třicet minut při 56 °C. Následně byly proužky ochlazeny na pokojovou teplotu a byl odsán roztok DTT. Bylo přidáno 200 μl acetonitrilu a po 10 minutách byl odstraněn všechn roztok. Následně bylo ke gelovým proužkům přidáno 50 μl roztoku iodoacetamidu a dalších 30 minut probíhala inkubace ve tmě. Poté byl roztok odebrán a bylo přidáno 200 μl acetonitrilu, který působil 10 minut. Po jeho odstranění byly proužky vysušeny ve SpeedVacu.

K vysušeným proužkům bylo přidáno 50 μl roztoku trypsinu. Nakonec byly umístěny přes celou noc do vyhřívaného bloku na teplotu 37 °C. Druhý den ráno byly vzorky vyndány a sonikovány po dobu 5 minut. Roztok byl odpipetován do nových mikrozkušavek. Ke proužkům bylo přidáno 100 μl extrakčního pufru a byly sonikovány 15 minut. Extrakční pufr (Tab. 12) byl přidán k původnímu roztoku trypsinu a extrakce byla ještě jednou zopakována.

Získané extrakty byly vysušeny v lyofilizátoru. Před analýzou vzorků na hmotnostním spektrometru byly extrakty rozpuštěny ve 40 μl 2% kyseliny mravenčí, byly sonikovány po dobu 10 minut a následně centrifugovány po dobu 5 minut při 10.000 rpm.

Tab. 11: Příprava odbarvovacího roztoku

LÁTKY	Objem jednotlivých složek
NH_4HCO_3	10 ml
Acetonitril	10 ml

Tab. 12: Příprava extrakčního pufru

LÁTKY	Objem jednotlivých složek
Kyselina mravenčí	5 ml
Voda	95 ml
Acetonitril	200 ml

3.2.6 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS)

Pro proteomické srovnání vzorků netopýrů s WNS a bez WNS byla použita label-free kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Porovnány byly dvě sady vzorků, zdravá i nemocná tkáň. Po naštěpení byly vzniklé peptidy analyzovány pomocí LC-MS a data byla vyhodnocena pomocí programu Profile Analysis.

Štěpení vzorku bylo provedeno trypsinem a pepsinem. Přibližně 1 mg vzorku bylo rozpuštěno v 0,2 mg/ml trypsinu v 0,1M NH_4HCO_3 (Tab. 13) v poměru enzym/substrát 1:50. Inkubace byla prováděna v termomixeru za 700 rpm při 37 °C po dobu 24 hodin. Vzorek byl následně lyofilizován, rozpuštěn v roztoku 0,2 mg/ml pepsinu v 3% kyselině octové a inkubován 24 hodin za teploty 37 °C v termomixeru při otáčkách 700 rpm. Po odstředění vzorků bylo odebráno 40 μl roztoku, který byl lyofilizován a dále rozpuštěn ve 200 μl 2% kyseliny mravenčí. Takto zhotovený vzorek byl připraven pro stanovení LC/MS. Kontrola byla rovněž inkubována a ošetřena samotným enzymovým roztokem stejným způsobem jako vzorek. Následně byly vzorky zpracovány extrakcí na pevné fázi metodou tzv. „stage tipů“.

Pro každý vzorek byly připraveny dvě plastové mikrozkušavky o objemu 2 ml, přičemž do víček byly vyříznuty otvory natolik veliké, aby se do nich vešla 200 μl špička. Pomocí jehly byl pomalým kroužením vyroben terčík z extrakčního disku s reverzní fází C18 (Metadecyl extraction disk). Ten byl následně vsunut pomocí pistu do konce 200 μl špičky. Špička byla vložena do otvoru víčka připravené mikrozkušavky a bylo přidáno 20 μl čistého metanolu. Mikrozkušavka byla následně vložena do centrifugy na 15 vteřin při 6.000 g. Mikrozkušavka byla opět centrifugována po dobu 30 vteřin při 6.000 g. Bylo přidáno 20 μl 50% metanolu a mikrozkušavka byla opět stočena na 60 vteřin při 6.000 g. Poté bylo přidáno 20 μl 2% ACN s 0,1 % HCOOH a opět stočeno na 60 vteřin při 6.000 g. Následně bylo přidáno 20 μl vzorku a stočeno na 60 vteřin při 6.000 g. Bylo přidáno 20 μl 2% ACN s 0,1 % HCOOH a stočeno na 60 vteřin při 6.000 g. Špička byla přemístěna do nové mikrozkušavky. Bylo přidáno 20 μl 80% ACN s 0,5 % HCOOH a stočeno na 60

vteřin při 6.000g. Tento krok byl dvakrát opakován. Vzorek byl zamražen a lyofilizován. Po lyofilizaci bylo přidáno 20 µl 2% HCOOH a stočeno po dobu 3 minut při 10.000 g. Bylo odebráno 18 µl a nakapáno do plastového inzertu, čímž byly vzorky připraveny k měření.

HPLC přístrojem, který byl použitý pro proteinovou analýzu byl HPLC Agilent 1100 LC, spojený zdrojem typu nanoelektrosprej s hmotnostním spektrometrem MaXis Q-TOF (quadropole-time of flight) s ultravysokým rozlišením. Nástroje LC-MS/MS byly řízeny pomocí softwarových programů HyStar 3.2 a microTOF-control 3.0. Údaje byly shromážděny pomocí programů ProteinScape 3.0 a DataAnalysis 4.0.

Chromatografická separace byla provedena na koloně Jupiter Proteo 90 A, 250×2 mm) za použití Synergi MAX-RP, 4×2.0 mm id jakožto předkolony, která byla použita k ochraně kolony dle standardních postupů Laboratoře proteomiky. Bylo nastříknuto 10 µl peptidové směsi a separace peptidů byla provedena lineárním gradientem mobilní fáze B (acetonitril s 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí). Mobilní fáze A byla voda s 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí. Byl použit následující gradient: 2% mobilní fáze B po dobu 2 minut, následovanou gradientovou elucí na 35% mobilní fáze B v 75 minutách a potom 100% mobilní fáze B během 10 minut. Nakonec byla kolona eluována 100% mobilní fáze B po dobu 10 minut. Po analýze byla kolona ekvilibrována 2% mobilní fáze B po dobu 20 minut. Průtok byl 0,30 ul/min a kolona byla udržována na teplotě 25 °C. Byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Napětí ESI bylo nastaveno na +4,5 kV, rychlost skenování 3 Hz. Provozní podmínky sušícího plynu (N₂) 10 l/min; teplota sušícího plynu 180 °C; tlak nebulizátoru 150 kPa. Pokusy byly prováděny skenováním hodnot m/z v rozsahu 50–2200. Použitým referenčním iontem (Internal Mass Lock) byl jednou nabitý iont C₂₄H₁₉F₃₆N₃O₆P₃ s hodnotou m/z 1221,9906. Hmotnostní spektra odpovídající každému signálu z celkového iontového toku byla zprůměrována, což umožnilo přesné stanovení molekulové hmotnosti.

Tab. 13: Složení 0,1 M NH₄HCO₃

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých složek
Hydrogen uhličitán amonný	0,7906 g
Destilovaná voda	100 ml

3.2.6.1 Vyhledávání v databázi

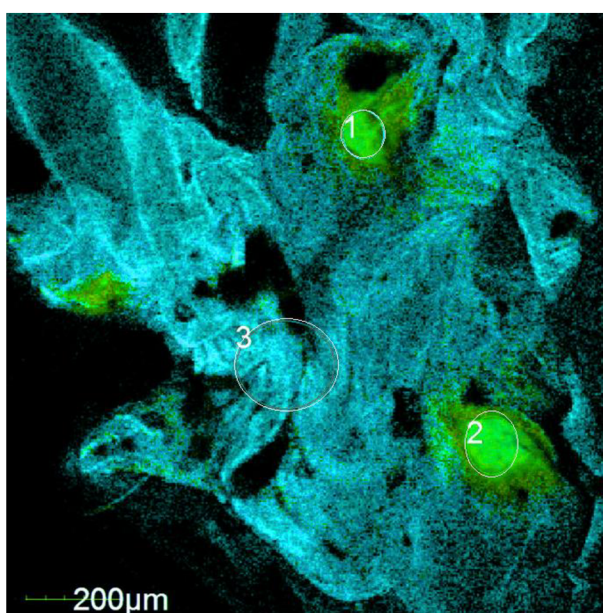
V poslední části experimentu byly ve snaze identifikovat fluorescenční proteiny obsažené v extraktech netopýřích křídel analyzovány tryptické štěpy proteinů pomocí kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu Q-TOF. Proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Data Analysis a ProteinScape 2.0. Jejich rozpoznávání proběhlo na základě shody tandemových MS spekter s databázemi proteinů za pomoci serveru MASCOT. Program ProteinScape informuje o názvu proteinu, relativní molekulové hmotnosti a o tzv. MASCOT skóre. MASCOT skóre pro protein je součet skóre pro jednotlivé peptidy, přičemž pro pozitivní identifikaci proteinu musí být skóre MASCOT skóre nad 95% úrovní spolehlivosti. Vzhledem k tomu, že MASCOT skóre proteinu musí být dostatečně vysoké, aby byla relevantní pravděpodobnost shody s identifikovaným proteinem a protein tak byl uznán jako validní, bylo skóre arbitrárně nastaveno na 100.

Data byla zpracována pomocí softwaru ProteinScape v. 3.0.0.446. Proteiny byly identifikovány srovnáním tandemových hmotnostních spekter s databázemi NCBI 201601 (79.702.939 sekvencí; 29.121.182.151 štěpů) a Swissprot 202003 (562.755 sekvencí; 202.599.198 štěpů). Použité taxonomické filtry byly savčí a plísňové. Trypsin byl vybrán jako parametr enzymu. Byla povolena tři vynechaná štěpení a pro MS byla použita počáteční tolerance peptidové hmotnosti $\pm 0,015$ Da a pro analýzu MS/MS $\pm 0,03$ Da. Jako variabilní modifikace byly nastaveny hydroxylace prolinu a lysinu a oxidace methioninu. Náboj monoisotopického peptidu byla nastaven na 1+, 2+ a 3+. Během procesu vyhledávání dat byla vybrána možnost Peptide Decoy, aby se odstranily falešně pozitivní výsledky. Přijaty byly pouze významné zásahy (skóre MASCOT ≥ 80 pro proteiny a skóre MASCOT ≥ 20 pro peptidy, <http://www.matrixscience.com>). Všechny peptidy a proteiny byly dodatečně manuálně verifikovány, v systému byla vizuálně ověřována validita spekter.

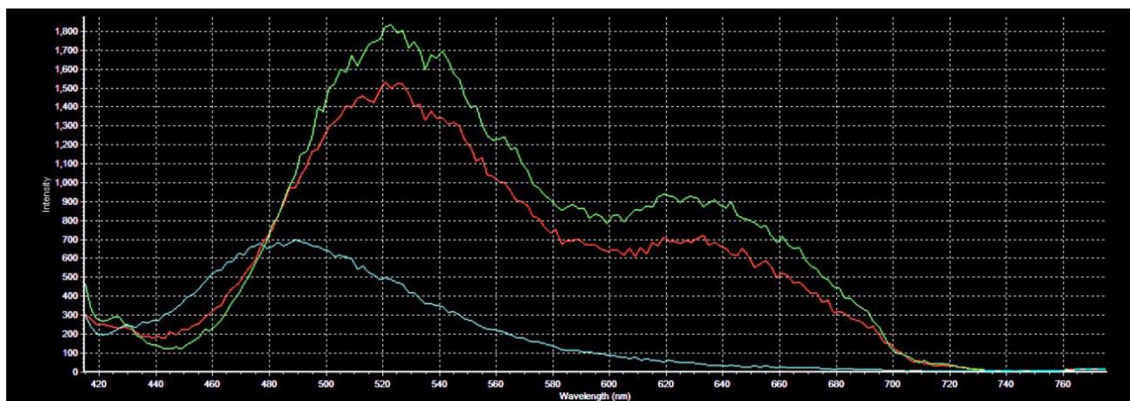
4 VÝSLEDKY

4.1 Detekce fluoreskujících látek v křídlech infikovaných netopýrů metodou konfokální mikroskopie

Pomocí metody konfokální mikroskopie bylo porovnáno emisní spektrum zdravého křídla a křídla s lézí při excitaci UV laserem s vlnovou délkou 405 nm. Zdravé křídlo mělo emisní maximum 490 nm (Obr. 6, 7). Naopak léze vykazovaly dvěma emisními maxima s naměřenými hodnotami 520 nm a 640 nm (Obr. 6, 7).



Obr. 6: Křídlo netopýra velkého (*Myotis myotis*) ze štoly Velká Amerika postiženého houbou *P. destructans* pod konfokálním mikroskopem Olympus FV-1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan; LSM mód, 10× zvětšení, excitace 405 nm-UV laser, program Fluoview FV 1000, verze 2.0, DAPI filtr set). Z vyznačených bodů 1 (léze), 2 (léze), 3 (zdravé křídlo), bylo hodnoceno emisní spektrum tzv. Lambda scan (uvedeno níže). Fotografie byly pořízeny ve spolupráci s Centrem cytometrie a mikroskopie, MBÚ AV ČR.



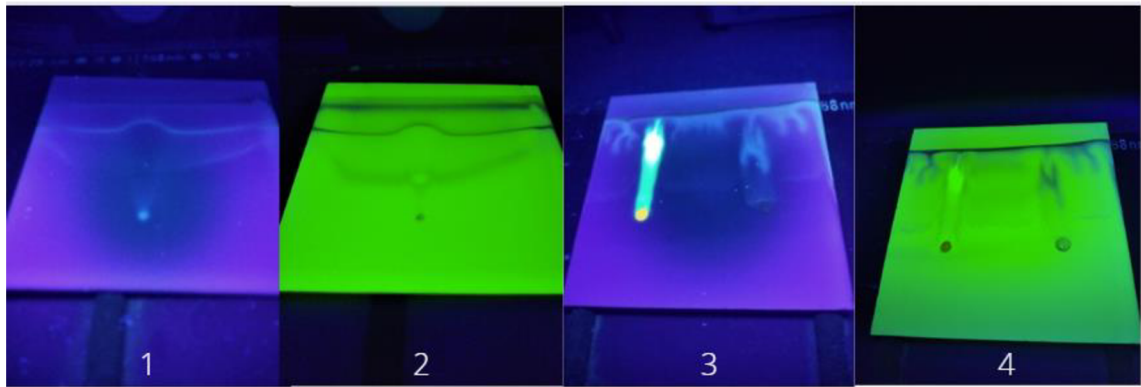
Obr. 7: Charakterizace emisního spektra (tzv. Lambda scan). Lambda skenování bylo provedeno pomocí 5 nm spektrálního okna, posunovaného souvisle přes spektrum v rozmezí 415-780 nm, ve 181 krocích, každý krok byl v šíři 2 nm. Červená křivka znázorňuje spektrum bodu 1 (léze; viz Obr. 6) a bodu 2 (léze) s lokálními fluorescenčními maximy 520 nm a 640 nm. Modrá křivka znázorňuje spektrum bodu 3 (zdravé křídlo) s fluorescenčním maximem 490 nm. Emisní spektrum bylo pořízeno ve spolupráci s Centrem cytometrie a mikroskopie, MBÚ AV ČR.

4.2 Analýza fluoreskujících látek metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

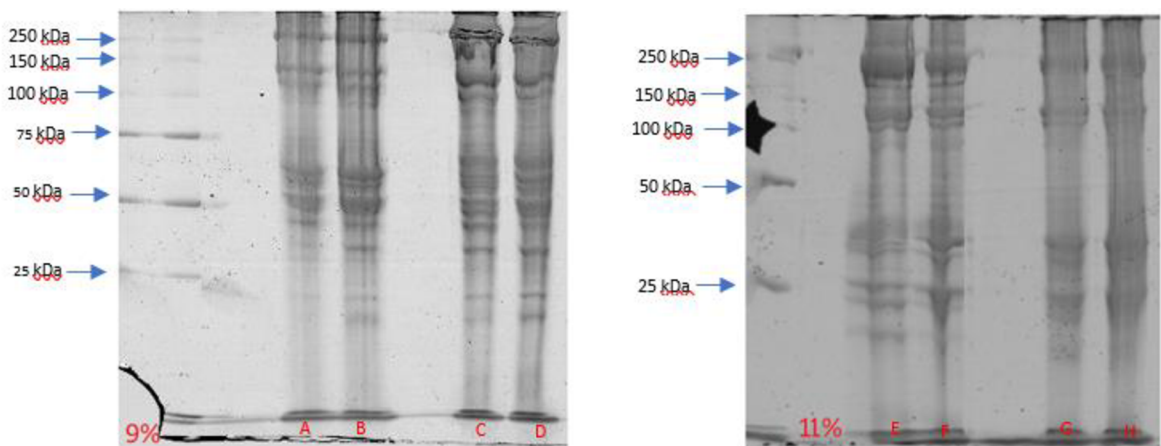
Jako další metoda byla provedena TLC z extraktů křídel postižených WNS. Jak na destičce, kde stacionární fází tvořil dimethylovaný silikagel, tak na destičce, kde stacionární fází byl silikagel, nebyla zjištěna fluorescence. Měření probíhalo při dvou vlnových délkách daných nastavením přístroje, a to 366 nm a 254 nm. V případě použití riboflavinu jakožto pozitivní kontroly byla při 366 nm pozorována fluorescence (Obr. 8).

4.3 Separace a detekce proteinů z extraktů netopýřích křídel metodou SDS-PAGE

Separace a detekce proteinů byla provedena ze vzorku netopýřího křídla společně se standardem v 9% gelu a 11% gelu. Koncentrace separačních SDS-PAGE gelů byla zvolena pro lepší separaci proteinů o vyšší molekulové hmotnosti. Proteiny s větší hmotností by tak měly být v řidším gelu výrazněji rozděleny a lépe hodnotitelné. Po provedení SDS-PAGE elektroforézy byla provedena detekce proteinů detekčním činidlem s Coomassie Brilliant Blue a výsledný gel skenován denzitometrem. Příklady obarvených gelů jsou prezentovány na Obr. 9.



Obr. 8: TLC s obrácenou fází (HPTLC-Fertigplatten, RP-2 F₂₅₄ s), 10×10 cm. Stacionární fází tvořil dimethylovaný silikagel a mobilní fáze sestávala z CH₃OH a H₂O (50:50) při 366 nm (1) a 254 nm (2). TLC s normální fází (HPTLC- Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄), 10×10 cm, stacionární fází byl silikagel a mobilní fáze tvořila směs CH₃COOH, CH₃COCH₃, CH₃OH a C₆H₆ v poměru 5:5:20:70 při 366 nm (3) a 254 nm (4), přičemž v levé části gelu byl užit riboflavin jako pozitivní kontrola. V pravé části (nevykazující fluorescenci) byly napipetovány extrakty z WNS postižených křídel.



Obr. 9: Separace proteinů metodou SDS-PAGE v 9% a 11% polyakrylamidovém gelu. Detekce proteinů byla provedena Coomassie Brilliant Blue. Molekulové hmotnosti proteinových markerů jsou udávány v kDa. V 9% SDS-PAGE gelu byly separovány proteiny z křídla netopýra negativního na WNS extrahovány v lyzačním pufru (A) a v SDS redukujícím vzorkovém pufru (C). Proteiny z křídla netopýra pozitivního na WNS byly na extrahovány v lyzačním pufru (B) a v SDS redukujícím vzorkovém pufru (D). V 11% SDS-PAGE gelu byly separovány proteiny z křídla netopýra pozitivního na WNS byly extrahovány v lyzačním pufru (F) a v SDS redukujícím vzorkovém pufru (H). Proteiny z křídla netopýra negativního na WNS byly extrahovány v lyzačním pufru (E) a v SDS redukujícím vzorkovém pufru (G).

Před vlastní LC/MS předcházela kontrola fluorescence gelů pomocí fluorescenčního detektoru. Gely nevykazovaly jakoukoliv fluorescenční aktivitu.

4.4 Identifikace proteinů metodou kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Pomocí LC/MS bylo analyzováno složení 36 proužků (WNS^+ neredukující pufr, WNS^+ lysis buffer, WNS^- neredukující pufr, WNS^- lysis buffer) vyřezaných z SDS-PAGE gelů. Proteiny byly štěpeny trypsinem a pepsinem a výsledné peptidů purifikovány metodou stage tip. Lyofilizované vzorky ošetřené kyselinou mravenčí byly následně zanalyzovány. Vyhodnocení peptidového složení proběhlo v databázi Swissprot, která je jednodušší a verifikovaná, ale poskytuje výsledky pouze pro proteiny z jiných živočišných druhů (562.755 sekvencí; 202.599.198 štěpů; dle údajů ze dne 3. 2. 2021). Využita byla také databáze NCBI. Tato databáze je obsáhlejší, a navíc poskytuje záznamy pro proteiny z různých druhů netopýrů (79.702.939 sekvencí; 29.121.182.151 štěpů; dle údajů ze dne 2. 2. 2021).

Mezi vzorky, jež byly pozitivní na WNS a těmi, které byly na WNS negativní, nebyly významné rozdíly v rámci složení proteinů. Při identifikaci proteinů v databázi Swissprot (tabulka 15) byla u WNS pozitivních i WNS negativních vzorků zjištěna přítomnost kolagenu typu I alfa 1 (COL1A1) a keratinu typu II cytoskeletal 5 (KRT5) (Tab. 14). V databázi NCBI byla v obou, WNS pozitivních i WNS negativních, vzorcích zjištěna přítomnost kolagenů typu I, alfa 1 (COL1A1) a alfa 2 (COL1A2), keratinů typu I - keratin 10 (KRT10) a keartion 16 (KRT16), keratinů typu II - keratin 2 (KRT2) a keratin 5 (KRT5) a aktinu (Tab. 15). Proteomická analýza (obě databáze) neposkytla jakékoliv relevantní výsledky týkající se přítomnosti proteinů plísní, neboť MASCOT skóre dosahovalo velice nízkých hodnot.

Tab. 14: Nejvýznamnější proteiny identifikované v křídle s WNS a bez WNS v databázi SwissProt

Swissprot	PROTEIN	MASCOT SKÓRE	MW (kDA)
WNS +	Collagen alpha-1(I) chain	87	138,7
WNS +	Collagen alpha-1(I) chain	102	137
WNS +	OS		
WNS +	Keratin, type II cytoskeletal 5	136	61
WNS -	Collagen alpha-1(I) chain	91	133,4
WNS -	Collagen alpha-1(I) chain	87	126
WNS -	Keratin, type II cytoskeletal 5	92	66,2

Tab. 15: Nejvýznamnější proteiny identifikované v křídle s WNS v databázi NCBI

NCBI	PROTEIN	MASCOT SKÓRE	MW (kDA)
WNS +	Actin, alpha skeletal muscle [<i>M. davidii</i>]	106	40
WNS +	Collagen alpha-1(I) chain [<i>E. fuscus</i>]	86	138,4
WNS +	Collagen alpha-2(I) chain [<i>M. brandii</i>]	97	129
WNS +	Keratin, type I cytoskeletal 10 [<i>M. brandii</i>]	98	55,2
WNS +	Keratin, type I cytoskeletal 14 [<i>M. lucifugus</i>]	162	52,3
WNS +	Keratin, type I cytoskeletal 16-like isoform X2 [<i>M. davidii</i>]	106	51,4
WNS +	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [<i>M. davidii</i>]	127	64
WNS +	Keratin, type II cytoskeletal 5 [<i>M. davidii</i>]	130	63,2
WNS -	Actin, alpha skeletal muscle [<i>M. davidii</i>]	92	41,4
WNS -	Collagen alpha-1(I) chain [<i>E. fuscus</i>]	85	122,3
WNS -	Collagen alpha-2(I) chain [<i>M. brandii</i>]	96	127,2
WNS -	Keratin, type I cytoskeletal 10 [<i>M. brandii</i>]	99	59
WNS -	Keratin, type I cytoskeletal 14 [<i>M. lucifugus</i>]	131	63,1
WNS -	Keratin, type I cytoskeletal 16-like isoform X2 [<i>M. davidii</i>]	104	51
WNS -	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [<i>M. davidii</i>]	186	57,2
WNS -	Keratin, type II cytoskeletal 5 [<i>M. davidii</i>]	130	63,1

5 DISKUZE

Cílem experimentální části rigorózní práce bylo identifikovat fluorescenční proteiny spojené s WNS. Přístup zahrnoval kombinaci několika metod. První použitou metodou bylo hodnocení autofluorescence netopýřího křídla ve vzorku vykazujícího jak fyziologický vzhled, tak přítomnost patologických lézí. Výsledky z konfokální mikroskopie určily, že zdravé křídlo se vyznačuje emisním maximem okolo 490 nm. Hypotetických zdrojů vysvětlujících toto maximum existuje několik. Nejpravděpodobnějším jsou elastinová vlákna, která se v křídlech netopýřů přirozeně vyskytují (Cheney et al., 2017). Dle Lowndesové (2010) odpovídá emisní maximum elastinu zmíněným 490 nm. Dalším zdrojem by v případě netopýřů mohl být např. i karoten. Jeho absorpční vrchol v nepostižené kůži člověka se nachází při vlnové délce 482 nm (Lowndes, 2010). Dle Galvána et al. (2016) vykazuje tropický druh honduraského bílého netopýra *Ectophylla alba* schopnost asimilace a ukládání karotenoidního pigmentu zvaného lutein, vedoucího k oranžovému zabarvení tkání. Do jaké míry je však podobný pigment přítomný v kůži dalších druhů netopýřů, není známo.

Křídlo postižené WNS se naopak vyznačovalo dvěma emisními maximy s hodnotami 520 nm a 640 nm. Tento výsledek koreluje s výsledky Fliegera et al. (2016), jež zjistili, že emisní spektrum lézí WNS má dva charakteristické píky s maximy při 510–518 nm a 633–641 nm. Nižší emisní maximum je s nejvyšší pravděpodobností způsobeno přítomností riboflavinu. Jakmile *P. destructans* napadne epidermis, začne produkovat tento vitamín, který způsobí fluorescenci lézí pod UV světlem. Riboflavin přispívá k nekróze pozorované u netopýřů postižených WNS po probuzení se z torporu a lze jej považovat za faktor virulence (Davy et al., 2020; Flieger et al., 2016). Riboflavin vykazuje jediný emisní pruh korelující s nižším maximem. Jeho hodnota může kolísat v závislosti na podmínkách měření. Ve fosfátovém pufru, fyziologickém pH a osmolaritě a pokojové teplotě vykazuje 513 nm (Flieger et al., 2016). Ve směsi fosfátového a citrátového pufru a teplotě 25 °C se nachází při 525 nm (Yang et al., 2016). Ve vyváženém solném roztoku s kombinovaným fosfátovým a uhličitanovým pufrem může dosáhnout až 533 nm (Zhang et al., 2012). Zdroj vyššího emisního maxima nebyl ale doposud objasněn. Mohlo by se například jednat o endogenní fluorofory, jako je kolagen, elastin nebo NADH, které mají emisní pík okolo 630 nm (Lowndes, 2010).

Další molekulou s maximem emisního spektra při 640 nm je porfyrin. Tato látka při excitaci světlem o vlnové délce 400 nm silně fluoreskuje. Na druhou stranu porfyriny vykazují dva silné emisní pruhy o vlnové délce 600–610 nm a 640–660 nm (Sies et al., 2015). Jejich emisní spektrum se tak neshoduje s pozorovaným spektrem lézí. K odpovědi stran možného zdroje vyššího maxima by mohlo přispět zkoumání fluorescence samotného parazita. Ta však v našich pokusech řešena nebyla. Rovněž nebyla zkoumána v experimentech dalších autorů zabývajících se problematikou *P. destructans*.

Další metodou, kterou byly léze analyzovány, byla TLC. Tuto metodu lze použít pro studium malých molekul (Vázquez-Martínez & López 2018) a mohla by tak přispět k identifikaci zdrojů fluorescence v tkáních netopýrů postižených WNS. V rámci postupu byly použity dvě odlišné kombinace mobilních a stacionárních fází, jedna zaměřená na detekci hydrofobních a druhá vhodná spíše pro hydrofilní látky. Pro fluorescenční detekci sloužila lampa s dvěma excitačními vlnovými délkami 254 a 366 nm. Podobné nastavení by tak rovněž mohlo pomoci přispět k prokázání přítomnosti riboflavinu. Dle Yanga et al. (2016) existují pro tento vitamin tři silné fluorescenční oblasti, jejichž excitační střed se nachází při 270, 370 a 450 nm, přičemž vlnová délka emise je ve všech případech stejná (525 nm). Riboflavin je nejlépe detekovatelný při excitaci 270 nm, kde je intenzita fluorescence čtyřikrát vyšší než u 450 nm. Tento experiment nicméně neprokázal jakýkoliv relevantní výsledek. Byla pozorována pouze fluorescence riboflavinu jakožto pozitivní kontroly. Za poznámku rovněž stojí fakt, že emise pozitivní kontroly byla při 366 nm intenzivnější, což by mohlo souviset s velikostí rozdílů mezi použitými vlnovými délkami lampy a samotnými excitačními optimy. Vlastní vysvětlení negativního nálezu pokusu by mohlo souviset s citlivostí použité metody. Pro pozitivní kontrolu byla použita poměrně vysoká koncentrace látky (50 μl , 999 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V lézích se dle Fliegera et al. (2016) naopak pohybuje průměrná koncentrace riboflavinu od 54 do 141 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Limitaci rovněž představuje množství vzorku, které je pro měření možné získat. Oproti TLC samozřejmě existují citlivější chromatografické techniky vhodné pro detekci riboflavinu. Gliszczyńska-Świgło & Rybicka (2015) použili pro separaci a stanovení riboflavinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Chen et al. (2020) ve své studii vyvinul a ověřil metodu HPTLC přizpůsobenou pro stanovení riboflavinu v rýžových nudlích. Tento postup dokonce vykazovala vyšší citlivost, účinnost a spolehlivost ve srovnání s konvenční HPLC. Obě tyto metody nebyly k dispozici. Vzhledem k negativnímu nálezu se proto v dalších TLC experimentech nepokračovalo.

Třetí použitou metodou byla SDS-PAGE, se kterou jsme se pokusili separovat proteiny z extraktů netopýřích křídel. Zdrojem fluorescence mohou být vysokomolekulární látky. Před nařezáním byly proto gely zkontrolovány pomocí fluorescenčního detektoru. Gely však nevykazovaly jakoukoliv fluorescenční aktivitu. Abychom vyloučili nechtěnou interakci separovaných proteinů s barvivem sloužícím pro jejich vizualizaci, byly pod UV světlem prohlédnuty oba gely i bez obarvení. Výsledek však zůstal negativní. Nepřítomnost vysokomolekulárních fluorescenčních látek v lézích netopýřů postižených WNS nicméně není i přesto možné vyloučit. Fluorescenci dokáží ovlivnit i konformační změny molekul. Zde svoji roli tak mohlo sehrát složení elektrodového pufru. SDS-PAGE probíhá v přítomnosti silného denaturačního činidla (Arakawa et al., 2022). Vliv mohlo mít i použití fixačního roztoku. Kyselina octová a metanol denaturují proteiny a vytváří kyselé prostředí (Goldring, 2018), které může fluorescenci ovlivňovat (Hackl et al., 2015).

Účelem posledního postupu bylo ověřit, zdali je možné pomocí LC-MS nalézt odlišné spektrum proteinů ve zdravé a postižené tkáni. V našem případě při porovnání všech 36 bandů získaných z SDS-PAGE gelů nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ve složení proteinů. Dle databáze Swissprot se v obou typech vzorků se vyskytovaly zejména kolageny a keratiny. Databáze NCBI navíc pouze odlišila jejich jednotlivé subtypy a doplnila výsledek o přítomnost aktinu. Ve výsledcích by teoreticky bylo možné očekávat proteiny parazita nebo zánětlivé odpovědi organismu na jeho přítomnost. Pannkuk et al. (2015) pomocí hmotnostní spektrometrie (SDS-PAGE, MALDI TOF) identifikoval 7 extracelulárních proteinů *P. destructans*, včetně katalázy/peroxidázy HPI, proteinům podobým fungální FAD-vázající oxidoreduktáze, fungální podjednotce A glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferázy, fungální GH chitináze, S8 serinové peptidáze a fungálnímu proteinu pro přenos fosfolipidů. Jeden protein o hmotnosti 70 kDA se nepodařilo přesněji identifikovat. Na druhou stranu byly tyto experimenty provedeny s *P. destructans* kultivovanou *in vitro*, čímž měl tým k dispozici poměrně vysoké množství biologického vzorku. Otázkou také zůstává, do jaké míry parazit produkuje tyto faktory *in vivo*. Co se týče zánětlivé odpovědi organismu Hecht-Höger et al. (2020) porovnali proteomický profil krevní plazmy u zdravých a WNS pozitivních netopýřů, a to jak evropských (*M. myotis*), tak severoamerických (*M. lucifugus*). Studie pouze prokázala rozdíly u zdravých a WNS kolonizovaných severoamerických netopýřů, ale nikoliv u evropských. Rozdíly v proteomických profilech plazmy mezi evropskými

a severoamerickými druhy netopýrů infikovanými *P. destructans* naznačují, že evropských netopýrů se vyvinuly mechanismy tolerance vůči infekci tímto patogenem. To koreluje s výsledky této práce a je tudíž možné, že se podobná tolerance mohla vyvinout i v samotném místě infekce. Subtilnější změny proteomických profilů bude proto nutné analyzovat pomocí citlivějších technik.

6 ZÁVĚR

Rigorózní práce se zabývá problematikou syndromu bílého nosu u netopýrů, původu a patogenezi onemocnění a charakteristikou jejich původce, a dále pak biochemickými a imunologickými markery WNS a autofluorescencí. Poslední část literární rešerše je věnována popisu jednotlivých metod užitých v experimentální části práce. V experimentální části byla cílem indentifikace fluorescenčních proteinů spojených se syndromem bílého nosu.

Konfokální mikroskopie odhalila, že zdravé křídlo má jedno emisní maximum při vlnové délce 490 nm, odpovídající běžně se v tkáních vyskytujícímu elastinu, oproti tomu nemocné křídlo má emisní maxima dvě – 520 nm odpovídající svou vlnovou délkou riboflavinu a 640 nm, jehož zdroj nebyl doposud objasněn.

SDS-PAGE elektroforéza byla použita pro detekci vysokomolekulárních látek, které mohly být zdrojem fluorescence. Gely sice při kontrole pomocí fluorescenčního detektoru nevykazovaly žádnou fluorescenční aktivitu, avšak nepřítomnost vysokomolekulárních fluorescenčních látek nebylo možné, vzhledem k vlivu konformačních změn molekul na fluorescenci, vyloučit.

Metoda LC-MS byla použita pro porovnání spektra proteinů ve zdravé a postižené tkáni. Ve vzorcích získaných z SDS-PAGE gelů se vyskytovaly zejména kolageny a keratiny.

Na základě získaných dat nebyl objasněn zdroj fluorescenčního záření. V příštích experimentech bude vhodnější zařadit postupy, které by vedly k depleci abundantních proteinů (kolagenu, keratinu, aktinu) ve vzorku nebo nahrazení náročnější 2D elektroforézy na místo její 1D varianty.

7 LITERATURA

Alves, D. M., Terribile, L. C., Brito, D. (2014). The potential impact of white-nose syndrome on the conservation status of north american bats. *PloS one*, 9(9), e107395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107395>

Anderson N.B. (2018): Immune Function and Metabolism of Hibernating North American Bats with White-Nose Syndrome. [Diplomová práce]. Missouri State University, Missouri, USA.

Arakawa, T., Nakagawa, M., Tomioka, Y., Sakuma, C., Li, C., Sato, T., Sato, R., Shibata, T., Kurosawa, Y., Akuta, T. (2022). Gel-electrophoresis based method for biomolecular interaction. *Methods in cell biology*, 169, 67–95. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.12.030>

Atabaev, T., & Hong, N. H. (2019). Silica-Based Nanostructures in Biomedicine. In: *Nano-Sized Multifunctional Materials: Synthesis, Properties and Applications*. Elsevier.

Baghel SU., Singh A., Singh D., Sinha M. & Sharmin E., Zafar F. (2017). Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, In: *Spectroscopic Analyses - Developments and Applications*. IntechOpen.

Biegańska M. J. (2014). Two fundamentals of mammalian defense in fungal infections: endothermy and innate antifungal immunity. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(3), 555–567. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0084>

Blehert, D. S., Hicks, A. C., Behr, M., Meteyer, C. U., Berlowski-Zier, B. M., Buckles, E. L., Coleman, J. T., Darling, S. R., Gargas, A., Niver, R., et al. (2009). Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science* (New York, N.Y.), 323(5911), 227. <https://doi.org/10.1126/science.1163874>

Bouma, H. R., Carey, H. V., Kroese, F. G. (2010). Hibernation: the immune system at rest? *Journal of leukocyte biology*, 88(4), 619–624. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310174>

Brunelle L.J., & Green R., & Lorsch J. (2014). One-dimensional SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, In: *Methods in Enzymology*. Academic Press.

Cai L. & Gallagher R.S., Wiley E.A. (2014). Thin Layer Chromatography. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley & Sons, Inc.

Casadevall A. (2005). Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal genetics and biology: FG & B*, 42(2), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.11.008>

Croce, A. C., & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(4), 2461. <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2461>

Drees, K. P., Lorch, J. M., Puechmaille, S. J., Parise, K. L., Wibbelt, G., Hoyt, J. R., Sun, K., Jargalsaikhan, A., Dalannast, M., Palmer, J. M., et al. (2017). Phylogenetics of a Fungal Invasion: Origins and Widespread Dispersal of White-Nose Syndrome. *mBio*, 8(6), e01941-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01941-17>

Farina, L. L., & Lankton, J. S. (2018). Chiroptera. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*, 607–633. doi:10.1016/b978-0-12-805306-5.00025-0

Field, K. A., Johnson, J. S., Lilley, T. M., Reeder, S. M., Rogers, E. J., Behr, M. J., Reeder, D. M. (2015). The White-Nose Syndrome Transcriptome: Activation of Anti-fungal Host Responses in Wing Tissue of Hibernating Little Brown Myotis. *PLoS pathogens*, 11(10), e1005168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005168>

Fišar Z. (2009). Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. *Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze*. <http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskopie-v-neurovedach>. (5.5.2021).

Flieger, M., Bandouchova, H., Cerny, J., Chudičková, M., Kolarik, M., Kovacova, V., Martinková, N., Novák, P., Šebesta, O., Stodůlková, E., et al. (2016). Vitamin B2 as a virulence factor in *Pseudogymnoascus destructans* skin infection. *Scientific reports*, 6, 33200. <https://doi.org/10.1038/srep33200>

Foley, J., Clifford, D., Castle, K., Cryan, P., Ostfeld, R. S. (2011). Investigating and managing the rapid emergence of white-nose syndrome, a novel, fatal, infectious disease of hibernating bats. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, 25(2), 223–231. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01638.x>

Frick W.F., Puechmaille S.J., Willis C.K.R., & Voigt C., Kingston T. (2016): White-Nose Syndrome in Bats. In: *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer.

Galván, I., Garrido-Fernández, J., Ríos, J., Pérez-Gálvez, A., Rodríguez-Herrera, B Negro, J. J. (2016). Tropical bat as mammalian model for skin carotenoid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), 10932–10937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609724113>

Gargas A., Trest M.T., Christensen M., Volk T.J., Blehert D.S. (2009). *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon*, 108, 147–154. <https://doi.org/10.5248/108.147>

Ghauharali, R. I., & Brakenhoff, G. J. (2000). Fluorescence photobleaching-based image standardization for fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 198 (Pt 2), 88–100. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00683.x>

Goldring J. (2018). The Roles of Acetic Acid and Methanol During Fixing and Staining Proteins in an SDS-Polyacrylamide Electrophoresis Gel. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1853, 15–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0_2

Hackl, E. V., Darkwah, J., Smith, G., Ermolina, I. (2015). Effect of acidic and basic pH on Thioflavin T absorbance and fluorescence. *European biophysics journal: EBJ*, 44(4), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1019-8>

Hayman, D. T., Pulliam, J. R., Marshall, J. C., Cryan, P. M., Webb, C. T. (2016). Environment, host, and fungal traits predict continental-scale white-nose syndrome in bats. *Science advances*, 2(1), e1500831. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500831>

Hegyí, J., Hegyí, V., Ruzicka, T., Arenberger, P., Berking, C. (2011). New developments in fluorescence diagnostics. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 9(5), 368–372. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07582.x>

Hecht-Höger, A. M., Braun, B. C., Krause, E., Meschede, A., Krahe, R., Voigt, C. C., Greenwood, A. D., Cziráj, G. Á. (2020). Plasma proteomic profiles differ between European and North American myotis bats colonized by *Pseudogymnoascus destructans*. *Molecular ecology*, 29(9), 1745–1755. <https://doi.org/10.1111/mec.15437>

Chaturvedi, V., DeFiglio, H., Chaturvedi, S. (2018). Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. *F1000Research*, 7, 665. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15067.2>

Chen, Y., Huang, C., Hellmann, B., Xu X. (2020). HPTLC-Densitometry Determination of Riboflavin Fortified in Rice Noodle: Confirmed by SERS-Fingerprint. *Food Anal. Methods*, 13, 718–725. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01694-2>

Cheney, J. A., Allen, J. J., Swartz, S. M. (2017). Diversity in the organization of elastin bundles and intramembranous muscles in bat wings. *Journal of anatomy*, 230(4), 510–523. <https://doi.org/10.1111/joa.12580>

- Icha, J., Weber, M., Waters, J. C., Norden, C. (2017). Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 39(8), 10.1002/bies.201700003. <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>
- Jensen E. C. (2012). Types of imaging, Part 2: an overview of fluorescence microscopy. *Anatomical record* (Hoboken, N.J.: 2007), 295(10), 1621–1627. <https://doi.org/10.1002/ar.22548>
- Kolenc, O. I., & Quinn, K. P. (2019). Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxidants & redox signaling*, 30(6), 875–889. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>
- Kumar S., Sarangi M., Jyotirmayee K. (2013). Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 18(1), 126-132. https://www.researchgate.net/publication/288314467_Thin_layer_chromatography_A_tool_of_biotechnology_for_isolation_of_bioactive_compounds_from_medicinal_plants
- Leopardi, S., Blake, D., Puechmaille, S. J. (2015). White-Nose Syndrome fungus introduced from Europe to North America. *Current biology: CB*, 25(6), 217–219. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.047>
- Lewis W.H., & Moody J.CH. & Wiley Blackwell (1989). *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*. Blackwell Scientific Publications.
- Lilley, T. M., Prokkola, J. M., Johnson, J. S., Rogers, E. J., Gronsky, S., Kurta, A., Reeder, D. M., Field, K. A. (2017). Immune responses in hibernating little brown myotis (*Myotis lucifugus*) with white-nose syndrome. *Proceedings. Biological sciences*, 284(1848), 20162232. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2232>
- Lowndes S. (2010): Blood interference in fluorescence spectrum – Experiment, analysis and comparison with intraoperative measurements on brain tumor. [Bakalářská práce]. FHNW, Švýcarsko.
- Martinkova N., Pikula J., Zukal J., Kovacova V., Bandouchova H., Bartonicka T., Botvinkin D.A., Brichta J., Dundarova H., Kokurewicz T., et al. (2018). Hibernation temperature-dependent *Pseudogymnoascus destructans* infection intensity in Palearctic bats, *Virulence*, 9(1), 1734–1750. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1548685>
- McGuire, L. P., Mayberry, H. W., Willis, C. (2017). White-nose syndrome increases torpid metabolic rate and evaporative water loss in hibernating bats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 313(6), 680–686. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00058.2017>
- Meyer G. A., Senulis J. A., Reinartz J. A. (2016). Effects of temperature and availability of insect prey on bat emergence from hibernation in spring. *Journal of Mammalogy*, 97(6), 1623–1633. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw126>
- Minnis, A. M., & Lindner, D. L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal biology*, 117(9), 638–649. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.07.001>
- Ninfa J.A., Ballou P.D., & Benore M. (2010). *Gel Electrophoresis of Proteins, In: Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*, 2nd Edition. Fitzgerald Science Press.
- Pannkuk, E. L., McGuire, L. P., Warnecke, L., Turner, J. M., Willis, C. K., Risch, T. S. (2015). Glycerophospholipid Profiles of Bats with White-Nose Syndrome. *Physiological and biochemical zoology: PBZ*, 88(4), 425–432. <https://doi.org/10.1086/681931>

- Pannkuk, E. L., Risch, T. S., Savary, B. J. (2015). Isolation and identification of an extracellular subtilisin-like serine protease secreted by the bat pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. *PLoS one*, 10(3), e0120508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120508>
- Peterson D.A. & Kompoliti K., Metman V.L. (2010). Confocal Microscopy, In: *Encyclopedia of Movement Disorders*. Academic Press.
- Petrov A., Tsa A., Puglisi D.J., & Lorsch J., (2013). Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis, In: *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19224008/>
- Puechmaille, S. J., Verdeyroux, P., Fuller, H., Gouilh, M. A., Bekaert, M., Teeling, E. C. (2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. *Emerging infectious diseases*, 16(2), 290–293. <https://doi.org/10.3201/eid1602.091391>
- Raudabaugh, D. B., & Miller, A. N. (2013). Nutritional capability of and substrate suitability for *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *PLoS one*, 8(10), e78300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078300>
- Reeder, D. M., Frank, C. L., Turner, G. G., Meteyer, C. U., Kurta, A., Britzke, E. R., Vodzak, M. E., Darling, S. R., Stihler, C. W., Hicks, A. C., et al. (2012). Frequent arousal from hibernation linked to severity of infection and mortality in bats with white-nose syndrome. *PLoS one*, 7(6), e38920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038920>
- Rockwood L. A., Kushnir M.M., Clarke J.N., & Rifai N., Horvath R.A., Wittwer T.C., (2018). Mass Spectrometry, In: *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. Elsevier.
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(10), pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Sherma J., & Fried B., & Stahl E. (2003). Thin-Layer Electrophoresis, In: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. CRC Press.
- Sies, C. W., Cronin, V., Florkowski, C. M., Gill, J., Grant, J., Poulos, V., Zoanetti, J. (2015). Regional Variation in Analytical Techniques used in the Diagnosis and Monitoring of Porphyria: a Case for Harmonisation? *The Clinical biochemist. Reviews*, 36(2), 63–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26224896/>
- Silvani, A., Cerri, M., Zoccoli, G., Swoap, S. J. (2018). Is Adenosine Action Common Ground for NREM Sleep, Torpor, and Other Hypometabolic States? *Physiology* (Bethesda, Md.), 33(3), 182–196. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2018>
- Steinberg, T. H., & Burgess R., Deutscher. (2009). Protein Gel Staining Methods, In: *Guide to Protein Purification*. Elsevier.
- Storm J., & Boyles J. (2011). Body temperature and body mass of hibernating little brown bats *Myotis lucifugus* in hibernacula affected by white-nose syndrome. *Acta Theriologica* 56, 123-127. <https://doi.org/10.1007/s13364-010-0018-5>
- Stoyneva M., Toshkova N., Zhelyazkova V., Uzunov A.B., & Stoyneva-Gärtner M. (2016). Review of the current status and future perspectives on *Pseudogymnoascus destructans* studies with reference to the species finding in Bulgaria, In: *Annual of Sofia University, fac. Biology, Book-2 Botany*. Sophia University Press.
- Gliszczynska-Świgło A., & Rybicka I. (2015). Simultaneous Determination of Caffeine and Water-Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods* 8, 139-146. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9880-0>

Verant, M. L., Meteyer, C. U., Speakman, J. R., Cryan, P. M., Lorch, J. M., Blehert, D. S. (2014). White-nose syndrome initiates a cascade of physiologic disturbances in the hibernating bat host. *BMC physiology*, 14, 10. <https://doi.org/10.1186/s12899-014-0010-4>

Vázquez-Martínez J., & López MG., & Hoang V.D. (2018). Chemometrics-Based TLC and GC-MS for Small Molecule Analysis: A Practical Guide. In: *Chemometrics and Data Analysis in Chromatography*. IntechOpen.

Vogel A. I., Tatchell A. R., Furnis B. S., Hannaford A. J., & Smith P.W.G. (1989). Spectroscopic methods and the interpretation of spectra, In: *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. John Wiley & Sons.

Warnecke, L., Turner, J. M., Bollinger, T. K., Lorch, J. M., Misra, V., Cryan, P. M., Wibbelt, G., Blehert, D. S., Willis, C. K. (2012). Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(18), 6999–7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200374109>

Warnecke, L., Turner, J.M., Bollinger, T.K., Misra, V., Cryan, P.M., Blehert, D.S., Wibbelt, G., Willis, C.K. (2013). Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. *Biology letters*, 9(4), 20130177. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0177>

Wilsterman K., McGuire L.N., Calisi M.R., Bentley E.G., & Choe J.C. (2019). Seasonal environmental change in all regions of the world affects vertebrate endocrinology and behavior, In: *Encyclopedia of Animal Behavior*. Academic Press.

Yang H., Xiao X., Zhao X.S., Hu L., Xue F.X., Ye J.S. (2016): Study on Fluorescence Spectra of Thiamine and Riboflavin. *MATEC Web of Conferences*, 63(03013). <https://doi.org/10.1051/mateconf/20166303013>

Zhang, Y., Sukthankar, P., Tomich, J. M., Conrad, G. W. (2012). Effect of the synthetic NC-1059 peptide on diffusion of riboflavin across an intact corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(6), 2620–2629. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9537>

Zukal, J., Bandouchova, H., Brichta, J., Cmokova, A., Jaron, K. S., Kolarik, M., Kovacova, V., Kubátová, A., Nováková, A., Orlov, O., et al. (2016). White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. *Scientific reports*, 6, 19829. <https://doi.org/10.1038/srep19829>

Zukal, J., Bandouchova, H., Bartonicka, T., Berkova, H., Brack, V., Brichta, J., Dolinay, M., Jaron, K. S., Kovacova, V., Kovarik, M., et al. (2014). White-nose syndrome fungus: a generalist pathogen of hibernating bats. *PloS one*, 9(5), e97224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097224>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AOPK	Agentura ochrany přírody a krajiny ČR
APS	Persíran amonný
CLRs	C-lektinové receptory
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrosprejová ionizace
EWL	Ztráta vody odpařováním
<i>Hap_1</i>	Haplotyp 1
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-12	Interleukin 12
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
<i>M. griseus</i>	Netopýr hnědošedý
<i>M. lucifugus</i>	Netopýr hnědavý
<i>M. myotis</i>	Netopýr velký
<i>M. sodalis</i>	Netopýr společenský
<i>M. velifer</i>	Netopýr jeskynní
PC	Papírová chromatografie
pCO ₂	Parciální tlak oxidu uhličitého
<i>P.destructans</i>	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>
PRR	Receptory rozeznávající molekulové vzory
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SARS	Těžký akutní respirační syndrom
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TBL	Délka trvání stavu strnulosti (torporu)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TMR	Zvýšená rychlost metabolismu
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy α

TOF	Analyzátor doby letu
UV	Ultrafialové záření
WNS	Syndrom bílého nosu