

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Humorální imunitní odpověď včel (*Apis mellifera*)

v různém vývojovém stádiu a věku

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| Autor: | Bc. Michaela Svitáková |
| Studijní program: | B1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Daníhlík Jiří, Ph.D. |
| Rok: | 2019 |

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

V Olomouci dne 29. 4. 2019

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a poskytnuté konzultace, které mi pomohly k plnění cílů experimentální i praktické části diplomové práce. Jmenovitě bych chtěla poděkovat také Mgr. Silvii Dostálkové a Mgr. Tereze Tiché, Ph.D., které mi byly ochotny kdykoli poskytnout cenné rady. V neposlední řadě mé poděkování patří celému kolektivu Katedry biochemie za všestrannou pomoc při práci v laboratoři a vstřícný přístup po celou dobu mého pětiletého studia.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Michaela Svitáková |
| Název práce | Humorální imunitní systém včel (<i>Apis mellifera</i>) v různém vývojovém stádiu a věku |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Mgr. Daníhlík Jiří, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2019 |

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má podstatný význam pro úroveň opylování hospodářských a planných plodin. Hmyz postrádá získanou složku imunitního systému, obranyschopnost tak zajišťuje pouze imunita vrozená. Charakteristickým prvkem nespecifické humorální imunity je rychlá syntéza antimikrobiálních peptidů uskutečňující se především v tukovém tělese a následná sekrece do hemolymfy. V hemolymfě včely medonosné byly doposud detekovány antimikrobiální peptidy abaecin, apidaeciny, defensin-1 a hymenoptaecin, vystupující jako velmi účinné efektorové molekuly vůči napadení mikrobiálními patogeny.

V této práci bylo provedeno porovnání relativní kvantifikace exprese genů kódujících výše zmíněné antimikrobiální peptidy včel a larev vystavených bakteriálním patogenům. Larvy byly infikovány různými koncentracemi spor *Paenibacillus larvae* přidanými do mateří kašičky, kterou byly po dobu 4 dnů v laboratorních podmínkách krmeny. I přesto, že larvám byl patogen podán přímo potravou, nebylo u těchto jedinců v porovnání s kontrolou pozorováno významné ovlivnění hladiny exprese genů antimikrobiálních peptidů. Dospělé včely byly po narkotizaci oxidem uhličitým imunizovány vpichem pod kutikulu roztokem PBS a tímto roztokem obohaceným o suspenzi bakterií *Escherichia coli* a *Paenibacillus larvae*. Hladina exprese všech čtyř pozorovaných genů u dospělců byla oproti kontrolní skupině statisticky významně zvýšena především v případě experimentální skupiny včel imunizovaných fyziologickým roztokem s bakteriální suspenzí. Avšak také imunizace samotným roztokem PBS, který by měl působit jako fyziologický roztok, vyvolala oproti kontrole zvýšenou expresi všech čtyř porovnávaných genů. Lze tak pozorovat úzká souvislost

všech tří linií imunitního systému. Tedy, že i na narušení fyzikálních bariér, v tomto případě kutikuly, je humorální imunitní systém připraven rychle reagovat.

Byl optimalizován postup pro imunochemickou detekci antimikrobiálních peptidů defensinu-1 a abaecinu z tkání včely medonosné metodou Western blotting. V homogenátech zadeček včel, jejichž extrakci v 0,1% TFA s následnou lyofilizací předcházelo vypreparování trávicího traktu, byl u klinicky zdravých i imunizovaných jedinců detekován 5,5 kDa peptid defensin-1. V hemolymfě včel nebyl detekován ani abaecin ani defensin-1. V tomto biologickém materiálu byla zřejmě velmi nízká koncentrace cílových analytů pro detekci Western blottingem.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | včela medonosná, humorální imunita, antimikrobiální peptidy, genová exprese, Western blotting |
| Počet stran | 89 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Bc. Michaela Svitáková |
| Title | Humoral immunity of honey bees (<i>Apis mellifera</i>) in different developmental stage and age |
| Type of thesis | Master |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Mgr. Danihlík Jiří, Ph.D. |
| The year of presentation | 2019 |

Abstract

Honey bee (*Apis mellifera*) has a major importance for the level of pollination of agricultural and wild-growing crops. Insect lack the acquired component of immune system and the resistance is provided only by the innate immunity. The typical attribute of the non-specific humoral immunity is a rapid synthesis of antimicrobial peptides which is realised especially in the fat body, followed by their secretion into the haemolymph. Antimicrobial peptides abaecin, apidaecins, defensin-1 and hymenoptaecin were detected in the haemolymph of honey bees so far. These peptides act as effector molecules against microbial pathogens.

This thesis brings the comparison of relative quantification of genes expression coding antimicrobial peptides mentioned above and between bees and larvae after exposure to bacterial pathogens. The larvae were infected by different concentrations of spores of *Paenibacillus larvae* added into royal jelly. Larvae were fed *in vitro* conditions for 4 days. In spite of the pathogen being given directly in food to the larvae, significant impact on the level of gene expression of antimicrobial peptides in comparison to controls was not observed. Adult bees were immunized by a subcuticular injection of the PBS solution and of PBS solution enriched by a suspension of *Escherichia coli* and *P. larvae* bacteria. The expression level of all four genes of interest were significantly increased compared to control group. The group immunized by PBS and bacteria suspension displayed the highest gene expression. However, also immunization by PBS alone induced increased expression

level of all four genes compared to control non-immunized group. Even the disruption of physical barriers, in this case of cuticle, the humoral immune system is prepared for quick reactions such as expression of genes of antimicrobial peptides.

Western blotting technique was optimized for immunochemical detection of antimicrobial peptides defensin-1 and abaecin from tissues of honey bees. Extraction of homogenized bee abdomens without digestive tract in 0,1% TFA with additional lyophilization was detected 5,5 kDa peptide defensin-1 in clinically healthy as well as in immunized individuals. ABAECIN and defensin-1 were not detected in haemolymph of bees. There was apparently very low concentration of target analytes in this biological material for detection by Western blotting.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | honey bee, humoral immunity, antimicrobial peptides, expression of genes, Western blotting |
| Number of pages | 89 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

OBSAH

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 | Humorální imunitní systém hmyzu se zaměřením na včely | 2 |
| 2.1.1 | Antimikrobiální peptidy | 3 |
| 2.1.1.1 | Antimikrobiální peptidy včel bohaté na cystein | 5 |
| 2.1.1.2 | Antimikrobiální peptidy včel bohaté na prolin | 5 |
| 2.1.1.3 | Antimikrobiální peptidy včel bohaté na glycin | 6 |
| 2.1.2 | Lysozomy | 6 |
| 2.1.3 | Lektiny | 7 |
| 2.1.4 | Fenoloxidasová kaskáda | 7 |
| 2.2 | Signální dráhy | 9 |
| 2.2.1 | Toll signální dráha | 9 |
| 2.2.2 | IMD signální dráha | 11 |
| 2.2.3 | JNK | 11 |
| 2.2.4 | JAK / STAT | 12 |
| 2.3 | Sociální imunita včel | 14 |
| 2.4 | Oslabení imunitního systému včel | 15 |
| 2.5 | Délka života a imunitní odpověď včel v různém vývojovém stádiu | 17 |
| 2.6 | Purifikace peptidů a proteinů z komplexních matic | 19 |
| 2.6.1 | Polyakrylamidová gelová elektroforéza | 21 |
| 2.6.2 | Imunochemická detekce proteinů pomocí Western blottingu | 21 |
| 2.6.3 | Metody analýzy peptidů včel | 24 |
| 2.7 | Kvantifikace genové exprese metodou RT-PCR | 25 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 28 |
| 3.1 | Materiál | 28 |
| 3.1.1 | Chemikálie | 28 |
| 3.1.2 | Biologický materiál | 28 |
| 3.1.3 | Přístroje a vybavení | 30 |
| 3.1.4 | Použité komerční kity a standardy | 30 |
| 3.1.5 | Použité primery | 31 |
| 3.1.6 | Synteticky připravené protilátky | 32 |
| 3.1.7 | Použité roztoky | 32 |
| 3.2 | Metody | 34 |
| 3.2.1 | Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradforda | 34 |
| 3.2.2 | Příprava vzorků pro SDS-PAGE | 34 |
| 3.2.3 | SDS-PAGE | 35 |
| 3.2.4 | Western blotting | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.5 | Expresa antimikrobiálních peptidů metodou qPCR | 37 |
| 3.2.5.1 | Příprava vzorku | 38 |
| 3.2.5.2 | Izolace a přečištění izolované RNA z larev | 38 |
| 3.2.5.3 | Přečištění vzorku DNAsou | 38 |
| 3.2.5.4 | Purifikace RNA | 39 |
| 3.2.5.5 | Kontrola integrity RNA | 39 |
| 3.2.5.6 | Reverzní transkripce izolované a přečištěné RNA do cDNA | 39 |
| 3.2.5.7 | Kontrola přepisu (tzv. endpoint) PCR reakce | 40 |
| 3.2.5.8 | Sjednocení koncentrace cDNA na stejnou hodnotu $C_T = 20$ pro provozní gen | 41 |
| 3.2.5.9 | Účinnost použitých primerů | 41 |
| 3.2.5.10 | Kvantifikace relativní genové exprese antimikrobiálních peptidů <i>A. mellifera</i> | 41 |
| 3.2.6 | Použité statistické metody a programy | 42 |
| 4 | VÝSLEDKY | 43 |
| 4.1 | Koncentrace proteinů ve vzorcích imunizovaných včel (<i>A. mellifera</i>) | 43 |
| 4.2 | Kontrola integrity přečištěné RNA | 44 |
| 4.3 | Kontrola přepisu z RNA do cDNA | 45 |
| 4.4 | Účinnost použitých primerů | 46 |
| 4.5 | Relativní kvantifikace exprese genů pro antimikrobiální peptidy u infikovaných larev včel (<i>A. mellifera</i>) | 47 |
| 4.6 | Relativní kvantifikace exprese genů pro antimikrobiální peptidy u imunizovaných dospělých včel (<i>A. mellifera</i>) | 51 |
| 4.7 | Detekce peptidů metodou SDS-PAGE s následným Western blottingem | 55 |
| 4.7.1 | Optimalizace jednotlivých kroků Western blottingu | 55 |
| 4.7.2 | Optimalizace detekce proteinů z biologického materiálu | 57 |
| 4.7.3 | Semikvantitativní vyhodnocení detekce defensinu-1 | 62 |
| 5 | DISKUZE | 64 |
| 5.1 | Sledování změn exprese genů antimikrobiálních peptidů v různém vývojovém stádiu | 64 |
| 5.2 | Optimalizace detekce antimikrobiálních peptidů metodou Western blotting | 65 |
| 6 | ZÁVĚR | 68 |
| 7 | LITERATURA | 69 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 77 |

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše o vývoji imunitní odpovědi v různých vývojových stádiích hmyzu se zaměřením na včely (Apoidea).
- Zpracování a sepsání poznatků o postupu zpracování, izolaci a purifikaci peptidů a proteinů s následnou imunochemickou detekcí z různých biologických matric.
- Optimalizace imunochemické detekce peptidů defensinu-1 a abaecinu pomocí metody Western blot z hemolymfy a homogenátů tkání včel.
- Sledování změn v humorálním imunitním systému včel.

1 Úvod

Náhlé a velmi rozšířené ztráty včelstev se v dnešní době staly hrozbou včelařského průmyslu, neboť by v budoucnu mohly mít dopad na celkovou produkci potravin ve světě. Druh včel medonosných (*Apis mellifera*) se totiž významně podílí na opylování hospodářsky významných rostlin. Jelikož se včely často vyskytují v blízkosti lidských sídel a průmyslových oblastí, jsou vystavovány negativnímu vlivu pesticidů, insekticidů a dalších chemických látek v prostředí. Kvůli sociálnímu způsobu života, kdy úly sčítají až několik desítek tisíc hlav, je u včel zvýšeno riziko přenosu nemocí zapříčiněných parazity a patogeny. K přenosu tak dochází velmi blízkým kontaktem jedinců, včely krmí své potomky a tráví většinu života v úlu, jehož prostředí je ideální pro mnoho nežádoucích mikroorganismů (Randolt *et al.*, 2008; Dainat *et al.*, 2012).

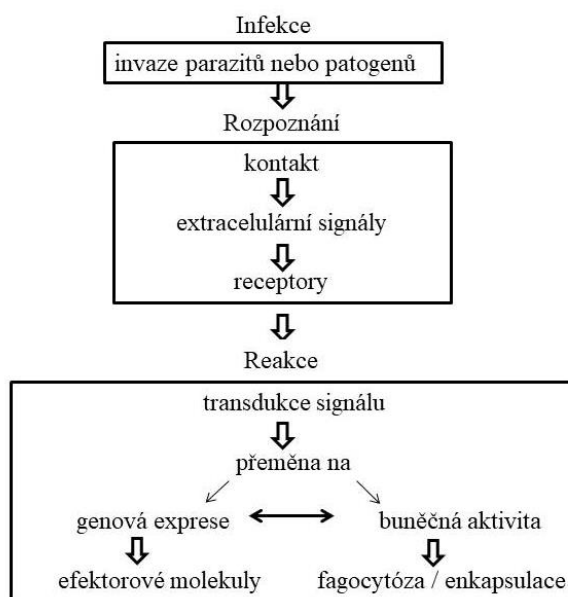
Aby byla ochrana před napadením účinná, vyvinula se u tohoto druhu hmyzu tzv. sociální imunita, což znamená, že chování jednotlivců může kladně ovlivnit zdraví celého včelstva. Stejně jako ostatní hmyz se i včely na individuální úrovni chrání vrozenou imunitou, kterou lze rozdělit na fyzikální bariéry a humorální a buněčnou imunitní odpověď (Cremer *et al.*, 2007; Randolt *et al.*, 2008). V rámci humorální imunity mají významné zastoupení antimikrobiální peptidy, k jejichž syntéze a aktivaci vedou signální dráhy. Jedná se o molekuly přítomné u všech mnohobuněčných organismů působící vůči napadení Gram-pozitivními, Gram-negativními bakteriemi, houbami a viry. Antimikrobiální peptidy byly izolovány z různých druhů obratlovců i hmyzu, rostlin i bakterií a pro laboratorní účely mohou být syntetizovány uměle (Luiz *et al.*, 2017). Právě detekce imunochemickou metodou dvou antimikrobiálních peptidů abaecinu a defensinu-1 sekretovaných do hemolymfy byla jedním z cílů této práce. Dalším úkolem bylo sledování exprese genů všech čtyř doposud známých antimikrobiálních peptidů (abaecinu, apidaecinu, hymenoptaecinu a defensinu-1) molekulárně-biologickou metodou qPCR při dané patogenní zátěži, které jedinci byli vystaveni. Sledování změn v expresi genů kódujících peptidy a proteiny, které souvisejí s imunokompetencí, by se mohlo stát účinným nástrojem využitelným k odvození reakce organismu na dané podněty. Tato metodika by tak mohla být pro budoucnost včelího ohroženého druhu velmi důležitá.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Humorální imunitní systém hmyzu se zaměřením na včely

Mnohobuněčné organismy jsou nepřetržitě vystaveny potenciálním patogenním mikroorganismům (MO) (Hoffmann *et al.*, 1999). Bezobratlí živočichové se napadení a infekcím brání pomocí nescifické (vrozené) imunity, specifická (adaptivní) imunita zde chybí a vyskytuje se až u obratlovců (Hořejší a Bartůňková, 2005). Základem vrozené formy imunity je rozpoznání unikátních a jedinečných motivů a složek MO tzv. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), které v těle hostitele chybí. Napadený organismus však disponuje receptory, pomocí kterých tyto PAMPs rozpozná a dokáže na ně v rychlosti reagovat (Hořejší a Bartůňková, 2005; Montaño *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Příkladem takového typu receptoru může být peptidoglycan recognition protein (PGRP), který je velmi probádán především u modelového organismu octomilky (*Drosophila melanogaster*) (Werner *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2019). Tento PGRP slouží k detekci bakterií, jejichž buněčná stěna obsahuje strukturální složku peptidoglykan (PGN) (Aggrawal a Silverman, 2007). Mezi PAMPs patří dále lipopolysacharidy (LPS) Gram-negativních bakterií, mannany a glukany kvasinek a hub (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Hmyz se případnému napadení přirozeně brání, a proto je možné dělit imunitní systém do tří částí, které na sebe navazují a vzájemně se sebou souvisí (Obr. 1). Tělní povrch neboli integument, kutikula, stěna střeva a peritrofická membrána vyskytující se v trávicím traktu patří do tzv. fyzikálních bariér, které tvoří první obrannou linii hmyzu vůči parazitům. Pokud jsou tyto bariéry narušeny, přichází na řadu imunita buněčná, založená na funkci imunitních buněk – hemocytů. Ty jsou různě diferenciovány a vedou k řadě mechanismů, mezi které patří např. fagocytóza mikroorganismů, nodulace a enkapsulace parazitů. Jednotlivé procesy velmi úzce souvisí s humorální imunitní odpovědí, která je pro ochranu organismu po narušení bariér stejně tak důležitá (Gillespie *et al.*, 1997; Antúnez *et al.*, 2009). Humorální imunita je spjata s látkami, které jsou výsledkem produkce imunitních buněk organismu, tedy hemocytů. Jedná se o antimikrobiální peptidy (AmP), profenoloxidasový aktivační systém (ProPO-As), lektiny a lysozymy (Ponnuvel a Yamakawa, 2002; Borba *et al.*, 2015; Danihlík *et al.*, 2015).

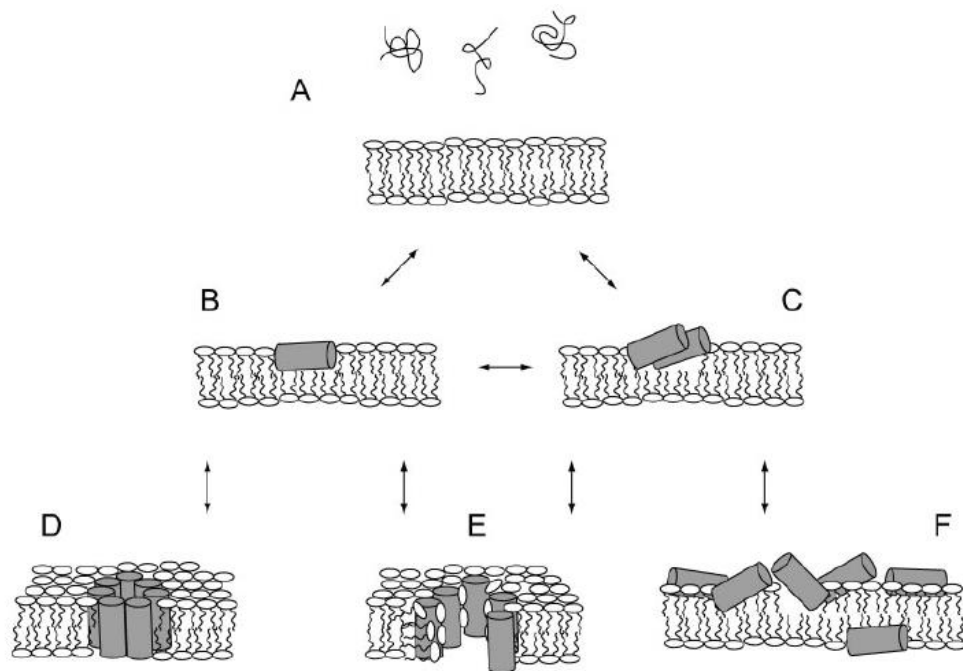


Obr. 1: Schéma sekvence dějů po infekci organismu (převzato a upraveno dle Gillespie *et al.*, 1997).

2.1.1 Antimikrobiální peptidy

AmP představují pro organismy nezbytnou součást ochrany, která je aktivována při setkání s patogeny. U hmyzu jsou nejvíce zastoupeny AmP kationtové povahy, obvykle tvořeny méně než 100 aminokyselinami (AMK). Nejběžnějšími strukturami, které tyto peptidy zaujímají, jsou α -helikální struktura, β -list stabilizován disulfidovými vazbami s přítomností nebo absencí α -helikální domény (Bulet a Stöcklin, 2005). Dle AMK složení je možné AmP rozdělit na peptidy bohaté na cystein (Cys), prolin (Pro) a glycin (Gly), přičemž kationtová povaha většiny AmP je dána zvýšenou přítomností AMK argininu a lysinu (Bulet *et al.*, 1999; Wimley, 2010).

Tyto amfipatické peptidy mohou díky své kationtové a hydrofobní povaze interagovat se záporně nabitými lipidy (př. fosfatidylglycerol, kardiolipin) ve struktuře membrán MO. Dochází tak k permeačnímu narušení jejich cytoplasmatické membrány (Chen *et al.*, 2003; Wimley, 2010). Strandberg a Ulrich (2004) popsali několik mechanismů účinků AmP (Obr. 2), které zkoumali pomocí nukleární magnetické rezonance. Jedná se o membránovou permeabilizaci prostřednictvím tvorby stabilních pórů (modely barelových nebo toroidálních pórů), ztenčování membrán, nebo tvorbu micel, které jsou podobné detergentům (kobercový model). Lytický účinek peptidů může mít po vniknutí do intracelulárního prostoru za následek ztrátu iontů a jiných metabolitů, složek membrán i elektrochemických potenciálů a vede tak k apoptóze patogenních MO (Teixeira *et al.*, 2012).



Obr. 2: Mechanismy účinků AmP a jejich interakce s buněčnou membránou patogenních MO. Schéma A) – C) znázorňují intaktní membránu, na schématech D) – F) je membrána narušena peptidy; A) přiblížení peptidů k membráně; B) peptid je v nízkých koncentracích navázán jako monomer; C) vysoké koncentrace vedou k samovolnému sdružování peptidů; D) tvorba barelového póru, tzv. model sudové skruže; E) pór, který je tvořen peptidy i lipidy, tzv. model toroidního póru; F) dochází k lokálnímu narušení membrány, tzv. koberecový model. Peptidy se na lipidy váží svými hydrofobními částmi (uvnitř póru), zatímco hydrofilní část je odvrácena vně (převzato a popsáno dle Strandberg a Ulrich, 2004).

Dle The Antimicrobial Peptide database je aktuálně známo přes 3000 AmP, z toho se necelých 300 vyskytuje u hmyzu. Včela medonosná (*Apis mellifera*) po infekci bakteriemi disponuje ve své hemolymfě čtyřmi dosud známými peptidy, kterými jsou abaecin, apidaecin, defensin a hymenoptaecin (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993 a Casteels-Josson *et al.*, 1994). V hemolymfě se AmP mohou vyskytovat stabilně, při infekci se jejich koncentrace několikanásobně zvyšuje. Detekovatelné jsou již do 4 hodin od nákazy nebo zranění (Otvos, 2000). Do hemolymfy se tyto proteiny vyplavují především po jejich syntéze v tukovém tělese umístěném v abdomenu, které má obdobnou funkci jako játra savců. Hemolymfa AmP dále rozvádí k cílovým tkáním. Dalšími místy syntézy, které se uplatňují v menší míře, jsou např. epitelální buňky, slinné žlázy, orgán reprodukce nebo hemocyty (Vilmos a Kurucz, 1998). U včely medonosné (*A. mellifera*) byly kromě peptidů přítomných v hemolymfě popsány také AmP vyskytující se v mateří kašičce (jelleiny a royalisin) a ve včelím jedu (mellitin) (Daníhlík *et al.*, 2015).

2.1.1.1 Antimikrobiální peptidy včel bohaté na cystein

Defensiny jsou molekuly kationtové bazické povahy. Molekulová hmotnost těchto AmP se pohybuje kolem 4 kDa. Obvykle se sestávají z 36 – 46 AMK, u včel a čmeláků se však počet liší a defensiny obsahují 51 AMK. Pro molekulu je typický vzor 6 Cys, které jsou spárovány třemi disulfidickými můstky (Bulet *et al.*, 1999). Strukturu tohoto AmP tvoří N-koncová smyčka α -helix a na něj navázaný antiparalelní β -skládaný list (Bulet *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2014). Antibakteriální defensiny jsou velmi účinné vůči Gram-pozitivním bakteriím, ale na Gram-negativní bakterie, kvasinky a houby jsou méně citlivé (Bulet a Stöcklin, 2005). Kationtové polypeptidy často tvoří póry a působí na oba typy bakterií (Li *et al.*, 2006).

U včel se vyskytují dvě isoformy defensinů, přestože je jeden detekován v hemolymfě (Casteels-Josson *et al.*, 1994) a druhý v mateří kašičce – royalisin, jsou kódovány jedním genem *defensin 1* (P17722) (Fujiwara *et al.*, 1990; Klaudiny *et al.*, 2005). Obě isoformy obsahují 51 AMK (Klaudiny *et al.*, 2005; Danihlík *et al.*, 2015). Royalisin zaujímá kompaktní globulární strukturu, je stabilní i při nízkém pH a vyšších teplotách (díky disulfidovým vazbám), molekulová hmotnost je 5,5 kDa (Tseng *et al.*, 2011). U včel existuje také gen *defensin 2* (Q5MQL3), který však na úrovni peptidu nebyl detekován (Klaudiny *et al.* 2005; Danihlík *et al.*, 2015).

2.1.1.2 Antimikrobiální peptidy včel bohaté na prolin

Mezi peptidy obsahující vyšší zastoupení Pro patří abaecin a apidaecin, který je navíc obohacen o značné množství argininu (Brogden, 2005). Abaecin isoloval a charakterizoval Casteels *et al.* (1990) v hemolymfě včel po jejich imunizaci bakterií *E. coli*. Li *et al.* (2017) se zabývali expresí abaecinu v *B. subtilis*. K jeho purifikaci využili metodu Tricinové SDS-PAGE, kdy zjistili jeho přibližnou molekulovou hmotnost – 4 kDa, což odpovídalo teoretické hmotnosti 3,966 kDa získané pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Li *et al.*, 2017). Abaecin se také ukázal jako účinný v inhibici růstu bakterie *Peainbacillus larvae*, exprese genu byla zvýšena již po 24 hodinách od nakrmení larev sporami bakterie (Evans, 2004).

Apidaecin, peptid nesoucí jméno po čeledi Apidae (Včelovítí), je znám ve třech isoformách (Tab. 1) lišících se AMK valinu, leucinu a isoleucinu. Obecně se jedná o menší 18 AMK molekulu schopnou inhibovat růst Gram-negativních bakterií (Casteels *et al.*, 1989; Casteels a Tempst, 1993).

Tab. 1: Isoformy apidaecinu a jejich AMK sekvence (převzato a upraveno dle Li *et al.*, 2006).

| AmP | Isoforma | Sekvence aminokyselin |
|-----------|----------|-----------------------|
| Apidaecin | Ia | GNNRPVYIPQRPPHPRI |
| | Ib | GNNROVYIPQRPPHPRL |
| | II | GNNRPIYIPQRPPHPRL |
| | III | GNNRPIYISQRPPHPRL |

Apidaeciny jsou tvořeny dvěma oblastmi, první – konstantní oblast (C-konec), je zodpovědná za celkovou antibakteriální aktivitu, druhá neboli variabilní oblast (N-konec) hraje důležitou roli ve specifitě antibakteriálního spektra. Prolin tvoří peptid z 33 % (Li *et al.*, 2006).

2.1.1.3 Antimikrobiální peptidy včel bohaté na glycin

V hemolymfě včel byl detekován 93 AMK dlouhý peptid hymenoptaecin (Casteels *et al.*, 1993). Proteiny bohaté na Gly aktivně inhibují Gram-pozitivní i Gram-negativní bakterie (Yi *et al.*, 2014). Antúnez *et al.* (2009) studovali exprese genů vybraných AmP po infekci bakteriemi z rodu *Nosema*, př. *N. apis*. Bylo zaznamenáno, že po 4 dnech exprese vzrostla, ale za 7 dní po infekci se snižuje exprese hymenoptaecinu i abaecinu.

2.1.2 Lysozomy

Lysozym (EC 3.2.1.17) je antimikrobiální polypeptid s fungicidními a antibakteriálními účinky, jehož úloha spočívá v lýzi PGN vazby a funguje jako peptidasa. Antibakteriální potenciál souvisí s enzymatickou aktivitou muramidasy a zároveň s neenzymatickou aktivitou, která je obdobná s působením obranných peptidů kationtové povahy (Sowa-Jasiłek *et al.*, 2014). Lysozym ve vrstvě PGN (mureinu) hydrolyzuje β -1,4-glykosidické vazby mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem (Callewaert a Michiels, 2010). Vyskytuje se v různých živočišných sekretech, krvi / hemolymfě, bakteriích a také ve vakuolách rostlinných buněk a je účinný jak proti Gram-negativním, tak vůči Gram-pozitivním bakteriím a může podporovat expresi dalších AmP (Minagawa *et al.*, 2001; Antúnez *et al.*, 2009). Pokud dojde k narušení integrity, poranění, či infekci jsou nízké hladiny lysozymu, které jsou konstitutivně přítomny v hemolymfě, až několikanásobně zvýšeny (Wilson a Ratcliffe, 2000). Dle Evans *et al.* (2006) je u včel přítomen c-typ (chicken) lysozymu ve dvou izoformách a i-typ lysozymu (invertebrate). U hmyzu je molekulová hmotnost 14 kDa (Vilmos a Kurucz, 1998), v mléce skotu 18 kDa (Eitenmiller *et al.*, 1976) a v mléce člověka i vaječném bílku 15 kDa (Boesman-Finkelstein a Finkelstein, 1982). Kromě toho, že lysozym

v hemolymfě tvoří důležitou složku humorální imunity, lysozomy vyskytující se ve střevě hmyzu slouží jako trávicí enzymy. Tak tomu je např. u *Drosophila melanogaster* a *Musca domestica* (Sowa-Jasiček *et al.*, 2014).

2.1.3 Lektiny

Jako lektiny jsou označovány buď proteiny schopné aglutinace (shlukování), nebo glykoproteiny neimunitního původu, které váží sacharidy bez jejich chemické modifikace. Existují v rozpustné formě (v tělních tekutinách) nebo vázané na membránu (Gül a Ayvali, 2002; Michiels *et al.*, 2010). Tyto látky jsou schopny adheze, rozpoznání a ochrany imunitního systému. Výzkum lektinů u bezobratlých je především zaměřen na jejich afinitu k sacharidům. Vazba na tyto látky bývá reversibilní. Lektiny se mohou vázat na glykokonjugáty nacházející se na povrchu cizích látek, pak slouží jako diskriminační vazba mezi látkami těla cizími a hemocyty, které jsou schopné procesů zahrnutých v buněčné imunitě. Mnoho lektinů bezobratlých aglutinuje cizí buňky např. erytrocyty, bakterie nebo viry (Yu *et al.*, 1999; Yu a Kanost, 2000; Gül a Ayvali, 2002). Lektiny nacházející se v hemolymfě hmyzu se skládají z podjednotek o velikosti 30 – 40 kDa, přičemž celková hmotnost se pohybuje mezi 70 až 1500 kDa. U zvířat, včetně hmyzu, se vyskytuje lektin typu C (vápník-dependentní lektin) (Gillespie *et al.*, 1997). Tyto C-typy lektinů se podílejí na nodulaci, aktivaci profenoloxidasu v hemolymfě a opsonizaci (Yu a Kanost, 2000).

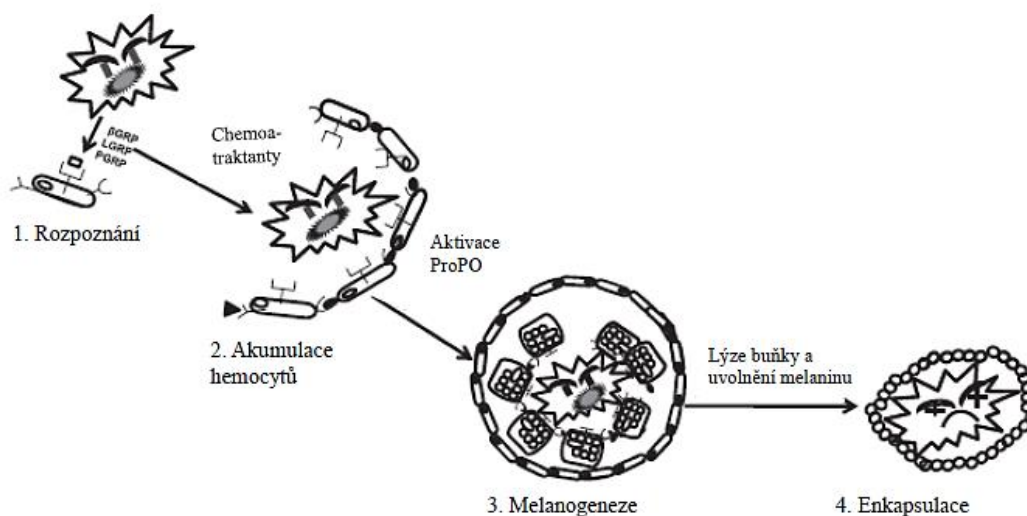
2.1.4 Fenoloxidasová kaskáda

Enzym fenoloxidasa (zkr. PO; monofenol, L-dopa:kyslík oxidoreduktasa, EC: 1.14.18.1) je produkován rostlinami i živočichy (Sinsabaugh, 2010). Rostliny jej využívají např. k syntéze ligninu a dalších sekundárních komponent (Sinsabaugh, 2010). U včel enzym zodpovídá za biosyntézu melaninu (Obr. 3), souvisí s procesy buněčné imunity jako je nodulace, enkapsulace a fagocytóza, přispívá k hojení ran a sklerotizaci kutikuly (Cerenius *et al.*, 2008). PO hmyzu je v inaktivní formě zvané profenoloxidasa (ProPO) přítomna v plasmě hemolymfy, konkrétně v cirkulujících hemocytech a aktivně je transportována přes epidermis do matrix kutikuly (Ashida a Brey, 1997; Nappi a Ottaviani, 2000). Zymogen ProPO (70 – 80 kDa), který ve své struktuře obsahuje dvě vazebná místa pro měď (tzv. měď – dependentní enzym), je pomocí serinové proteasy (profenoloxidasový - aktivační enzym; ProAE) rozštěpen za vzniku aktivní PO (De Gregorio *et al.*, 2002; González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012). Také samotný

ProAE existuje ve formě zymogenu a do aktivní formy jej proteolyticky štěpí serinové proteasy (Nappi a Ottaviani, 2000).

Úloha aktivního enzymu PO spočívá v oxidaci mono- a difenolů na *o*-chinony, které jsou následně neenzymaticky polymerizovány, což vede k syntéze již zmíněného pigmentu melaninu (Ashida a Brey, 1997). Jako spouštěče této kaskády slouží buď komponenty mikrobiálních buněčných stěn (bakterií a hub) β -1,3-glukany, PGN a LPS (Söderhäll a Cerenius, 1998), nebo může dojít k aktivaci poraněním (De Gregorio *et al.*, 2002). U včely byl nalezen pouze jeden gen kódující PO (Evans *et al.*, 2006).

PO kaskáda je velmi přísně kontrolována díky tzv. serpinům (serine protease inhibitors). Jedná se o inhibitory o délce zhruba 400 AMK, které v PO kaskádě inhibují serinové proteasy aktivující ProAE a PO (Söderhäll a Cerenius, 1998). U různých druhů hmyzu byly detekovány odlišné typy a množství těchto molekul (González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).



Obr. 3: Čtyři kroky shrnující proces melanizace. Nejprve povrchové receptory buňky rozpoznají pomocí specifických molekul (PAMPs) patogena (1). Kolem něj se na popud chemoatraktantů začnou shromažďovat hemocyty (2). Jakmile je patogen zcela obklopen dojde uvnitř k produkci melaninu (3). Melanin je uvolněn a patogen enkapsulován napadenou buňkou (převzato a upraveno dle González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012)

Protokol pro měření aktivit jak „volné“ neboli přirozeně aktivní PO, tak celkového „potenciálního“ inaktivního zymogenu ProPO (měřen po umělé aktivaci tohoto prekursoru) u včely medonosné (*A. mellifera*) optimalizovali Laughton a Siva-Johty (2011). Definovali společné parametry těchto enzymů pro dělnice i trubce napříč generacemi a v jakékoli fázi infekce patogeny. V analýze vykazoval pro stanovení PO i ProPO aktivity optimální výsledky saturovaný roztok L-dopa v koncentraci od 2,88 do 5,75 mmol·l⁻¹. K určení ProPO ve vzorcích byla důležitá inkubace s aktivátorem reakce α -chymotrypsinem (konc. 0,5 mg·ml⁻¹) po dobu 5 minut při pokojové teplotě (19 ± 2 °C) před přidáním L-dopa (Laughton a Siva-Johty, 2011). Aktivita PO může být inhibována některými chemickými činidly, jako je např. fenylthiomocovina, tropolon, β -merkptoethanol, díky jejich schopnosti chelatovat měď (Hellio *et al.*, 2007).

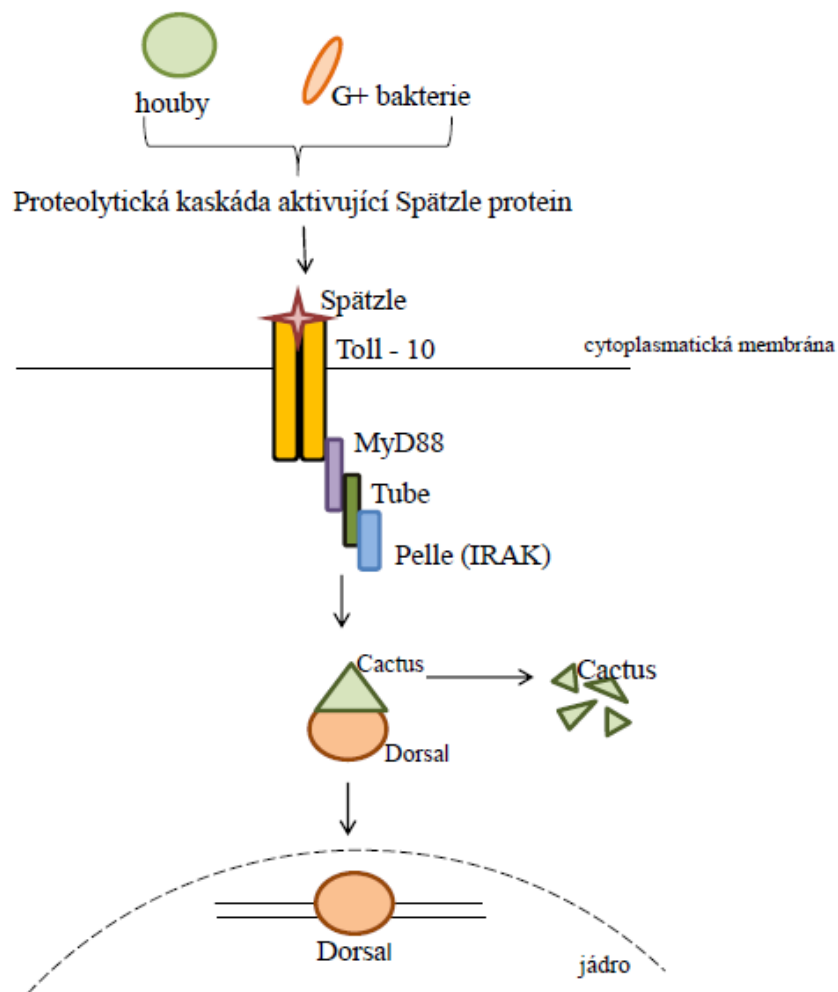
2.2 Signální dráhy

K ochraně včel vůči různým nálezám a to jak virálním, tak bakteriálním slouží procesy buněčné a humorální imunity. Aby došlo k jejich aktivaci, existují v těchto malých organismech poměrně konzervované imunitní neboli signální dráhy, kterými jsou JAK/STAT signalizace, JNK signalizace, IMD a Toll signální dráhy. Tyto kaskádovité reakce jsou nejlépe prozkoumány na octomilce *D. melanogaster*, ale díky genetickým podobnostem (orthology) byly potvrzeny také u včel (Evans *et al.*, 2006, McMenamin *et al.*, 2018).

2.2.1 Toll signální dráha

V imunitním systému hmyzu jsou Toll a Toll-like receptory (TLRs) důležitými transmembránovými spojníky (Evans *et al.*, 2006). Jedná se o proteiny (transmembránové proteiny typu I) přenášející signál, které byly poprvé identifikovány v embryogenezi u octomilky a které slouží k rezistenci organismu vůči napadení Gram-pozitivními bakteriemi nebo houbovými nálezami, v menší míře virovými částicemi (Lemaitre *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2018). Extracelulární doména Toll a TLRs obsahuje repetice bohaté na leucin, následuje transmembránová a cytosolární část zahrnující konzervovanou oblast zvanou Toll/IL-1 receptor. U octomilky bylo doposud popsáno 9 genů pro Toll receptory (Sun *et al.*, 2017). Dle Weber *et al.* (2003) je dráha spuštěna díky extracelulárnímu Spätzle proteinu, který je syntetizován jako pre-protein a do aktivní formy je převeden díky serinovým proteasám. Aktivovaný Spätzle tedy slouží jako ligand vážící se na TLR, což způsobí dimerizaci (spojení) Toll

receptoru. Poté se spouští kaskáda tří proteinů (Obr. 4) složená z MyD88, Tube a Pelle, které společně tvoří komplex a dále díky aktivaci fosforylací vedou k degradaci komplexu Cactus(IκB)/Dorsal(NF-κB). Cactus je inhibítoem NF-κB (nuclear factor) a jeho odstraněním se Dorsal translokuje do jádra buňky jako Dorsal immunity factor (Dif), kde má úlohu transkripčního faktoru. Dráha vede u včel k expresi genů především pro peptidy defensiny, ale také pro geny indukující melanizaci a enkapsulaci (Evans *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2017; McMEnamin *et al.*, 2018).



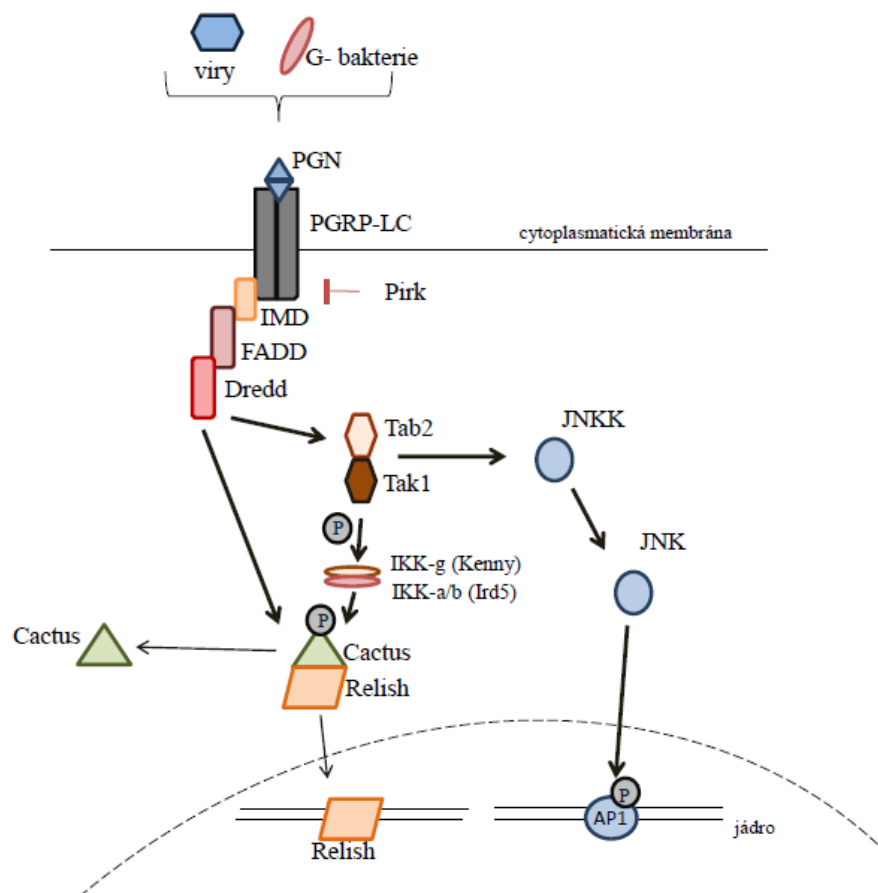
Obr. 4: Signální dráha Toll. Dráha je spuštěna rozpoznáním tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) nacházejících se v buněčné stěně patogenů. Poté je proteolyticky aktivován Spätzle protein, který způsobí dimerizaci Toll, což ovlivní kaskádu proteinů vedoucí k fosforylaci komplexu Cactus/Dorsal. Cactus je tak degradován a volný Dorsal translokován do jádra, kde indukuje např. syntézu AmP (překresleno a upraveno dle Medzhitov, 2001; McMEnamin *et al.*, 2018)

2.2.2 IMD signální dráha

IMD neboli imunodeficientní dráha je obdobná s Toll signalizací díky přítomnosti NF- κ B zvaného v tomto případě Relish. Spouštěči této dráhy jsou však Gram-negativní bakterie a viry, v menší míře i houbová onemocnění. Protein Relish způsobuje expresi většiny AmP u octomilky a je tedy nezbytnou součástí normální imunity. U včel jsou exprimovány geny především pro hymenoptaecin a abaecin (Silverman *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2006; McMenamin *et al.*, 2018). Počátečním aktivátorem přítomným u Gram-negativních bakterií je molekula PGN obsahující na 3. pozici polypeptidového řetězce diaminopimelovou kyselinu namísto obvyklého lysinu (Kaneko a Silverman, 2005). Receptory interagující s PGN jsou transmembránového typu a nesou označení PGRP-LCa (rozpoznání monomerního PGN neboli tracheálního cytotoxinu - TCT), PGRP-LCx (rozpoznání polymerního PGN) nebo PGRP-LE, jehož krátká forma je sekretována a váže PGN z hemolymfy. V plné délce PGRP-LE se nacházejí v cytosolu a předpokládá se, že vychytávají TCT (Neyen *et al.*, 2012; Myllymäki *et al.*, 2014). Dráha (Obr. 5) se sestává opět z kaskády několika bílkovin včetně FADD, Dredd, kinasy TAK1 a tzv. signalosomu IKK, které se vzájemně ovlivňují, až dojde k fosforylaci a tedy rozpadu komplexu Cactus(inhibitor) / Relish (nukleární faktor), kdy je opět NF- κ B translokován do jádra (Kleino a Silverman, 2014). Kromě aktivace Relish proteinu vede IMD signalizace přes TAK1 kinasu také k další signální dráze JNK (Boutros *et al.*, 2002). Negativním regulátorem IMD dráhy je Pirk způsobující zpětnovazebnou inhibici této signalizace. Jeho hladina narůstá již do hodiny od infekčního napadení organismu Gram-negativními bakteriemi. Pirk interaguje s intracelulární doménou PGRP-LC a PGRP-LE, ale i se samotným IMD. Brání tak nadměrné expresi AmP (Kleino *et al.*, 2008; Kleino a Silverman, 2014).

2.2.3 JNK

Orthologní geny pro JNK (c-Jun NH₂ – terminální kinasa) signalizaci byly opět identifikovány jak u octomilky, tak u *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006). Jedná se o podskupinu mitogen-aktivních proteinů (MAP), které indukují procesy jako apoptóza, melanizace, hojení ran nebo regulují expresi AmP (Evans *et al.*, 2006; Weston a Davis, 2007). Spouštěčem signalizace JNK jsou lipopolysacharidy nacházející se v buněčných stěnách MO, čímž se nastartuje kaskáda reakcí a protein TAK1, vyskytující se v IMD signalizaci (viz Obr. 5), aktivuje přes další proteiny JNK (Silverman *et al.*, 2003; Kaneko a Silverman, 2005).

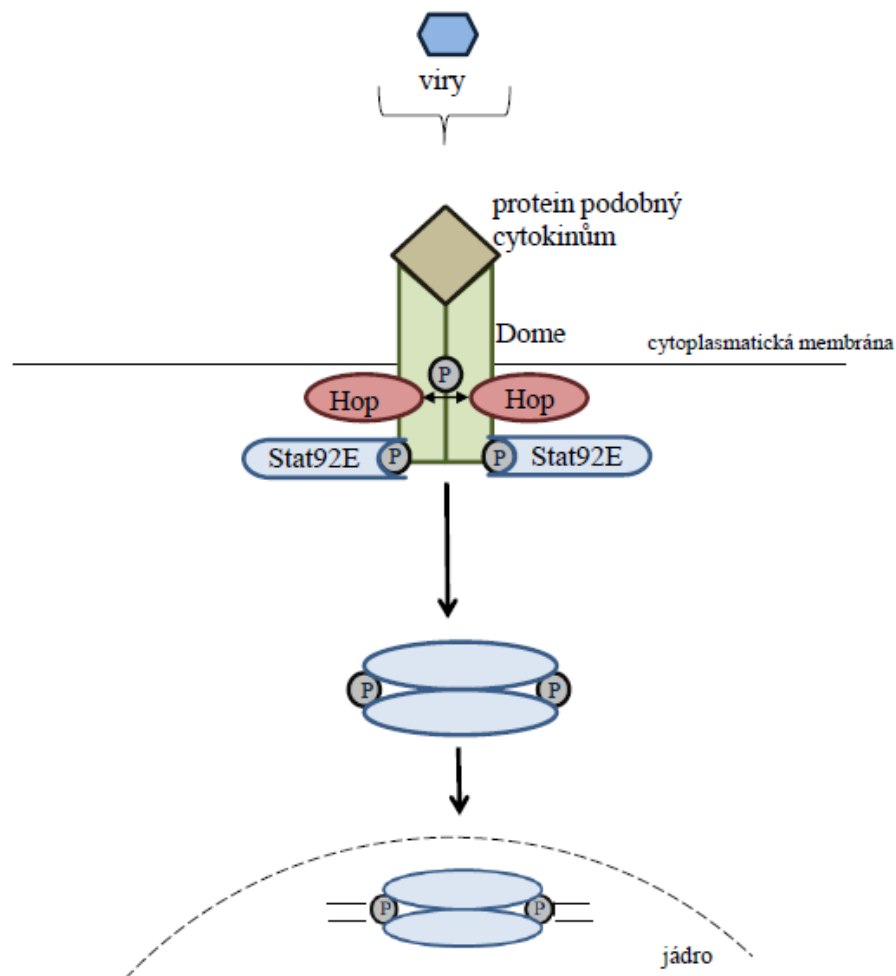


Obr 5: Imunodeficientní signální dráha, která je aktivována především Gram-negativními bakteriemi, konkrétně molekulou PGN přítomnou v jejich buněčné stěně. Ta je rozpoznána specifickými receptory v cytoplasmatické membráně. Dále je spuštěna signální kaskáda proteinů vedoucí k fosforylaci komplexu Cactus / Relish, kdy se Relish uvolní, je translokován do jádra buňky a vede k aktivaci transkripce genů pro AmP. Tak1 protein (kinasa) IMD dráhy vede také ke spuštění JNK signalizace, jejíž úlohou je spuštění apoptózy buňky, nebo hojení ran (překresleno a upraveno dle McMenamin *et al.*, 2018).

2.2.4 JAK / STAT

Janus Kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) je vedle IMD a Toll třetí důležitou signální dráhou vyskytující se u octomilek i včel, která je spuštěna vlivem virových částic a může vést k fagocytární aktivitě hemocytů (Evans *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2018). Aktivace je zahájena vazbou extracelulárního nepárového ligandu Udp, který obsahuje signální sekvenci a několik potenciálních N-glykosylačních míst na transmembránový receptor (cytokinový receptor typu I) Domeless (Dome). Po vazbě ligandu se tento receptor obsahující tyrosin kinasu JAK (Hopscotch/Hop) dimerizuje. Přiblížením domén se vzájemně Hop fosforylují, což vede k fosforylaci samotného Dome receptoru, na kterém se tímto vytvoří dokovací místa pro cytoplasmatické STATs (Stat92E). STATs nakonec vytvoří dimer (homo- nebo hetero-) a v této formě putuje do jádra, kde vyvolá transkripci cílových genů (Obr. 6).

U. A. mellifera i *D. melanogaster* STAT tedy transkripčně regulují antimikrobiální efektor TEP (konkrétně TEP7; thioester-containing protein), pouze u octomilky JAK/STAT reguluje také expresi genů Turandot (Tot), které jsou pravděpodobně odpovědné za kontrolu infekce a také za kódování humorálních faktorů vyvolaných silným stresem (Dorstert *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2006; McMEnamin *et al.*, 2018).



Obr. 6: JAK/STAT signalizace, která slouží organismu ke spuštění imunitní reakce vůči virům. Ligandy podobné cytokinům (Udp) jsou detekovány receptory (Dome), což způsobí jejich dimerizaci a následnou transfosforylaci Janus Kinas Hopscotch. Následně jsou fosforylovány Dome, na kterých se vytvoří dokovací místa pro Stat92Es, které jsou poté dimerizovány a translokovány do jádra. Jejich transkripce reguluje antimikrobiální efektor a inhibitory SOCS a PIAS (překresleno a upraveno dle McMEnamin *et al.*, 2018).

V případě aktivace signální dráhy u octomilky jsou známy tři ligandy podobné cytokinům, které se váží na Dome. Jsou jimi Oustretches (Os, také nazývaný Unpaired, Upd), Upd2 a Upd3 (Yang *et al.*, 2015). V genomu včely orthology pro Udp ovšem nalezeny nebyly (Evans *et al.*, 2006; McMenamin *et al.*, 2018). U *D. melanogaster*, *A. mellifera* i komára *Aedes aegypti* byly zjištěny dva negativní regulátory, PIAS (protein inhibitor of activated STAT) a SOCS (suppressor of cytokine signaling), schopné potlačit JAK/STAT dráhu (Souza-Neto *et al.*, 2009; McMenamin *et al.*, 2018).

Kromě již zmíněných konzervovaných drah jsou u včel, čmeláků i octomilky přítomny mechanismy antivirové ochrany, které zahrnují interferující RNA (RNAi), endocytózu, melanizaci, enkapsulaci a autofágovou aktivitu (Brutscher *et al.*, 2015).

2.3 Sociální imunita včel

Společenstva hmyzu, která žijí v hnízdě nebo úlu, mohou být považována za tzv. superorganismus (Cremer *et al.*, 2007). Do této skupiny řadíme především včely, vosy, mravence a termity, u kterých lze nahlížet na imunitní systém dvojím způsobem (Meunier, 2015). Jednak je imunita vyvinuta u každého jedince, ale na druhou stranu existuje imunitní systém na úrovni kolonie (Simone *et al.*, 2009).

Včely navíc jako společenský (eusociální) hmyz disponují tzv. sociální imunitou, na které závisí rezistence úlu/hnízda. Indikátorem pro tento druh imunity na úrovni kolonií je využíván enzym glukosaoxidasa (GOX; EC 1.1.3.4.) exprimován především v hypofaryngenálních žlázách. GOX katalyzuje oxidaci β -D-glukosy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku, který má antiseptické vlastnosti (Eichenseer *et al.*, 1999; Alaux *et al.*, 2010). Antiseptické produkty jsou vylučovány do larválních pokrmů (mateří kašičky) a medu, což má vliv na antimikrobiální ochranu a navíc na prevenci šíření nákaz na úrovni kolonií (Alaux *et al.*, 2010).

Pro eusociální jedince je snadnější starat se o potomky, shánění potravy a ochrana vůči predátorům (Simone *et al.*, 2009). Mezi ochranná chování sociální imunity patří např. sběr pryskyřic s antimikrobiální aktivitou, grooming, hygienické chování, či právě produkce GOX (Cremer *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2018). Díky hygienickému chování jsou jednotlivé dospělé včely schopny rozpoznat a odstranit kukly napadené parazity nebo nemocné larvy dříve, než dosáhnou infekčních stavů (Evans a Spivak, 2010). Toto odstranění mladých jedinců společně s patogeny je typické pro sociální imunitu. Nakažení jedinci nejsou zachráněni, ale zcela odstraněni, aby nedošlo k ohrožení celé

kolonie (Simone-Finstrom, 2017). Další ochranné chování, tzv. grooming, je považováno za vůbec první fázi ochrany vůči napadení patogeny (Zhukovskaya *et al.*, 2013). Včely vykonávají jak auto-grooming (čistí samy sebe), tak allo-grooming (péče o další včely v úlu). Grooming se týká hlavně obrany proti ektoparazitům jakým je např. *Acarapis woodi*, tracheální roztoč. V tomto případě eliminují roztoče jednotlivci pomocí auto-groomingu a ve výsledku tak chrání zdraví celé kolonie (Simone-Finstrom, 2017).

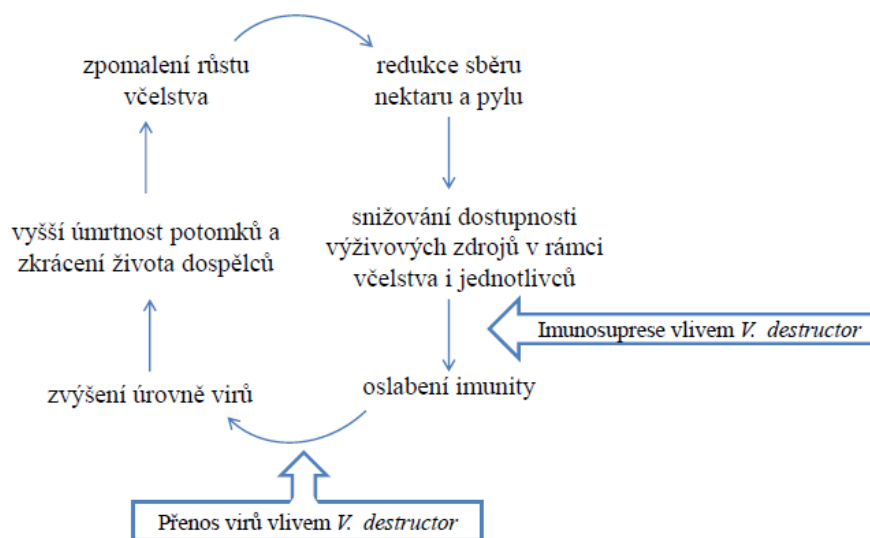
Studium Baracchi *et al.* (2011) ukázalo, že včelí kutikula je pokryta jedem obsahujícím peptidy, který sám o sobě má antimikrobiální účinky. Jeho šíření na kutikulách tak může mít přímý účinek proti invazi patogenů. Navíc bylo zjištěno, že se tyto sloučeniny vyskytují uložené v plástech, což nasvědčuje využití sociální imunity. Dospěli tedy k názoru, že jed není včelami používán jen jako obrana vůči predátorům, ale má i ochrannou funkci (Baracchi *et al.*, 2011).

2.4 Oslabení imunitního systému včel

V poslední době jsou zaznamenávány vyšší ztráty včelstev v různých zemích světa (van Engelsdorp *et al.*, 2009; Brodschneider *et al.*, 2016; Brodschneider *et al.*, 2018). Tyto ztráty vznikají v důsledku řady faktorů, jejichž základem může být fakt, že díky vnějším stresorům (tlak parazitů, vystavení pesticidům, špatná výživa) je snížena imunokompetence a zároveň vyšší náchylnost vůči patogenům (Obr. 7) (Goulson *et al.*, 2015; Reeves *et al.*, 2018). V oblastech mírného pásu dochází k nejvyšším ztrátám především v zimním období a právě nákazy způsobené patogeny jsou považovány za klíčové (Dainat *et al.*, 2012). Za jedno z největších ohrožení je pokládán invazivní ektoparazitický roztoč *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010). Ten může představovat vektor pro vnesení virů do hostitele např. virus deformovaných křídel - deformed wing virus (DWV) a virus akutní paralýzy - acute bee paralysis virus (ABPV), nebo se u hostitele po jeho invazi začnou replikovat viry, které až do této doby přetrvávaly v latentním stavu (Wegener *et al.*, 2016). Viry se společně s roztočem mezi včelami (včelím plodem i dospělci) šíří především přítomností v potravě (Rosenkranz *et al.*, 2010). Dle van Dooremalen *et al.* (2013) je u včel, na kterých parazituje *V. destructor*, narušena rovnováha mezi imunitou a výživou. U napadených dělnic byly pozorovány nižší hladiny bílkovin než u klinicky zdravých jedinců. Koncentrace proteinů nebyly navýšeny ani u infikovaných jedinců dodatečně krmených pylem v podobě plástového pylu neboli pergy (Dooremalen *et al.*, 2013).

Další hrozbu, která se podílí na ztrátách včelstev, představuje houba – hmyzomorka (*Nosema ceranae* a *Nosema apis*). Jedná se o intracelulárního parazita včel medonosných, který vystřeluje pólové vlákno, aby mohl infikovat epiteliální buňky trávicího traktu. Včely trpí zažívacími potížemi, což jim zkracuje život, nákaza se vyskytuje zejména po zimním období (Higes *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). Velmi diskutovanou chorobou je také mor včelího plodu, který zapříčiňuje Gram-pozitivní bakterie *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010). Po vniknutí patogena do organismu dochází k napadení trávicího traktu larev, kde *P. larvae* produkuje proteasy štěpící proteiny. U trávicího traktu se bakterie mohou dostat skrz ochrannou peritrofitickou membránu až do hemocoelu. Bakterie ve formě velice odolných spor přežívají v úlech až několik desítek let (Genersch, 2010).

Pokud vyloučíme zmíněná onemocnění, významný vliv na imunokompetenci včel má také prostředí, v němž žijí. Tito jedinci jsou často vystavováni působení celosvětově používaným chemickým látkám, pesticidům (Wu *et al.*, 2011). Včely disponují asi polovinou genů kódujících detoxifikační enzymy, než jiný, více odolný hmyz (např. moucha – *D. melanogaster* nebo komár – *An. gambiae*), což zvyšuje jejich citlivost k těmto látkám a také náchylnost k bakteriálním, či virálním chorobám (Claudianos *et al.*, 2006). Sanchez-Bayo a Goka (2014) provedli studii, v níž uvádějí, že za velmi ohrožující jsou v posledních letech považovány insekticidy neonikotinoidy (thiacloprid, imidacloprid a clothianidin) a také organofosfáty (fosmet a chlorpyrifos). Brandt *et al.* (2016) se zabývali subletálními účinky všech tří zástupců neonikotinoidní skupiny látek a jejich vlivem na imunokompetenci včel, tedy na celkový počet hemocytů, schopnost enkapsulace a antimikrobiální aktivitu hemolymfy. U thiaclopridu i imidaclopridu byl prokázán účinek na snížení všech testovaných aspektů imunokompetence včel v koncentracích odpovídajících reálným koncentracím v prostředí. Clothianidin působí na imunitní parametry pouze ve zvýšených koncentracích, než je běžně v zemědělství používán.



Obr. 7: Schéma souvislostí mezi výživou, imunitou, odolností vůči virům a vlivem na rozvoj včelstev po napadení roztočem *Varroa destructor* (převzato a upraveno dle DeGrandi-Hoffman a Chen, 2015).

2.5 Délka života a imunitní odpověď včel v různém vývojovém stádiu

Včely žijí v koloniích, kde je přítomna vždy jedna včelí matka (královna), asi 20 – 40 tisíc včelích dělnic a několik set trubců. Jejich přítomnost závisí na ročním období, jelikož na podzim a v zimě se trubci ve včelstvu nevyskytují vůbec (Page a Peng, 2001). Mezi jednotlivými kastami jsou významné rozdíly v délce života. Zatímco se matky dožívají 1- 5 let, u dělnic je délka života výrazně snížena průměrně na 6 týdnů během léta a v zimním období se délka života pohybuje kolem 200 dní. Trubci se během léta dožívají až 8 týdnů (Remolina a Hughes, 2008). Dělnice podléhají charakteristickému vývoji v plnění úkolů v úlu / hnízdě. Během prvních dvou týdnů dospělého života se včely starají o potomky (ošetřovatelky / kojčky), také o pořádek v hnízdě a později se z nich stávají létavky, jejichž úkolem je sběr nektaru a pylu z okolí (Fluri *et al.*, 1982; Guidugli *et al.*, 2005). Přeměna ošetřovatelek na létavky bývá doprovázena zvýšenou koncentrací juvenilního hormonu (JH) a snížením koncentrace 200kDA glykolipoproteinu vitellogeninu (Vg) (Amdam *et al.*, 2004). JH je hlavním hormonem hmyzu ovlivňující metamorfózu a reprodukci (Corona *et al.*, 2007). U dělnic je gen pro Vg nejvíce exprimován kolem 12. dne života, tedy ve stádiu ošetřovatelek, kdy je produkován hypofaryngeálními žlázami a slouží jako zdroj potravy pro potomky (Fluri *et al.*, 1982; Seehuus *et al.*, 2006). Studium Corona *et al.* (2007) bylo prokázáno, že u dělnic je v porovnání s matkami produkce Vg velmi nízká. Z tohoto důvodu disponují matky vyšší životností. Glykoprotein Vg totiž působí také jako antioxidant a chrání

organismus vůči negativnímu působení oxidačního stresu (Amdam *et al.*, 2004; Corona *et al.*, 2007).

Schmid *et al.* (2008) testovali aktivitu enzymu PO a zároveň počet hemocytů u dospělých včel i plodu, a také mezi dělnicemi, trubci a matkami. U všech tří kast byl pozorován společný trend, kdy se s přibývajícím věkem snižoval počet hemocytů. Aktivita PO takovýto trend nevykazovala, ale v rámci kast se lišila. U dělnic hladina enzymu dosáhla nejvyšší aktivity po prvním týdnu dospělého života, u matek se aktivita kontinuálně zvyšovala a již v prvních dnech byla 2× vyšší než u dělnic. U trubců se naopak aktivita PO neustále mírně snižovala (Schmid *et al.*, 2008).

Obdobnou studii provedli dříve Wilson-Rich *et al.* (2008). Tito vědci se zabývali testováním základních parametrů imunokompetence (celkový počet hemocytů, aktivita PO, schopnost enkapsulace a kvantifikaci tukového tělíska) dělnic od larev, přes kukly, kojičky až po létavky. Plod (larvy a kukly) měly vyšší počet hemocytů než dospělci, nejvyšší počet byl zaznamenán u kukel. S imuosenescencí se naopak zvyšovala aktivita enzymu PO. Schopnost enkapsulace parazitů se mezi stádii výrazně nelišila. Tukové tělísko bylo kvantifikováno pouze v rámci dospělců, přičemž vyšší hodnoty byly měřeny u kojiček (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

Jelikož je mnoho studií založených na zkoumání dělnic, rozhodli se Gätschenberger *et al.* (2012) zaměřit svůj výzkum na larvy a dospělé trubců, kteří byli chováni *in vitro* a u kterých byla uměle vyvolána bakteriální infekce (bakterií *Escherichia coli*). U larev i mladých dospělců byla vyvolána silná imunitní reakce v odpovědi na infikaci, jelikož byla zvýšena exprese malých AmP (hymenoptaecinu i defensinu-1) vyskytujících se v hemolymfě. U dospělců navíc vedla infikace ke zvýšení exprese genů pro PGRP-S2 a lysozym. U neinfikovaných dospělých trubců byla pomocí elektroforézy s následným Western blottingem i ověřením pomocí MS/MS zjištěna konstantní hladina zymogenu ProPO během celé délky života. U dospělých neinfikovaných trubců byl pomocí elektroforézy a blottingu na PVDF membránu detekován Vg a to pouze mezi 3. a 14. dnem života (Gätschenberger *et al.*, 2012).

Laughton *et al.* (2011) provedli měření aktivity PO a AmP dělnic a trubců v různých vývojových stádiích. Obě kasty vykazovaly menší míru exprese PO enzymu v larválním stádiu i ve stádiu kukly. Dělnice vykazovaly s přibývajícím věkem vyšší aktivitu AmP. U trubců byly hladiny aktivity AmP velmi nízké. Obě kasty byly pro další měření

ošetřeny LPS, jako složkou buněčné stěny Gram-negativních bakterií. Poté se u obou skupin snížila aktivita PO, ale naopak několika násobně narostla aktivita AmP, přičemž u mladých jedinců 3× více než u dospělců. Aktivita AmP byla stanovena pomocí difúzního testu vůči bakterii *Arthrobacter globiformis* (Laughton *et al.*, 2011).

2.6 Purifikace peptidů a proteinů z komplexních matic

Již prvotní proces přípravy vzorků má vliv na všechny pozdější testovací kroky, je to tedy kritický krok pro výslednou identifikaci, potvrzení a kvantifikaci analytů. Příprava, která zahrnuje izolaci, a také případné zakoncentrování analytu z různých matic, zabírá asi 80 % času celkové analýzy. Pro přípravu vzorků jsou často využívány poměrně zdlouhavé metody extrakce z kapaliny do kapaliny, nebo extrakce na pevné fázi (Nováková a Vlčková, 2009). Počátečním krokem purifikace, je tedy izolace požadovaného analytu z výchozího materiálu. Náročnost této fáze závisí na tom, zda se jedná o protein intracelulární nebo extracelulární. Pokud se požadovaný protein nachází v intracelulární formě, musí dojít k narušení zdrojových buněk či tkání. Živočišné buňky na rozdíl od rostlinných postrádají buněčnou stěnu a tkáň je tak relativně snadno narušena s využitím homogenizátoru případně osmotickým šokem (Walsh, 2014). Extrakční krok přípravy proteinů může mít řadu nevýhod, jelikož se často využívá přítomnosti detergentů, které solubilizují membrány. Hlavní nevýhodou související s využitím detergentů je jejich schopnost denaturace a srážení proteinů. Také další chemikálie jako rozpouštědla nesou sebou tyto nevýhody a přítomnost dalších látek tak může nepříznivě ovlivnit následný purifikační krok (Walsh, 2014). Přestože mohou proteiny pocházet z různých zdrojů, jsou obvykle purifikovány obdobnými přístupy i metodami, nejčastěji se jedná o chromatografické metody (Tab. 2), které jsou vhodné pro analýzu organických molekul (Nováková a Vlčková, 2009; Walsh, 2014).

Získání proteinových profilů je základem pro hodnocení mnoha aspektů biologických procesů. Proteinové složení hemolymfy, těla nebo extraktů specifických tkání mohou poskytovat informace např. o vývojových fázích, procesu stárnutí, nebo zdravotním stavu organismu (Hartfelder *et al.*, 2013). Mezi počáteční kroky v analýze těchto molekul patří stanovení celkového obsahu proteinů v daném vzorku. Jednou z možných metod je stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda (Bradford, 1976). Tato metoda je založena na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue s proteinem prostřednictvím iontových interakcí mezi skupinami sulfonových kyselin a pozitivními aminovými skupinami (Bradford, 1976). Další metodou je bicinchoninová metoda

(BCA), která nabyla významu při stanovení proteinů ve vzorcích obsahujících detergenty (Smith *et al.*, 1985).

Na rozdíl od stanovení celkového obsahu proteinů lze provést analýzu proteinového složení mnoha metodami a jejich příslušnými variantami. Nejběžnějšími přístupy laboratoří pro detekci specifických proteinů v komplexní směsi jsou elektroforetická separace proteinů podle jejich molekulové hmotnosti založena na původní metodě dle Laemmliho (1970) a dvě imunologické metody - Western blotting (Wb) a raketová imunoelktroforéza. Obě metody jsou využívány při studiu proteinů včel (Pinto *et al.*, 2000; Hartfelder *et al.*, 2013). Mezi pokročilejší metody patří např. 2D elektroforéza nebo vysoce výkonné proteomické analýzy (Gygi *et al.*, 2000). Pomocí 2D elektroforézy jsou proteiny děleny nejprve v prvním směru na základě svých izoelektrických bodů v gradientu pH, jako při metodě izoelektrické fokusace. Ve druhém směru dochází k dělení ve stejnosměrném elektrickém poli za denaturačních podmínek v polyakrylamidovém gelu. Gely využívané v této metodě zajišťují mnohem vyšší rozlišení, než gely užívané klasickou jednorozměrnou elektroforézou. Bandy získané v gelech mohou být využity pro sekvencování aminokyselin pomocí analýzy Matrix-assisted laser desorption / ionization (MALDI) time of flight (TOF) (Gygi *et al.*, 2000). Poté může následovat porovnávání aminokyselinových sekvencí s databázemi. 2D elektroforéza byla využita pro studium proteomu hemolymfy včel Bogaertsem *et al.* (2009).

Tab. 2: Nejčastěji využívané chromatografické techniky pro purifikaci proteinů (převzato a upraveno dle Walsh, 2014).

| Technika | Princip separace |
|---------------------------------------|--|
| Gelová permeační chromatografie | Rozdíly v hmotnosti / tvaru molekul |
| Iontoměničová chromatografie | Rozdíly v náboji proteinu při daném pH |
| Afinitní chromatografie | Založena na specifické interakci proteinu s vhodným ligandem |
| Chromatografie s hydrofobní interakcí | Rozdíly v hydrofobicitě povrchu proteinů |
| Chromatofokusace | Separace proteinů na základě rozdílných izoelektrických bodů |

2.6.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) je v dnešní době hojně využívanou separační metodou užívanou především pro analýzu a purifikaci velkých molekul (Kurien a Scofield, 2006; Mahmood a Yang, 2012). Principem stanovení molekulové hmotnosti (MW) pomocí SDS-PAGE je alespoň částečné rozvinutí molekul proteinů, jejich denaturace a obalení SDS na hydrofobních místech. Toto chemické činidlo udává polypeptidickým řetězcům stejnou hustotu povrchového náboje, tudíž dochází k dělení pouze na základě MW v poli stejnosměrného elektrického proudu (Schägger a von Jagow, 1987; Rath *et al.*, 2009). Reynolds a Tanford (1970) ve své studii uvedli, že optimální hmotnostní poměr je 1,4 g SDS na 1 g proteinu.

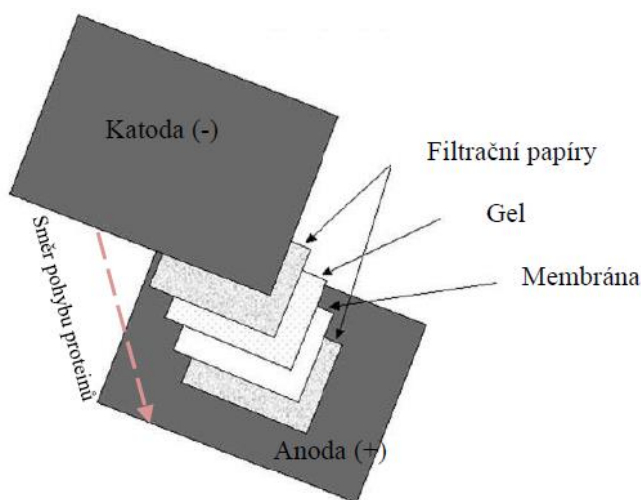
Elektroforéza existuje v několika modifikacích, přičemž nejběžněji používanými jsou Glycinová-SDS-PAGE (dle Laemmliho, 1970) a Tricinová-SDS-PAGE (dle Schägger a von Jagow, 1987), která je založena na glycin-tris a Tricin-tris pufovacím systému (Schägger, 2006). Pro charakteristiku akrylamidových gelů se využívá procentuální koncentrace (%T) obou monomerů, tedy akrylamidu a cross-linkeru bisakrylamidu a koncentrace (%C) cross-linkeru vůči celkové koncentraci (Schägger, 2006). Samotný proces zahrnuje přípravu zaostřovacího a separačního gelu, k jejichž ztuhnutí a polymerizaci se využívá persíran amonný (APS) a TEMED. Poté jsou gely umístěny do elektroforetické komůrky a zality elektrodoými pufrů. Před spuštěním elektroforézy jsou do jamek na gelu pipetou nanášeny vzorky ve směsi se vzorkovacím pufrům a příslušný standard molekulových hmotností. Jako redukčního činidla se využívá dithiothreitolu, nebo 2-merkaptóethanolu (MeSH). Proces je ukončen doputováním vzorku ke spodnímu okraji gelu. Pomocí detekčních metod (např. barvení Coomassie Brilliant Blue, detekce stříbrem) může být vzorek vizualizován přímo na gelu, nebo přeblováním detekován na membráně (Schägger a von Jagow, 1987; Schägger, 2006; Mahmood a Yang, 2012).

2.6.2 Imunochemická detekce proteinů pomocí Western blottingu

Western blotting (Wb), protein blotting nebo imunoblotting je důležitá metoda sloužící k detekci konkrétního proteinu (antigenu) ve směsném vzorku s dalšími proteiny pomocí polyklonálních nebo monoklonálních protilátek. Wb zahrnuje tři hlavní fáze a to již zmíněnou SDS-PAGE, samotný proces blotování (transfer) a vizualizaci

přenesených proteinů imobilizovaných na dané membráně (Kurien a Scofield, 2006; Mahmood a Yang, 2012).

Přenos je možné provést prostřednictvím prosté difúze, proudem rozpouštědla ve vakuu, nebo silou elektrického pole. Elektrobloťing neboli elektrotransfer je nejpoužívanějším způsobem přenosu, kdy záporně nabitě proteiny z gelu putují směrem k anodě a v tomto směru jsou zachyceny na membránu. Výhodou je jeho rychlost a komplexnost transferu oproti např. difúznímu typu (Kurien a Scofield, 2006). Původní popis transferu proteinů z gelu na membránu uvedli ve svém článku Towbin *et al.* (1979). Podle původní metody může být přenosu dosaženo buď „mokrým / wet“ přenosem, úplným ponořením tzv. sendviče (Obr. 8) do blotovacího pufru neboli blottingem v tankovém uspořádání, nebo „polosuchým / semi-dry“ přenosem, nasáknutím sendviče v blotovacím pufru a jeho umístěním do suché komory. Po SDS-PAGE jsou tedy rozseparované podjednotky proteinů transferovány (přebloťovány) na membránu, často nitrocelulosovou (NC) nebo polyvinyliden fluoridovou (PVDF). Právě PVDF membrána je díky zvýšené hydrofobicitě vhodnější k detekci malých peptidů a také peptidů v malém zastoupení. Tato membrána disponuje dobrou retenční kapacitou a současně mechanickou pevností v extrémních podmínkách (např. v organických rozpouštědlech, kyselých nebo zásaditých podmínkách). Aby byla membrána kompatibilní pro ponoření do vodných roztoků, je nutné ji ponechat po několik minut v methanolu. NC membrány jsou však levnější a lepší k obecnějším účelům, ale mechanicky slabé (Wu *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2012).



Obr. 8: Znárodnění složení sendviče pro elektrotransfer proteinů z gelu na membránu (převzato a upraveno podle Lee, 2007).

Aby došlo k potlačení nespecifické adsorpce látek (proteinů, protilátek), jsou po přenosu nespecifická vazebná místa na membráně blokována její inkubací v blokovacím roztoku proteinů např. v roztoku BSA (hovězí sérový albumin) v TBS pufru (Tris-Buffered saline), nebo v roztoku sušeného mléka v TBS pufru. Namísto TBS lze použít také PBS (phosphate-buffered saline). Poté imobilizované (cílené) proteiny reagují se specifickou primární protilátkou, což vede k tvorbě komplexu antigen-protilátka, na který se váže sekundární protilátka často konjugovaná s reportérovým enzymem. Běžně používanými jsou např. alkalická fosfatasa (AP), křenová peroxidasa (HRP) (Kurien a Scofield, 2006; Mahmood a Yang, 2012; Hartfelder *et al.*, 2013). Další způsoby imunodetekce jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3).

K zabránění dalších nespecifických adsorpcí látek je vhodné membrány po blokování a také mezi jednotlivými kroky inkubací s protilátkami promývat např. roztokem TBS. Ke snížení pozadí, tedy zabránění nespecifickým hydrofobním vazbám proteinů na membránu, je do těchto roztoků často přidáván detergent jako Tween-20, SDS nebo Triton X-100 (Wu *et al.*, 2007).

Tab. 3: Shrnutí nejčastěji využívaných metod a reagensů pro detekci proteinů na membráně po blottingu (Kurien a Scofield, 2006; Wu *et al.*, 2007).

| Metoda detekce / značení | Příklady reagensů |
|--|--|
| Radioaktivní | Jodovaný (¹²⁵ I) stafylokokový protein A, nebo streptokokový protein G |
| Chemiluminiscenční | HRP se substrátem luminolem / AP se substrátem adamantyl-1-2-dioxetan fosfátem |
| Detekce se zlatem | Protein A vázaný na částice zlata |
| Kolorimetrické (reagencie vázané na enzym) | Protilátka vázaná s AP nebo HRP se substrátem BCIP / NBT |
| Fluorescenční | Fluorescenční značení proteinů pomocí 2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)-furanonu (MDPF) |

2.6.3 Metody analýzy peptidů včel

Peptidy s antimikrobiální aktivitou (abaecin, apidaecin a hymenoptaecin) vyskytující se v hemolymfě včel byly postupně detekovány Casteelsem *et al.* (1989), Casteelsem *et al.* (1990), Casteelsem *et al.* (1993). Pro jejich detekci a následné kvantifikaci byla včelám, které byly pro vyvolání imunitní odpovědi infikovány bakterií *E. coli*, odebrána po 24 hodinách hemolymfa. Hemolymfa byla 5 minut zahřívána na 100 °C, hemocyty a sraženiny byly odstraněny centrifugací. Získaný supernatant byl poté zředěn přidáním stejného objemu 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) ve vodě. Po purifikačních krocích byla směs oddělena separační metodou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi (RP) s kolonou C₄, pro další analýzu chromatografickou separací jedné ze získaných frakcí byla využita kolona C₁₈. Casteels-Josson *et al.*, 1994 poté identifikovali v hemolymfě jednu z isoform defensinu-1. Druhou isoformu (royalisin) detekovali již dříve Fujiwara *et al.* (1990) v mateří kašičce také pomocí RP-HPLC s UV detekcí při 214 nm, které předcházelo několik purifikačních kroků např. extrakce kyselinou a gelová filtrace. Kromě mateří kašičky detekovali Bachanová *et al.* (2002) royalisin jako AmP účinný vůči bakterii *P. larvae* také ve včelích hrudnicích a hlavičkách. Tělní části byly homogenizovány na prášek, poté byla provedena extrakce sukcinátovým pufrům o pH 4. Proteiny a peptidy v získaných extraktech byly separovány optimalizovanou diskontinuální nativní PAGE v kyselých podmínkách a poté blotovány na membránu. Peptidové bandy byly vizualizovány CBB R-250, vyříznuty a sekvencovány pomocí automatizované N-koncové Edmanovy degradace.

Danihlík *et al.* (2014) optimalizovali metodu pro vysoce citlivou studii kvantifikace isoform apidaecinu-1 v hemolymfě i částech těl jednotlivých včel. Přestože počáteční extrakce vychází z protokolu podle Casteelse *et al.* (1989) jsou v této studii provedeny nové purifikační kroky např. obohacení apidaecinu-1 ve vzorcích slabou kationtoměničovou chromatografií na RP. Po odsolení na koloně C₈ byly obohacené fragmenty pro identifikaci a kvantifikaci dále analyzovány separací na RP pomocí nanokapilární kapalinové chromatografie (nLC) na koloně C₄ s on-line vysokorozlišovací MS detekcí (Q-TOF).

V mateří kašičce byl Bilíkovou *et al.* (2002) purifikován a charakterizován peptid apisimin, který však nevykazuje antibakteriální aktivitu. N-koncovou Edmanovou degradací byla určena AMK sekvence, hmotnostní spektrum peptidu bylo zjištěno metodou MALDI-TOF, které předcházela jeho purifikace iontoměničovou

chromatografií tzv. fast protein liquid chromatography (FPLC), izoelektrický bod byl stanoven v rozmezí hodnot 3,55 – 4,55 izoelektrickou fokusací, sekundární struktura byla prozkoumána měřením spekter cirkulárního dichroismu (CD spektrometr).

K proteomickému profilování sekrece hypofaryngeálních žláz včel využili Santos *et al.* (2005) kombinaci 2D-PAGE s následným určením aminokyselinové sekvence peptidů pomocí MALDI-PSD/MS.

Zastoupením mellitinu a apaminu, tedy hlavními komponentami včelího jedu, se zabývali ve své studii Zhou *et al.* (2010). Pro stanovení těchto dvou proteinů v surovém lyofilizovaném prášku ze včelího jedu (zkr. CBVLP) byla optimalizována metoda HPLC-DAD MS / MS. Peptidy mellitin a apamin byly z CBVLP extrahovány čistou vodou a poté byla provedena již zmíněná analýza. Již dříve bylo proteomickými metodami (2D-elektroforézou a MALDI-TOF / TOF MS) zjištěno zastoupení proteinů včelího jedu (Peiren *et al.*, 2005).

Pro studium infekce způsobené houbou *N. ceranae*, založeném na profilování metabolitů hemolymfy včel, uvedli Aliferis *et al.* (2012) metodu plynové chromatografie (GC) s hmotnostní spektrometrií (MS).

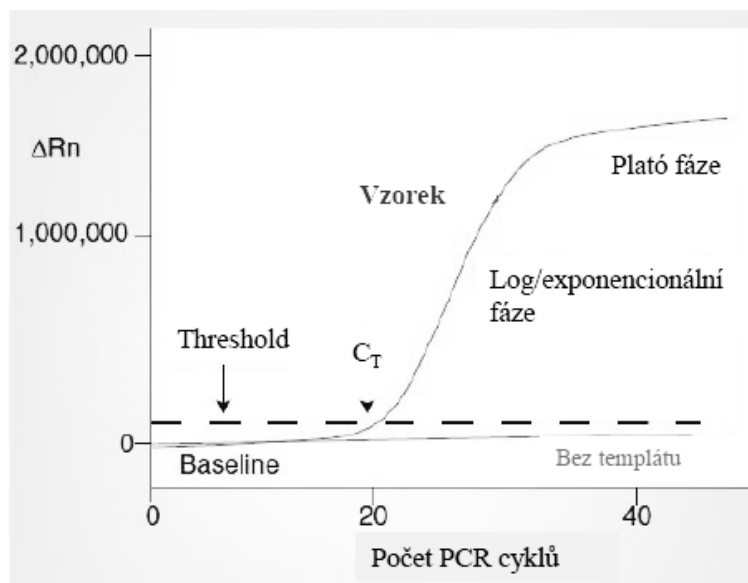
2.7 Kvantifikace genové exprese metodou RT-PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) v reálném čase umožňuje citlivou, specifickou a reprodukovatelnou analýzu exprese mRNA (transkriptomu) z různých matric (Bustin a Nolan, 2004; Arya *et al.*, 2005). Hladina transkriptomu je na rozdíl od genomu (analýza DNA) závislá na fyziologii, patologii nebo vývoji (Bustin a Nolan, 2004). Před samotným provedením metody je nejdříve nutno extrahovat ribonukleovou kyselinu (RNA) ze vzorku přímo ve vhodných pufrch, aby došlo k inaktivaci přítomných RNAas. Tyto enzymy disponují značným množstvím disulfidových vazeb, k jejichž deaktivaci jsou využívány např. detergenty (SDS), proteinasy, chaotropní soli (guanidin isothiokyanát), redukční činidla (β -merkapt ethanol) a sloučeniny chránící NK (př. cetyl trimethylammonium bromid). Vhodným denaturačním pufr pro izolaci RNA ve vzorcích včel je guanidin isothiokyanátový pufr (GITC) (Evans *et al.*, 2013). Evans *et al.* (2013) v review, jež se týká standardních metod molekulárního výzkumu *A. mellifera*, uvádějí jako komerční kit vhodný pro izolaci RNA Qiagene.

Další fází je přepis neboli reverzní transkripce získané RNA do cDNA. Tento krok je velmi důležitý, jelikož izolovaná RNA je dlouhodobě nestabilní. K syntéze cDNA jsou používány náhodné primery, oligo-dT, specifické primery nebo kombinace oligo-dT a náhodných primerů, přičemž nejvíce využívanými jsou oligo-dT primery. Bez ohledu na výběr primerů pro reverzní transkripci, samotná PCR reakce vyžaduje aplikování primerů specifických pro sledované geny (Bustin *et al.*, 2005).

Metoda qPCR je tedy používaným nástrojem pro kvantifikaci genové exprese (Schmittgen a Livak, 2008). Pro porovnání exprese specifických genů v daném organismu, je nutná přítomnost tzv. provozních neboli housekeeping genů (HKG), které slouží k normalizaci hladin RNA. Jedná se o geny důležité pro přežití organismu a jsou kontinuálně exprimovány bez ohledu na jeho fyziologický stav (Pfaffl, 2001; Dheda *et al.*, 2004). Pro každý organismus se však HKG mohou lišit (Lourenço *et al.*, 2008). Výběrem HKG pro včely (*A. mellifera*) se zabývá studie Lourenço *et al.* (2008).

K detekci vzniklých PCR produktů se využívá několika fluorescenčních barviv nebo sond. Pro svou jednoduchost se velmi oblíbeným stalo fluorescenční barvivo SYBR Green I, což je interkalační barvivo vážící se do malého žlábků dsDNA (Pfaffl, 2001; Zipper *et al.*, 2004). Příkladem sondy neboli próby je fluorogenní TaqMan[®], která má na svém 5' konci přítomné fluorescenční barvivo a na 3' konci tzv. zhášec. Próba se dokáže specificky navázat na cílovou sekvenci ve směsi nespecifických amplifikačních produktů a je závislá na 5' → 3' exonukleasové aktivitě Taq polymerasy (Freeman *et al.*, 1999; Arya *et al.*, 2005). Hodnota C_T je definována jako cyklus PCR, kdy fluorescenční signál reportérového barviva překročí prahovou hodnotu (tzv. threshold) (Schmittgen a Livak, 2008). Teoreticky i jedna kopie specifické sekvence může být amplifikována a detekována pomocí PCR (Obr. 9) (Arya *et al.*, 2005). Číselná hodnota C_T je nepřímo úměrná množství amplikonu v reakci, tedy čím je vyšší hodnota C_T, tím méně bylo templátu ve vzorku (Schmittgen a Livak, 2008).



Obr. 9: Popis standardní amplifikační křivky sigmoidního tvaru uvádějící nomenklaturu užívanou při práci s metodou qPCR. Hodnota ΔRn – emise fluorescenčního záření v každém časovém úseku; hodnota C_T – prahový cyklus (převzato a upraveno podle Arya *et al.*, 2005).

Chen *et al.* (2005) pomocí qPCR v reálném čase kvantifikovali míru nákazy včel virusem DWV v různých vývojových stádiích včel. S použitím qPCR byl DWV virus detekován v jednotlivých včelách a také u roztoče *V. destructor*. U včel, které byly infikovány roztočem *V. destructor* a u kterých již propukla nákaza DWV byla virální RNA detekována ve všech tělních částech (hlava, hrud', zadeček), u včel které byly pouze infikovány roztočem, ale byly bez symptomů DWV byla virální RNA pouze v zadečcích a hrudnicích. RNA viru byla také detekována v larvální potravě, což znamená, že se virus šíří nejen prostřednictvím roztoče (Yue a Genersch, 2005).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid (Sigma, USA), Agarosa (Serva, Německo), APS (Sigma, Německo), BCIP (Sigma, USA), Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA), Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma, Německo), Dusičnan stříbrný (Fluka, Německo), Formaldehyd (Lachema, ČR), GelRed (Biotium, USA), Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR), Hovězí sérový albumin (Carl Roth, Německo), Hydrogenfosforečnan draselný (Lachner, USA), Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Švýcarsko), Kyselina octová (Lach-Ner, ČR), Kyselina trifluoroctová (Fluka, Švýcarsko), Merkaptoetanol (Sigma, USA), Methanol (Lach-Ner, ČR), Močovina (Sigma, Německo), n-Butanol (Sigma, USA), NBT (Sigma, USA), Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA), SDS (Applichem, Německo), Síran hlinitý (Lach-ner, Česká republika), TAE pufr (Sigma, USA), TEMED (Fluka, Švýcarsko), Thiosíran sodný (Acros Organics, Belgie), Tricin (Sigma, USA), Tris (MP Biomedicals, Francie), Tween-20 (Sigma, USA), Uhličitan sodný (Lach-Ner, ČR)

3.1.2 Biologický materiál

Veškerý biologický materiál pro tuto diplomovou práci byl poskytnut vedoucím této práce Mgr. Jiřím Danihlíkem, Ph.D.

Hemolymfa:

Vzorky hemolymfy byly odebrány včelám (*A. mellifera carnica*) v srpnu 2016 na včelnici na Kývalce. Směsný vzorek se sestával z hemolymfy deseti včel. Celkem 20 μ l hemolymfy bylo smícháno s 5 μ l 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ fenylothiomočoviny v PBS pufru (pH 7,0). Vzorky byly zmrazeny a uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Včelí larvy:

Včelí larvy (*A. mellifera carnica*) byly odebrány v červnu roku 2012 ze včelnice Dr. Danihlíka u Valašského Meziříčí a následně umístěny do 96-jamkové mikrotitrační destičky, kde byly po dobu 4 dnů krmeny mateří kašičkou s cukry (Aupinel *et al.*, 2005). Ta navíc, kromě kontrolní skupiny, obsahovala 15, 150 a 1800 spor bakterie *P. larvae*, dle těchto počtů byly vzorky rozděleny do experimentálních skupin, přičemž

každá skupina obsahovala 72 takto ošetřených larev. Po 4 dnech byly larvy v deskách umístěny do mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Metodika složení krmiva byla použita dle Gregorc a Ellis (2011).

Dospělé včely:

Dospělé 10 denní včely (*A. mellifera carnica*) byly odebrány v červnu 2018 z experimentálních včelstev na Kývalce. Experiment se sestával z imunizace těchto včel. První den byly pro vylíhnutí mladušek zaizolovány rámkové desky. Ve třetím dni došlo k vylíhnutí mladušek, které byly na hrudi označeny bílou barvou (Obr. 10) a navráceny zpět do úlů. Po 10 dnech života za běžných podmínek byly odebrány a rozděleny do experimentálních skupin. První skupina (ozn. CO₂) se sestávala ze včel krátkodobě narkotizovaných pomocí CO₂, druhá skupina včel (ozn. PBS) byla taktéž uspána tímto plynem, ale navíc jí byl pod kutikulu vpíchnut sterilní roztok PBS ($0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; pH 7) v objemu 5 μl . Třetí skupina (ozn. PBS + Bakterie) byla opět narkotizována, ale ošetřena vpichem roztoku PBS, který obsahoval bakteriální suspenzi bakterie *Paenibacillus larvae* a *Escherichia coli* v koncentraci 1×10^6 buněk/ml suspenze. Včely byly po dobu 24 hodin drženy v inkubátoru při teplotě $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ v plastových klíčkách. Po této době byly včely usmrceny mrazem a uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čtvrtá skupina kontrolní (ozn. nic) byla pouze zmrazena bez jakéhokoli ošetření.



Obr. 10: Vybrané včely, které byly označeny bílou barvou, byly po 10 dnech normálního běžného života v úlu odebrány a imunizovány bakteriální suspenzí (fotografie použita se svolením Mgr. Jiřího Danihlíka Ph.D.).

3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), Automatické pipety (Eppendorf, Německo), CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, USA), Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo), Destička Take3™ Multi – Volume Plate (Bio-Tek, USA), Digitální pH metr InoLab pH level1 (InoLab, Německo), Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), Elektromagnetická míchačka (Biosan, Litva), Gel Doc EZ Imager System (Bio-Rad, USA), Chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), Kulový mlýnek FastPrep FP120 (Thermo Savant, USA), Lyofilizátor (Lyovac GT-2, Leybold-Heraeus, Německo), Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), Multifunkční reader Synergy H1 (Bio-Tek, USA), PCR termocykler (Eppendorf, Německo), Předvážky (KERN, Německo), PVDF membrána (Bio-Rad, Německo), Scanner pro chemiluminiscenční detekci na membránách (Li-Cor, USA), Semi-Dry Trans blot (Bio-Rad, USA), Třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva), Třepačka vortex V-1 Plus (Biosan Litva), Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR), Vortex mixer (Stuart, UK), Zdroj napětí pro SDS-PAGE elektroforézu (Bio-Rad, USA), Zdroj pro agarosovou elektroforézu (Major Science, USA)

3.1.4 Použité komerční kity a standardy

Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter)

Go Taq® polymerase Green Master Mix (Promega)

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Sybr™ Select Master Mix (ThermoFisher Scientific)

Transcriptor High Fidelity kit (Roche)

Turbo™ DNase (2 U/μl) (ThermoFisher Scientific)

Standard pro malé proteiny na SDS-PAGE (BioRad): obsahuje králičí triosafosfát isomerasu (26,625 Da); koňský myoglobin (16,950 Da); tuří α -lactalbumin (14,437 Da); tuří aprotinin (6,512 Da); tuří insulin, b řetězec, oxidovaný (3,496 Da); bacitracin (1,423 Da)

Unstained protein Standard, Broad-Range na SDS-PAGE: z 12 rekombinantních vysoce purifikovaných proteinů 10 – 200 kDa pro 10-20% Tris-glycin SDS-PAGE (NewEngland BioLabs)

Standard pro agarosovou elektroforézu: HyperLadder™ 50bp (Bioline)

Koktejl inhibitorů proteas (Sigma): obsahuje AEBSF (inhibice serinových proteas), 1,10-Fenantrolin (inhibice metalloproteas), Pepstatin (inhibice kyselých proteas), Leupeptin (inhibice serinových a cysteinových proteas), Bestatin (inhibice aminopeptidas), E-64 (inhibice cysteinových proteas)

3.1.5 Použité primery

Pomocí qPCR byla sledována exprese tzv. housekeeping genů (HKG) neboli provozních genů elongačního faktoru-1- α (*EF-1- α*) a aktinu (Aktin related protein, zkr. ARP) a také genů (tzv. gene of interest – GOI), které kódují peptidy vyskytující se v hemolymfě a také tukovém tělese včely medonosné (*A. mellifera*), abaecinu (Aba), apidaecinu (Api), hymenoptaecinu (Hymn) a defensinu-1 (Def-1). Primery byly dodány firmou Sigma-Aldrich. V Tab. 4 jsou shrnuty názvy použitých primerů, jejich vlastnosti i sekvence jak kódujícího (tzv. forward, zkr. F), tak antikódujícího (tzv. reverse, zkr. R). Primery byly dodány ve vialkách o koncentraci 100 mmol·l⁻¹, pro použití byly dále naředěny PCR vodou na hodnotu 10 mmol·l⁻¹ a 3,3 mmol·l⁻¹.

Tab. 4: Použité primery pro sledování exprese genů (Evans, 2006; Lourenco *et al.*, 2008; Simone *et al.*, 2009).

| Peptid/ protein | Typ genu | Název genu | Velikost amplikonu (*bp) | Primer 5'→3' |
|--------------------|-------------|----------------------------------|--------------------------------|--|
| Aba | GOI | <i>LOC406144</i> | 72 | F: CAGCATTCGCATACGTACCA R: GACCAGGAAACGTTGGAAAC |
| ARP | HKG | <i>Arp1</i> | 155 | F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG R: AGAATTGACCCACCAATCCA |
| Api | GOI | <i>Apid1</i> | 80 | F: TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG R: GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT |
| Def-1 | GOI | <i>def1</i> | 119 | F: TGCCTGCTAACTGTCTCAG R: AATGGCACTTAACCGAAACG |
| EF-1- α | HKG | <i>EF1α-F2</i> | 153 | F: GGAGATGCTGCCATCGTTAT R: CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT |
| Hymn | GOI | <i>hymenoptaecin</i> | 200 | F: CTCTTCTGTGCCGTTGCATA R: GCGTCTCCTGTCATTCCATT |

*zkratka bp – base pair, udává velikost amplikonu

3.1.6 Synteticky připravené protilátky

Primární (králičí) protilátky proti abaecinu, defensinu-1 a hymenoptaecinu byly vyrobeny na zakázku firmou Clonestar, Brno. K protilátkám proti abaecinu a defensinu-1 byly dodány standardy k ověření funkčnosti primárních protilátek – antigen navázaný na BSA a samotný purifikovaný peptid, který byl navržen jako vhodný epitop pro vazbu protilátky.

Sekundární kozí anti-králičí IgG protilátky, jedna byla značena alkalickou fosfatase (AP) a druhá peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, USA).

3.1.7 Použité roztoky

AA/BIS: 73 g akrylamidu; 2 g N,N'-metylen-bisakrylamidu; objem doplněn do celkového objemu 250 ml dH₂O

AB-3 (zaostřovací gel monomer): 96 g akrylamidu; 3,0 g N,N'-metylen-bisakrylamidu; rozpuštěno ve 200 ml dH₂O

AB-6 (separační gel monomer): 93,0 g akrylamidu; 6,0 g N,N'-metylen-bisakrylamidu; rozpuštěno ve 200 ml dH₂O

Anodový pufr (0,1 mol·l⁻¹ Tris, pH 8,9) 10×: 60,57 g Tris-base; pH upraveno 1 mol·l⁻¹ HCl na hodnotu 8,9; objem doplněn do celkového objemu 500 ml

Barvicí roztok CBB-G250: 0,02% CBB-G250; 5% síran hlinitý; 10% methanol; 8% kyselina fosforečná

Blotovací pufr: 3,025 g Trisu; 14,41 g glycinu; 20% (v/v) methanol; pH upraveno na hodnotu 8,3 a roztok byl doplněn dH₂O do celkového objemu 1 litr

Bradfordovo činidlo: 50 mg CBB G-250; 25 ml methanolu; 50 ml 85% kyseliny fosforečné; do celkového objemu 100 ml doplněno dH₂O

Elektrodový pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

Fixační roztok pro fixaci proteinů v gelu: 50% MeOH; 3% kyselina octová

Gelový pufr (3 mol·l⁻¹ Tris; 0,3% SDS; pH 8,45) 3×: 181,65 g Tris-base; 1,5 g SDS; pH upraveno konc. HCl na hodnotu 8,45; objem doplněn do celkového objemu 500 ml

GITC pufr: $5,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Guanidin isothiokyanát; $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6,4); $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; 1,3% Triton X-100; 1% 2-merkaptóetanol; do celkového objemu 200 ml doplněno dH_2O

Katodový pufr ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tricin; 0,1% SDS; pH 8,25) 10×: 60,55 g Tris-base; 89,6 g Tricinu; 5 g SDS; objem doplněn do celkového objemu 500 ml

K-fosfátový pufr ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7): 61,5 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K_2HPO_4 ; 38,5 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; objem doplněn do celkového objemu 1 litr dH_2O

Odbarvovací roztok po barvení CBB-G250: 10% methanol; 2% kyselina fosforečná

Pufr do dělicího gelu (glycinová elektroforéza): 36,33 g Tris do 150 ml dH_2O ; pH upraveno na hodnotu 8,8 HCl; objem doplněn na 200 ml

Pufr do zaostřovacího gelu (glycinová elektroforéza): 3,03 g Tris do 40 ml dH_2O ; pH upraveno na hodnotu 6,8 HCl; objem doplněn na 50 ml

RIPA pufr (lyzační, dodán z LRR UP): $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,4); $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA; 0,2% Nonidet; objem doplněn dH_2O do 50 ml

Roztok pro kolorimetrické stanovení – AP (alkalická fosfatasa) pufr: $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný; $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid hořečnatý; pH upraveno na hodnotu 9,5

TBS pufr: $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný; pH upraveno na hodnotu 7,5

Vzorkovací pufr (pro nanášení standardu): 4 ml dH_2O ; 2 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6,8); 2,4 ml glycerolu; 1 ml 10% SDS; 0,2 ml 2-merkaptóethanolu (MeSH); 0,4 ml 0,5% CBB-G250; pro použití byl takto připravený pufr smíchan se standardem v poměru 20:1

Vzorkovací pufr (Tricin-sample buffer, pro nanášení vzorků): 950 μl Tris-sample buffer; 20 μl 2-merkaptóethanol

Vzorkovací pufr (2× Laemmli, pro nanášení vzorků): 950 μl 2× Laemmli buffer; 50 μl 2-merkaptóethanol

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradforda

Pro stanovení koncentrace proteinů v daných vzorcích byla využita metoda dle Bradforda (1976). Pomocí BSA jako standardu byla přichystána koncentrační řada (200; 400; 600; 800; 1000; 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Měření bylo prováděno v 96-jamkové mikrotitrační destičce, kdy do jednotlivých jamek bylo pipetováno vždy 45 μl dH_2O ; 5 μl vzorku nebo vody (v případě blanku) a 200 μl Bradfordova činidla. Pomocí readeru Synergy H1 byla po 10 sekundovém protřepání měřena absorbance vzorků při vlnové délce 595 a 450 nm (Ernst a Zor, 2010). Vzorky byly pipetovány vždy ve třech technických replikátech.

3.2.2 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Hemolymfa včel:

Vzorky hemolymfy byly použity jednak neupravované ale také vysráženy smícháním s methanolem (MeOH) vychlazeným na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v poměru 1:4. Přes noc byly vzorky ponechány v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a dalšího dne byly centrifugovány po dobu 15 minut při $15000\times g$. Supernatant byl poté odpipetován a zbylý precipitát ponechán ve vakuové rotační odparce k vysušení po dobu 30 minut. Pro použití byly vysušené precipitáty rozpuštěny ve 20 μl $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Trisu-HCl (pH 6,8) a ve 20 μl vzorkovacího Tricin-sample buffer (Bio-Rad), ale také pouze ve 30 μl vzorkovacího Tricin-sample buffer (Bio-Rad).

Extrakty zadečků včel (A):

Pro extrakci byly použity infikované včely i klinicky zdravé. Z celého těla byla odňata hlava, pomocí pinzety bylo ze zadečku vytaženo trávicí ústrojí, které by kvůli značnému množství pylu a dalších látek, které obsahuje, mohlo zkreslovat výsledky. Nakonec byl od zadečku odstřižen také hrudník. Zadeček obsahující tukové těleso byl vložen do 2ml mikrozkuřavky, k němu byly přidány skleněné kuličky, 250 μl 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) a vzorek byl pomocí kulového mlýnku zhomogenizován. Po dalším přidání 250 μl 0,1% TFA byl vzorek opět homogenizován. Následovala centrifugace při $15000\times g$ po dobu 10 minut. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkuřavky a umístěn do termobloku, kde byl po dobu 10 minut zahříván na $100\text{ }^\circ\text{C}$. Po centrifugaci ve vychlazené centrifuze na $5\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut

při otáčkách 15000 $\times g$ byl opět supernatant přepipetován do nových mikrozkuhavek. Extrakty byly uloženy v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechány po dobu 1,5 hodiny. Poté byly vzorky přes noc lyofilizovány. Pro použití byly vzorky rozpuštěny v 60 μl $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (pH 7).

Extrakty zadečků včel (B):

Ze zadečků imunizovaných včel (skupina CO_2 , PBS a PBS + Bakterie) bylo pinzetou opatrně vytaženo trávicí ústrojí (střeva plná pylu). Po jednom byly zadečky vloženy do 2ml mikrozkuhavek, k nim bylo přidáno 250 μl RIPA pufru, skleněné kuličky a vzorek byl homogenizován v kulovém mlýnku. Poté byl přidán stejný objem pufru a následovala další homogenizace. Vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut při 14000 $\times g$. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuhavky. Tento samý proces byl proveden místo RIPA pufru také s $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátovým pufrům (pH 7).

3.2.3 SDS-PAGE

Separace proteinů ve vzorcích z různých matic byla provedena metodou SDS-PAGE. Pro optimalizaci byly použity dvě modifikace této analýzy. Jednalo se o Glycinovou SDS-PAGE (dle Laemmliho, 1970) a Tricinovu SDS-PAGE, která je vhodnější pro analýzu malých peptidů (dle Schägger a von Jagow, 1987). Pro barvení gelů po proběhnutí elektroforézy byl využit roztok koloidního CBB-G20 a také barvení stříbrem (Schägger, 2006). V případě koloidního CBB-G250 byly gely nejprve promývány fixačním roztokem po dobu 30 minut, poté barveny v roztoku 1,5 hodiny a nakonec po 15 minutách $3\times$ promyty odbarvovacím roztokem. Barvení stříbrem zahrnovalo několik kroků, které jsou shrnuty v Tab. 5 včetně použitých roztoků.

Glycinová SDS-PAGE: Byl využit 15% separační gel o pH 8,8 a 4% zaostřovací gel o pH 6,8. Složení gelu je uvedeno v Tab. 6. Po vložení gelů do elektroforetické komory byl přidán elektrodotový pufr a separace proteinů probíhala při počátečním napětí 120 V, které bylo po zaostření vzorku v gelu zvýšeno na 200 V. Vzorky byly před nanesením na gel smíchány v poměru 1:1 s $2\times$ Laemmliho vzorkovacím pufrům. Směs byla promíchána a inkubována v termobloku při teplotě $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Po vychladnutí byl vzorek nanesen na gel v objemu 10 μl . V tomto objemu byly nanášeny také příslušné standardy.

Tricinová SDS-PAGE: Tento typ elektroforézy zahrnuje dva typy gelů a to 16% dělicí gel obsahující glycerol a 16% dělicí gel s přidavkem močoviny. Separační gel byl opět 4%. Po vložení gelů do elektroforetické komory byly přility katodový (mezi gely) a anodový (vně) pufr. Počáteční napětí pro elektroforézu bylo nastaveno na 50 V a po zaostření vzorků v gelu bylo pro průchod dělicím gelem zvýšeno na hodnotu 120 V. Vzorky byly smíchány v poměru 1:1 s Tricin-sample buffer (Bio-Rad) vzorkovacím pufrem a v tomto případě nebyly zahřívány. Na gel byly jak vzorky, tak standardy nanášeny v objemu 10 nebo 12 μl .

Složení 16% gelu: 10 ml AB-6; 10 ml gelového pufru (3 \times); 3 g glycerolu; roztok doplněn na celkový objem 30 ml dH_2O ; polymerizace zahájena 100 μl 10% APS a 10 μl TEMEDu

Složení 16% gelu s $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močovinou: 10 ml AB-6; 10 ml gelového pufru (3 \times); 10,8 g močoviny; roztok doplněn na celkový objem 30 ml dH_2O ; polymerizace zahájena 100 μl 10% APS a 10 μl TEMEDu

Složení 4% zaostřovacího gelu: 1 ml AB-3; 3 ml gelového pufru (3 \times); roztok doplněn na celkový objem 12 ml dH_2O ; polymerizace zahájena 90 μl 10% APS a 9 μl TEMEDu

Tab. 5: Průběh a složení roztoků pro barvení stříbrem.

| Krok | Čas | Složení roztoků |
|--------------------|-------------------|---|
| Fixace | 2 \times 15 min | 50% MeOH, 12% k. octová; 0,05% formaldehyd |
| Promytí | 3 \times 10 min | 50% EtOH |
| Senzitizér | 1 min | $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ thiosíran sodný |
| Promytí | krátce | Destil. voda |
| Barvení | 20 min | $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dusičnan stříbrný; 0,075% formaldehyd |
| Promytí | krátce | Destil. voda |
| Vývojka | 1-2 min | $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ uhličitan sodný, $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ thiosíran sodný; 0,05% formaldehyd |
| Zastavení zbarvení | 10 min | 50% MeOH, 12 % k. octová |
| Skladovací roztok | 20 min | 20% EtOH, 2% glycerin |

Tab. 6: Složení gelů užívaných glycinovou SDS-PAGE. Objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v ml, odpovídají 2 gelům o tloušťce 0,75 mm.

| Typ gelu | dH_2O | Akrylamid/ Bis | 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 | 10% (w/v) SDS | 10% (w/v) APS | TEMED |
|----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------|
| Zaostřovací 4% | 6,1 | 1,3 | - | 2,5 | 0,1 | 0,1 | 0,01 |
| Dělicí 15% | 3,4 | 4 | 2,5 | - | 0,1 | 0,1 | 0,01 |

3.2.4 Western blotting

Proteiny separované metodou SDS-PAGE byly transferovány (přebloťovány) pomocí Semi-dry blottingu na PVDF membránu. Před tímto procesem byla PVDF membrána po dobu 5 minut namočená v MeOH. Poté byla společně s filtračními papíry i gely ponořena do blotovacího pufru po dobu 15 – 20 minut. Komponenty byly v podobě tzv. sendviče, který byl sestaven v pořadí filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír a vloženy do elektroforetické transferové komory přístroje Trans-Blot Semi Dry. Samotný proces blotování probíhal 2 hodiny, nastavení proudu bylo vždy spočítáno na základě velikosti membrány a počtu membrán ($0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$). Následovalo tzv. blokování membrány. V tomto kroku byla membrána inkubována po dobu 2 hodin nebo přes noc v roztoku 5% BSA v TBS pufru v lednici při teplotě 4 °C. Dále probíhalo promývání membrány 3× po 10 minutách v roztoku TBS pufru, který byl navíc obohacen o 0,1% Tween-20. Po dobu minimálně dvou hodin při teplotě 4 °C byla membrána umístěna do roztoku primárních protilátek, které byly s TBS pufrům s 5% BSA ředěny v poměru 1:500. Po ukončení inkubace byla membrána po 10 minutách 3× promyta roztokem 0,1% Tweenu-20 v TBS pufru. Poslední inkubace byla se sekundární protilátkou, která byla ředěna v poměru 1:5000, 1:10000 v roztoku 0,1% Tweenu-20 v TBS pufru po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po promývání 3× po 10 minutách 0,1% roztokem Tweenu-20 v TBS pufru byla provedena detekce na membráně. V případě kolorimetrické detekce pro dvě membrány bylo smícháno 10 ml AP pufru s barvicím substrátem obsahujícím 33 μl NBT a 33 μl BCIP. Pro chemiluminiscenční detekci byl použit kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) obsahující dva reakční roztoky peroxide solution a luminol enhancer solution, které byly pro použití smíchány v poměru 1:1 a pipetou nanoseny na membránu. Chemiluminiscenční signál na membráně byl detekován scannerem Li-Cor a vizualizován pomocí PC programu Image Studio Software.

3.2.5 Expresse antimikrobiálních peptidů metodou qPCR

Sledování změn exprese antimikrobiálních peptidů včel (*A. mellifera*) bylo provedeno metodou qPCR v reálném čase. Tato metoda zahrnuje reverzní transkripci izolované RNA do cDNA, která slouží jako templát pro řetězovou reakci. Detekce bylo docíleno pomocí fluorescenčního barviva SYBR Green. Expresse daných genů byla sledována jednak u larev, které byly infikovány spory bakterie *P. larvae*, ale také u dospělých imunizovaných včel.

3.2.5.1 Příprava vzorku

Z mrazáku byly vybrány larvy z 96-jamkových mikrotitračních destiček a po dvou jedincích pinzetou umístěny do mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky byly přidány skleněné kuličky a 150 μl GITC pufru. Následovala homogenizace v kuličkovém mlýnku ($6,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), po které bylo přidáno dalších 150 μl GITC pufru a homogenizace se zopakovala. Mikrozkušavky byly centrifugovány po dobu 5 minut, $16000 \times g$.

3.2.5.2 Izolace a přečištění izolované RNA z larev

Izolace RNA byla provedena pomocí RNA plant mini easy kitu Qiagen. Po centrifugaci v kroku 3.2.5.1 bylo odebráno 100 μl supernatantu ze vzorku a smícháno s 350 μl RLT pufru (tento roztok byl připraven smícháním MeSH a RLT komerčního pufru z kitu v poměru 1:100), celý objem byl po promíchání nanesen na fialovou kolonku a následovalo stočení v centrifuze ($16000 \times g$, 2 minuty). K supernatantu (objem cca 425 μl), který byl přepipetován do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 225 μl 96% ethanolu. Po promíchání byla směs nanesená na růžovou kolonku a centrifugována po dobu 2 minut, $8000 \times g$. Následovalo promývání kolonky, nejprve bylo napipetováno 700 μl RW1 pufru, dále byla kolonka 2 \times promyta 500 μl RPE pufru, po každém promytí byly kolonky umístěné v mikrozkušavkách centrifugovány ($8000 \times g$, 30 sekund). Pro dokonalé odstranění pufru z vnitřních hran byla kolonka přenesena do 2ml tzv. collection tube a 2 \times stočena po dobu 2 minut na $16000 \times g$. Posledním krokem byla eluce RNA z kolonky do 95 μl H_2O . Pro lepší eluci byla voda na kolonku nanesená a ponechána po dobu 10 minut. Nakonec následovalo stočení na centrifuze při otáčkách $8000 \times g$, 30 sekund. Dále byla pomocí spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader, BioTek) změřena koncentrace a kvalita získané RNA ze vzorku při vlnové délce 260 a 280 nm, kdy byly na destičku Take3TM Multi – Volume Plate (BioTek) naneseny 2 μl vzorku nebo RNase free vody jako blanku. Pro posouzení kvality/čistoty RNA lze usuzovat dle podílu spektrofotometricky získaných hodnot $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$.

3.2.5.3 Přečištění vzorku DNAsou

K veškeré izolované RNA (asi 90 μl) bylo přidáno 10 μl Turbo DNAsového pufru a 1 μl enzymu DNAsa (ThermoFisher Scientific). Směs byla inkubována po dobu

30 minut při 37 °C. Poté byl znovu přidán 1 µl enzymu a následovala totožná inkubace, po které byly vzorky umístěny na led.

3.2.5.4 Purifikace RNA

K přečištěnému vzorku bylo přidáno 50 µl magnetických kuliček a 40 µl isopropanolu. Po důkladném promíchání byla směs inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Kvůli kapacitě kuliček byla před tímto krokem RNA naředěna na maximální povolenou koncentraci 260 ng·µl⁻¹, tato koncentrace byla zjištěna v kroku 3.2.5.2. Samotné přečištění probíhalo v magnetickém stojánku, kdy byl vzorek 3× promýván 200 µl RNase free 70% ethanolem. Po promývání byl ethanol odpipetován a mikrozkušavky byly umístěny pro vysušení do flow boxu (10 minut). Pro eluci RNA z kuliček bylo použito 32 µl RNase free vody. Po promíchání vody s kuličkami byla směs inkubována po dobu 10 minut a po usazení kuliček byl supernatant odpipetován do nové čisté sterilní 0,5ml mikrozkušavky a opět byla změřena koncentrace a kvalita RNA (viz krok 3.2.5.2).

3.2.5.5 Kontrola integrity RNA

Integrita získané RNA byla ověřena separací získaných produktů pomocí agarosové elektroforézy. Pro tuto kontrolu byl připraven 1,1% w/v agarosový gel, na jehož přípravu byl použit 1× TAE pufr a pro vizualizaci byl použit GelRed (2,5 µl barviva v 50 ml pufru). Izolovaná a přečištěná RNA byla v objemu 6 µl smíchána s 1 µl loading dye. Poté bylo 6 µl této směsi nanášeno na ztuhlý gel. Pro kontrolu byly na gel nanášeny 3 µl standardu (HyperLadderTM 50bp; Bioline). Délka elektroforézy byla 60 minut při napětí 80 V.

3.2.5.6 Reverzní transkripce izolované a přečištěné RNA do cDNA

Pro tento krok kvantitativní PCR byl použit kit Transcriptor High Fidelity (Roche), pro jehož využití bylo nutné, aby koncentrace purifikované RNA byla maximálně 390 ng·µl⁻¹, což je horní hranice použité transkriptasy. Proto vzorky převyšující tuto kapacitu byly naředěny na danou koncentraci RNase free vodou. Proces transkripce se následně skládal ze dvou fází. První fáze zahrnovala napipetování (smíchání) 1 µl oligo dT primerů a 10,4 µl RNA do tzv. stripů, po stočení na příruční centrifuze byla směs v termocykleru inkubována po dobu 10 minut při teplotě 65 °C. Pro druhou fázi byly ke směsi připipetovány reagenty shrnuté v Tab. 7. I v této fázi byly stripy stočeny na příruční centrifuze a umístěny do termocykleru, kde byly nastaveny optimální

podmínky pro reakci, tedy zahřívání směsi na 55 °C po dobu 30 minut, kterému následovalo po dobu 5 minut inaktivování při teplotě 86 °C. Poté mohla být získaná cDNA zamrazena na teplotu -20 °C. Po dokončení přepisu, jehož celkový reakční objem byl 20 µl, byla cDNA 5× ředěna PCR vodou na finální objem 100 µl. V tomto kroku byl připraven také kontrolní vzorek pro přepis (tzv. no template control – NTC), který místo cDNA obsahoval pouze RNase free vodu.

3.2.5.7 Kontrola přepisu (tzv. endpoint) PCR reakce

Ověření přepisu RNA do cDNA bylo provedeno pomocí Go Taq polymerase Green Master Mixu. Pro tuto reakci byl připraven premix, obsahující reagentie shrnuty v Tab. 8. Pro každou reakci bylo přidáno 0,5 µl 5× ředěné cDNA. Na termocykleru byly nastaveny parametry, které jsou uvedeny v Tab. 9. Po ukončení cyklu byly vzorky nanесeny na agarosovou elektroforézu. V tomto případě byl připraven 3% agarosový gel, ostatní podmínky i chemikálie pro přípravu a průběh elektroforézy byly shodné s podmínkami v kroku 3.2.5.5.

Tab. 7: Reagentie a jejich příslušené objemy využitě pro druhou fázi reverzní transkripce získané RNA do cDNA.

| Název reagentií | Použitý objem (µl) |
|---|--------------------|
| Transcriptor High Fidelity RT Reaction Buffer, 5× koncentrovaný | 4 |
| (20U) Protector RNase Inhibitor | 0,5 |
| Deoxyribonucleotide mix | 2 |
| DTT | 1 |
| Reverse Transcriptase | 1,1 |

Tab. 8: Reagentie obsaženy v premixu, který je užíván pro tzv. endpoint PCR reakce. Dané hodnoty jsou uvedeny pro 1 reakci, pro více reakcí je tyto hodnoty nutno přepočítat.

| Reagentie v premixu | Objem pro 1 reakci (µl) |
|---|-------------------------|
| PCR H ₂ O | 4,75 |
| 10mmol·l ⁻¹ F primer (HKG – <i>EF1α-F2</i>) | 0,5 |
| 10mmol·l ⁻¹ R primer (HKG – <i>EF1α-F2</i>) | 0,5 |
| GoTaq polymerase premix | 6,25 |

Tab. 9: Parametry pro nastavení podmínek v termocykleru během real-time PCR.

| Teplota (°C) | Čas | Počet cyklů |
|--------------|-------|-------------|
| 95 | 2 min | 1 |
| 95 | 40 s | 34 |
| 60 | 30 s | 34 |
| 72 | 1 min | 34 |
| 72 | 5 min | 1 |
| 4 | ∞ | ∞ |

3.2.5.8 Sjednocení koncentrace cDNA na stejnou hodnotu $C_T = 20$ pro provozní gen

V prvním kroku měření exprese genů bylo provedeno qPCR cílené na zjištění C_T hodnoty provozního genu *EF1 α -F2*. K tomuto provedení byl použit premix, obsahující reagentie shrnuté v Tab. 10. Po smíchání bylo na 96-jamkovou destičku napipetováno pro každou reakci vždy 1,6 μ l cDNA a 3,4 μ l premixu. Po stočení byla destička vložena do termocyklu, parametry jsou uvedeny v Tab. 11 (krok 3.2.5.10). Pro sjednocení koncentrace cDNA pipetované do qPCR u všech měřených vzorků byla cDNA vzorků naředěna na hodnotu $C_T = 20$ pro HKG *EF1 α -F2*. cDNA, jejíž hodnoty byly nižší než $C_T = 20$, byla naředěna PCR vodou na objem 50 μ l dle ředění zjištěného ze vzorce: $2^{20 - \text{naměřená hodnota}}$.

3.2.5.9 Účinnost použitých primerů

Před kvantifikací genové exprese bylo nutno zjistit účinnost jednotlivých primerů. Proto byla připravena směsná cDNA, z níž byla přichystána kalibrační řada obsahující pro každý primer 11 kalibračních bodů, kdy každý následující bod (směs cDNA) byl pomocí PCR vody ředěn 2 \times . Po naředění byl přichystán premix obsahující jednotlivé složky uvedeny v Tab. 10 (krok 3.2.5.10). Premix (3,4 μ l pro jednu reakci) byl s 1,6 μ l cDNA na 1 reakci napipetován na destičku. Po jejím stočení a vložení do termocyklu byly na přístroji nastaveny parametry uvedeny v Tab. 11 (krok 3.2.5.10). Měření bylo provedeno v technických duplikátech. Hodnoty účinností PCR reakce s daným primerem byly vyhodnoceny přímo v softwaru přístroje (CFX Maestro, Bio-Rad).

3.2.5.10 Kvantifikace relativní genové exprese antimikrobiálních peptidů *A. mellifera*

Pro samotnou kvantifikaci genové exprese metodou qPCR byla jako templát použita v objemu 1,6 μ l cDNA (upravena naředěním viz krok 3.2.2.8), jako kontrola byla použita směs jednotlivých neředěných cDNA (tzv. kalibrátor) a také jako kontrola NTC sloužila PCR voda. Dále byly pro reakci použity primery jak pro HKG (*Arp1*, *EF1 α -F2*), tak pro GOI (*LOC406144*, *Apid1*, *def1*, *hymenoptaecin*). Celkový objem jedné reakce byl 5 μ l, jednotlivé složky jsou uvedeny v Tab. 10. Každá reakce probíhala ve dvou technických replikátech na 96-jamkových destičkách určených pro qPCR. Na termocyklu, v němž reakce probíhala, byly nastaveny parametry uvedeny v Tab. 11.

Tab. 10: Složky premixu použitého pro qPCR. Dané hodnoty jsou uvedeny pro 1 reakci, pro více reakcí je tyto hodnoty nutno přepočítat.

| Reagencie v premixu | Objem pro 1 reakci (μl) |
|----------------------------------|-------------------------|
| Syber Select Master Mix | 2,5 |
| 3,3mmol·l ⁻¹ F primer | 0,45 |
| 3,3mmol·l ⁻¹ R primer | 0,45 |

Tab. 11: Nastavení parametrů reakce pro zjištění C_T hodnot, účinnost daných primerů a samotnou qPCR reakci.

| Teplota (°C) | Čas | Počet cyklů |
|-------------------------|-----|-------------|
| 95 | 10 | 1 |
| 95 | 15 | 34 |
| 60 | 1 | 34 |
| 60-95,5 interval 0,5 | 10 | |
| 4 | ∞ | ∞ |

3.2.6 Použité statistické metody a programy

Fotografie membrán a gelů byly pořízeny pomocí zařízení Gel Doc EZ Imager System (Bio-Rad) a denzita bandů na membránách vyhodnocena programem ImageJ.

Koncentrace proteinů a také nukleových kyselin byly zjištěny pomocí multifunkčního readeru Synergy H1 a programu Gene 5 (3.03).

Data exprese genů získána qPCR, která byla vyhodnocena softwarem Bio-Rad CFX Manager (z tohoto programu jsou vygenerovány také grafy účinností primerů), byla dále zpracována pomocí Excelu (2010) a statisticky vyhodnocena programem TIBCO StatisticaTM. Jelikož bylo pomocí histogramu a následným Kolmogorov-Smirnov testem a Shapiro-Wilk testem zjištěno nenormální rozložení dat, bylo statistické hodnocení hypotéz na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ testováno neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem. Data byla poté vizualizována krabicovými grafy (Box-plot).

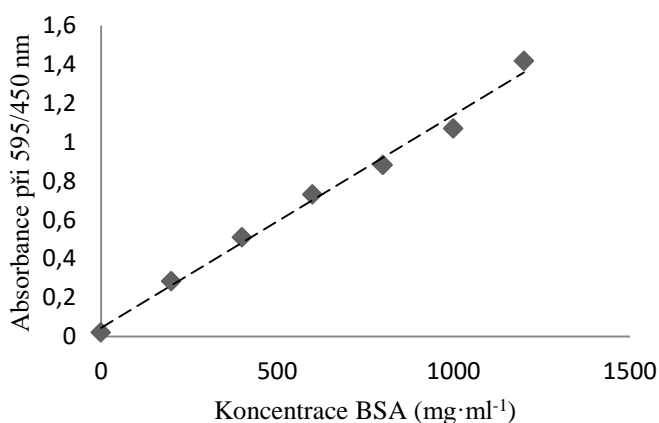
Pro menší počet dat byl k vizualizaci použit graf scatterplot, taktéž v programu TIBCO StatisticaTM.

4 Výsledky

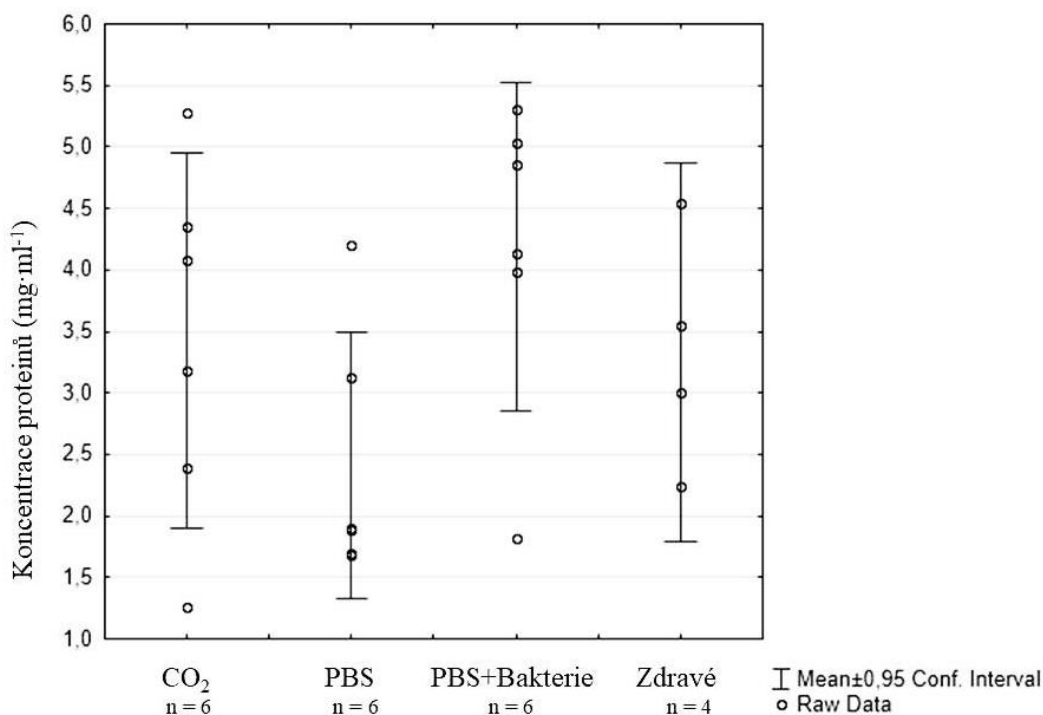
4.1 Koncentrace proteinů ve vzorcích imunizovaných včel (*A. mellifera*)

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích byla připravena vzestupná kalibrační řada roztoků BSA v rozmezí 0 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, podle které byla v programu Excel sestrojena kalibrační přímka (Obr. 11). Metodou dle Bradforda (1976) byly zjištěny absorbance ve vzorcích. Měření bylo prováděno ve dvou vlnových délkách 595 nm a 450 nm, aby bylo při vyhodnocení možné provést tzv. linearizaci. To znamená, že absorbance jak pro kalibraci, tak pro jednotlivé vzorky, byla počítána z poměru 595/450, tedy hodnot absorbancí zjištěných při vlnové délce 595 proti blanku a absorbancí zjištěných při vlnové délce 450 (Ernst a Zor, 2010). Z rovnice získané přímkou $y = 0,0011x + 0,0447$ bylo dosazením zjištěné absorbance za y dále možné zjistit koncentraci v jednotlivých vzorcích. Pro každé měření byly vzorky i blank pipetovány v technických triplikátech.

Vzorky pro zjištění koncentrací byly homogenáty zadečků imunizovaných včel (CO_2 , PBS, PBS + Bakterie), které byly připraveny extrakcí v 0,1% TFA a nakonec lyofilizovány (viz krok 3.2.2, extrakce A). Koncentrace celkových proteinů byly stanovovány z důvodu optimalizace Western blottingu, tedy kvůli nanášení vždy stejného množství (koncentrace) proteinů na jamku gelu pro elektroforézu. Jelikož takto připravených vzorků bylo pro každou experimentální skupinu zpracováno jen několik, byl pro grafické vyhodnocení celkových proteinů použit scatterplot (Obr. 12).



Obr. 11: Graf kalibrační linearizované přímky sestrojené z roztoku BSA o koncentracích 0 – 1,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnota korelačního koeficientu $R^2 = 0,9909$, rovnice kalibrační přímky $y = 0,0011x + 0,0447$.

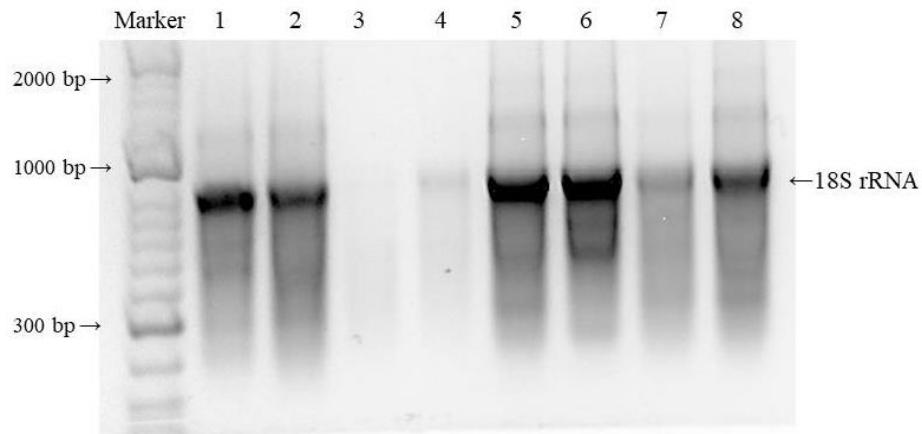


Obr. 12: Koncentrace celkových proteinů (mg·ml⁻¹) v homogenátech včel z jednotlivých imunizovaných skupin.

Hodnoty koncentrací proteinů ve vzorcích homogenátů zadeček včel, u kterých byl vyjmut trávicí trakt, nebyly napříč experimentálními skupinami signifikantně odlišné (Obr. 12). U včel pouze narkotizovaných CO₂ se hodnoty pohybovaly mezi 1,25 a 1,58 mg·ml⁻¹. U včel narkotizovaných CO₂ a imunizovaných roztokem PBS byly hodnoty celkových proteinů od 1,69 do 4,20 mg·ml⁻¹ a u včel imunizovaných navíc suspenzí bakterií byly koncentrace v rozmezí hodnot 1,82 – 5,25 mg·ml⁻¹. Klinicky zdravé včely disponovaly proteiny v rozmezí koncentrací 2,18 – 4,52 mg·ml⁻¹.

4.2 Kontrola integrity přečištěné RNA

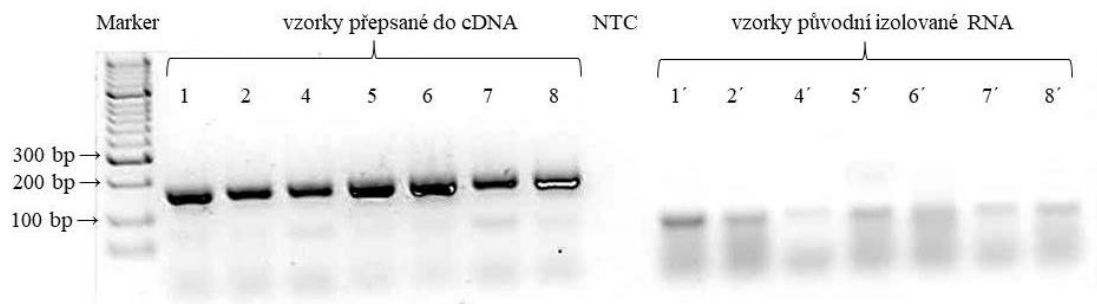
Izolovaná RNA byla po izolaci několikrát přečištěna využitím enzymu DNAsy a následně magnetických kuliček ve směsi s isopropanolem. V takto upravených vzorcích byly měřeny pomocí mikroobjemového spektrofotometru koncentrace při vlnových délkách 260 a 280 nm. Z jejich poměru $A_{260/280}$ byla ověřena čistota, která se u vzorků (n = 39) pohybovala v rozmezí hodnot 1,96 – 2,18. Poté byla zjištěna a u většiny vzorků (n = 36) potvrzena integrita jednotlivých izolovaných a přečištěných RNA pomocí agarosové elektroforézy, kdy byl na gelu detekován band odpovídající 18S rRNA (Obr. 13). U některých vzorků obsahujících izolovanou RNA však k detekci produktů nedošlo, integrita tak ověřena nebyla a vzorek se dále nepoužíval (př. vzorek 3 viz Obr. 13).



Obr. 13: Kontrola integrity izolované, přečištěné RNA na 1,1% agarosovém gelu. Integrita byla u většiny vzorků ověřena tvorbou bandu 18S rRNA. Pro posouzení velikosti produktů byl na gel nanesen marker o velikosti 50-2000 bp. Vzorky (každý ze dvou larev): 1 – 15 spor ($579,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 2 – 15 spor ($529,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 3 – 15 spor ($28,7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 4 – 15 spor ($50,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 5 – 15 spor ($656,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 6 – 150 spor ($629,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 7 – 150 spor ($160,8 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 8 – 150 spor ($476,9 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

4.3 Kontrola přepisu z RNA do cDNA

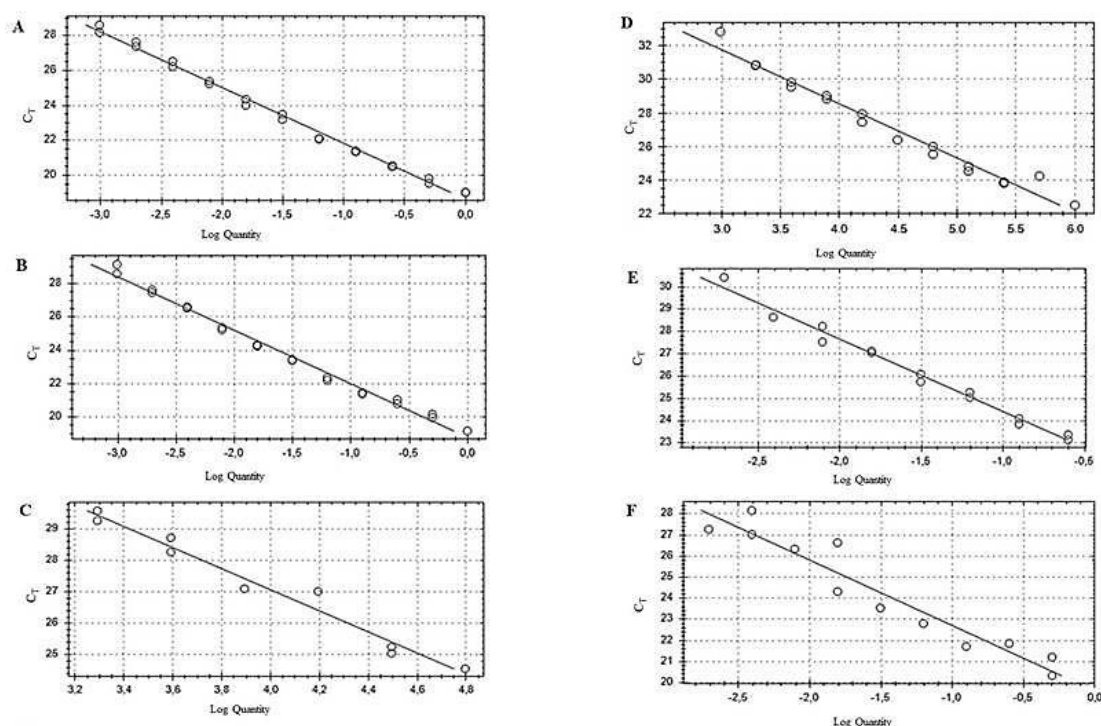
Vzorky RNA s ověřenou integritou (viz Obr. 13) byly dále přepsány procesem reverzní transkripce do cDNA. Účinnost přepisu byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy v 3% gelu, kdy byla sledována přítomnost produktu odpovídajícího primeru EF-1- α , který byl pro tento krok použit (Obr. 14). Velikost ampliconu je 153 bp.



Obr. 14: Kontrolní bod přepisu (tzv. endpoint) pomocí PCR izolované RNA do cDNA za použití primeru EF-1- α . Pro posouzení velikosti produktů byl na gel nanesen marker o velikosti 50-2000 bp. Vzorky s označením 1 – 8 : cDNA, u níž vznikl PCR produkt odpovídající velikosti 153 bp. NTC – kontrola, která v reakční směsi neobsahovala izolovanou RNA ani cDNA. Vzorky s označením 1' - 8': vzorky původní izolované RNA před přepisem odpovídající čísla správně přepsaným cDNA vzorkům.

4.4 Účinnost použitých primerů

Správná funkce použitých primerů pro aktin, EF-1- α , abaecin, apidaecin, defensin-1 a hymenoptaecin byla ověřena pomocí směšného vzorku izolované cDNA. Srovnáním křivek tání (Obr. 15) vygenerovaných nástrojem Bio-Rad CFX Manager byla zjištěna účinnost primerů (%), sklon daných křivek a korelační koeficient. Z hodnot sklonu byla dále počítána účinnost každého primeru (Tab. 12), jejíž hodnota sloužila k výpočtu kvantifikace relativní exprese daných genů. Dle získaných výsledků byly všechny testované primery určeny pro další využití při práci.



Obr. 15: Kalibrační křivky pro výpočet účinnosti použitých primerů. A – kalibrační křivka primeru apidaecinu; $R^2 = 0,994$; sklon = -3,189. B – kalibrační křivka primeru abaecinu; $R^2 = 0,990$; sklon = -3,205. C – kalibrační křivka primeru hymenoptaecinu; $R^2 = 0,972$; sklon = -3,352. D – kalibrační křivka primeru defensinu-1; $R^2 = 0,975$; sklon = -3,239. E – kalibrační křivka primeru aktinu; $R^2 = 0,985$; sklon = -3,248. F – kalibrační křivka primeru EF-1- α ; $R^2 = 0,920$; sklon = -3,103.

Tab. 12: Účinnost primerů vygenerovaná softwarem (%) a vypočítaná účinnost při použití primerů pro dané geny.

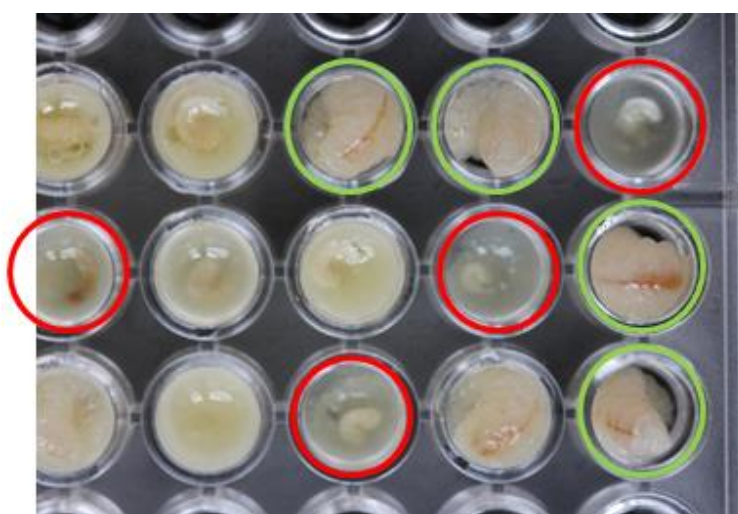
| Primer | Účinnost (%) | Účinnost pro výpočet relativní exprese |
|----------------|--------------|--|
| Actin | 103,2 | 2,0138 |
| EF-1- α | 110,0 | 2,1002 |
| Abaecin | 105,1 | 2,0512 |
| Apidaecin | 105,8 | 2,0586 |
| Hymenoptaecin | 98,7 | 1,9876 |
| Defensin-1 | 103,6 | 2,0358 |

4.5 Relativní kvantifikace exprese genů pro antimikrobiální peptidy u infikovaných larev včel (*A. mellifera*)

Larvy krmeny spori *P. larvae*, zamrazené od roku 2012 v mikrotitračních destičkách (Obr. 16), byly po rozmrazení roztríděny dle experimentálních skupin (kontrola, larvy krmené 15, 150 a 1800 spori) na živé a mrtvé (Tab. 13). Přepsaná cDNA z izolované RNA larev, kdy se každý vzorek sestával ze dvou živých, řádně vyvinutých a stejně ošetřených jedinců, byla nejprve nařaděna na hodnotu $C_T = 20$ pro HKG *EF1 α -F2*. Takto upravená cDNA sloužila pro sledování změn exprese genů kódujících peptidy Aba, Api, Hymn a Def-1. Ve vzorcích byla sledována také exprese dvou provozních genů *Arp1* (actin related protein) a *EF1 α -F2* (elongační faktor).

Získané hodnoty C_T provozních genů *Arp1* a *EF1 α -F2* u všech 36 vzorků byly porovnány a ověřeny pomocí nástroje BestKeeper[®] (Pfaffl *et al.*, 2004). Korelační koeficient C_T hodnot HKG *Arp1* byl velmi nízký $R^2 = 0,488$, a proto pro vyhodnocení relativní kvantifikace exprese genů použit nebyl. Jeho exprese nebyla u včelích larev stabilní, tudíž jej u těchto jedinců nelze považovat za provozní gen. Výsledky expresí jednotlivých GOI byly z těchto důvodů vztaženy pouze na hodnotu HKG *EF1 α -F2*. To znamená, že pro každý gen zájmu kódující peptidy (Aba, Api, Hymn a Def-1) v každém vzorku ($n = 36$) byl spočítán podíl účinnosti HKG umocněné na příslušné C_T vzorku a účinnosti GOI umocněné na příslušné C_T stejného vzorku (vzorec:

$$\frac{\text{účinnost (HKG)}^{C_T}}{\text{účinnost (GOI)}^{C_T}}.$$



Obr. 16: Včelí larvy v jamkách mikrotitrační destičky krmené mateří kašičkou. Zeleně jsou označeny příklady dobře vyvinutých larev, které byly pro experiment použity a ze kterých byla izolována RNA pro sledování exprese genů pro dané peptidy. Červeně jsou označeny mrtvé, či nevyvinuté larvy (fotografie použita se svolením Mgr. Jiřího Danihlíka Ph.D).

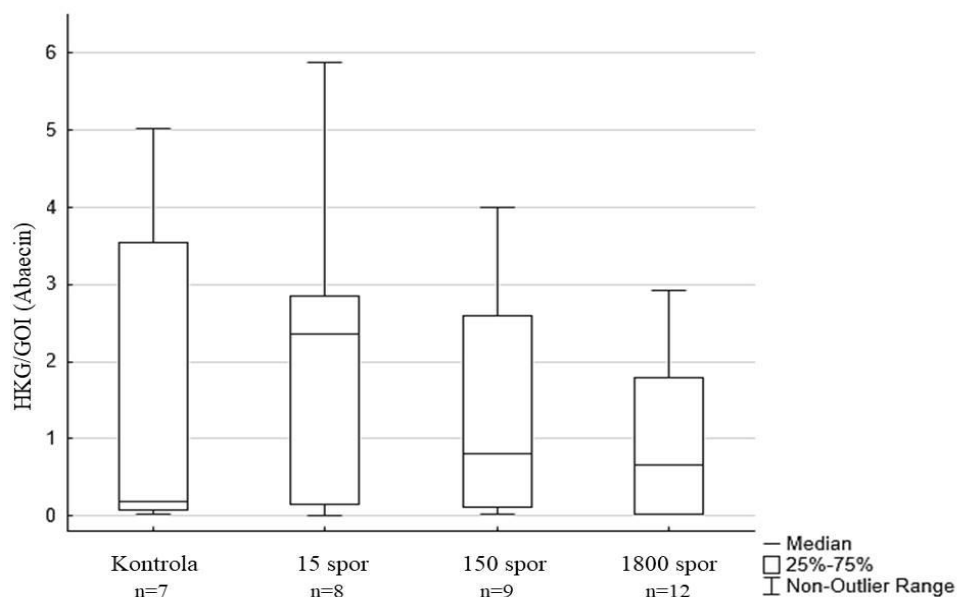
Tab. 13: Celkový počet živých a mrtvých larev rozdělených dle experimentálních podmínek různě krmených larev.

| Označení experimentální skupiny | Živé | Mrtvé |
|---------------------------------|------|-------|
| Kontrola | 25 | 47 |
| 15 spor <i>P. larvae</i> | 18 | 54 |
| 150 spor <i>P. larvae</i> | 20 | 52 |
| 1800 spor <i>P. larvae</i> | 24 | 48 |

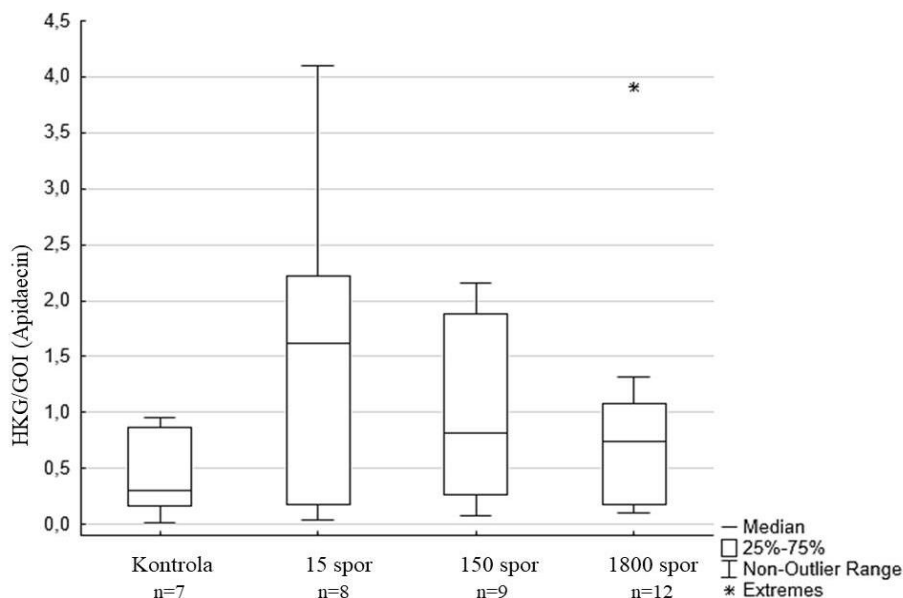
Výsledky relativní kvantifikace genové exprese genů antimikrobiálních peptidů abaecinu, apidaecinu, hymenoptaecinu a defensinu-1 byly vizualizovány s využitím krabicových grafů, dle poměrů HKG/GOI jednotlivých genů vztažených k experimentálním skupinám (Obr. 17 – 20). Jelikož data nebyla normálně distribuována (Shapiro-Wilk test, $p < 0,001$), byla porovnána neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

Na základě zjištěné hladiny významnosti nebyl v expresi peptidu abaecinu mezi infikovanými skupinami prokázán statisticky významný rozdíl (Kruskal-Wallis, $p = 0,725$). Největší exprese byla pozorována u larev krmených mateří kašičkou obsahující 15 spor, nejnižší exprese byla naopak u larev infikovaných 1800 sporami bakterie *P. larvae* (Obr. 17).

Mezi mediány relativní genové exprese peptidu apidaecinu (Obr. 18) v rámci experimentálních skupin larev nebyly po statistickém porovnání pozorovány významné rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,455$). Stejně jako v případě relativní exprese abaecinu (Obr. 17) dosahovala exprese genu pro peptid apidaecin nejvyšších hodnot v případě larev krmených mateří kašičku obsahující 15 spor a nejnižší hladina byla pozorována u larev krmených kašičkou obsahující 1800 spor.



Obr. 17: Relativní genová exprese peptidu abaecinu u infikovaných larev včel (*A. mellifera*) sporami bakterie *P. larvae*. Mezi skupinami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,7252$).

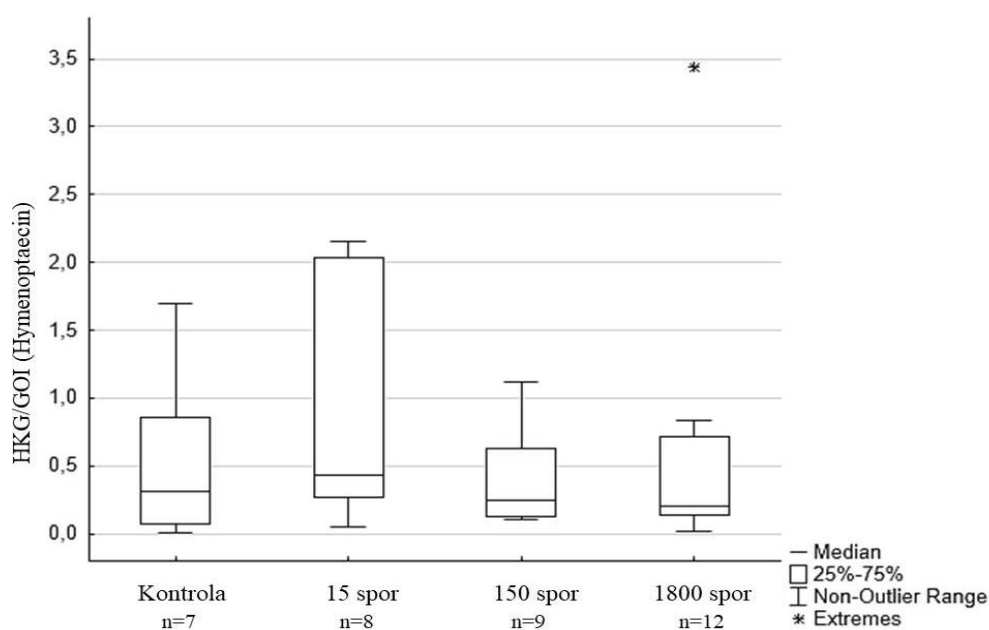


Obr. 18: Relativní genová exprese peptidu apidaecinu u infikovaných larev včel (*A. mellifera*) sporami bakterie *P. larvae*. Mezi skupinami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,4550$).

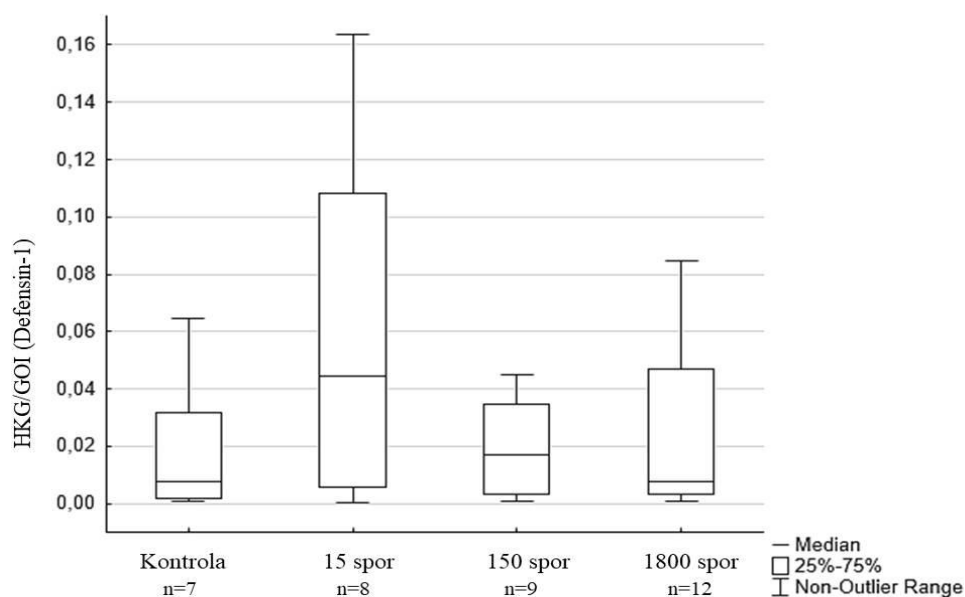
Mezi mediány relativní exprese genu kódujícího peptid hymenoptaecin (Obr. 19) nebyly napříč porovnávanými experimentálními skupinami pozorovány významné rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,4550$). I v tomto případě byl pozorován obdobný trend jako u předchozích dvou peptidů, nejvyšší hladiny exprese byly ve skupině larev

infikovaných 15 sporamai *P. larvae* a nejnižší naopak u larev kontaminovaných nejvyšším počtem spor. Ve srovnání s relativní expresí genů pro abaecin (Obr. 17) a apidaecin (Obr. 18) byla exprese hymenoptaecinu 2× nižší.

Vůbec nejnižší úroveň (téměř nulová) relativní genové exprese byla pozorována u defensinu-1 (Obr. 20). Ani v tomto případě nebyly mezi mediány porovnávaných skupin pozorovány statisticky významné rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,5016$). Nejvyšší expresi genů pro defensin-1 vykazovaly larvy krmény kašičkou obsahující 15 spor.



Obr. 19: Relativní genová exprese peptidu hymenoptaecinu u infikovaných larev včel (*A. mellifera*) sporamai bakterie *P. larvae*. Mezi skupinami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,7259$).



Obr. 20: Relativní genová exprese peptidu defensinu-1 u infikovaných larev včel (*A. mellifera*) sporami bakterie *P. larvae*. Mezi skupinami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p = 0,5016$).

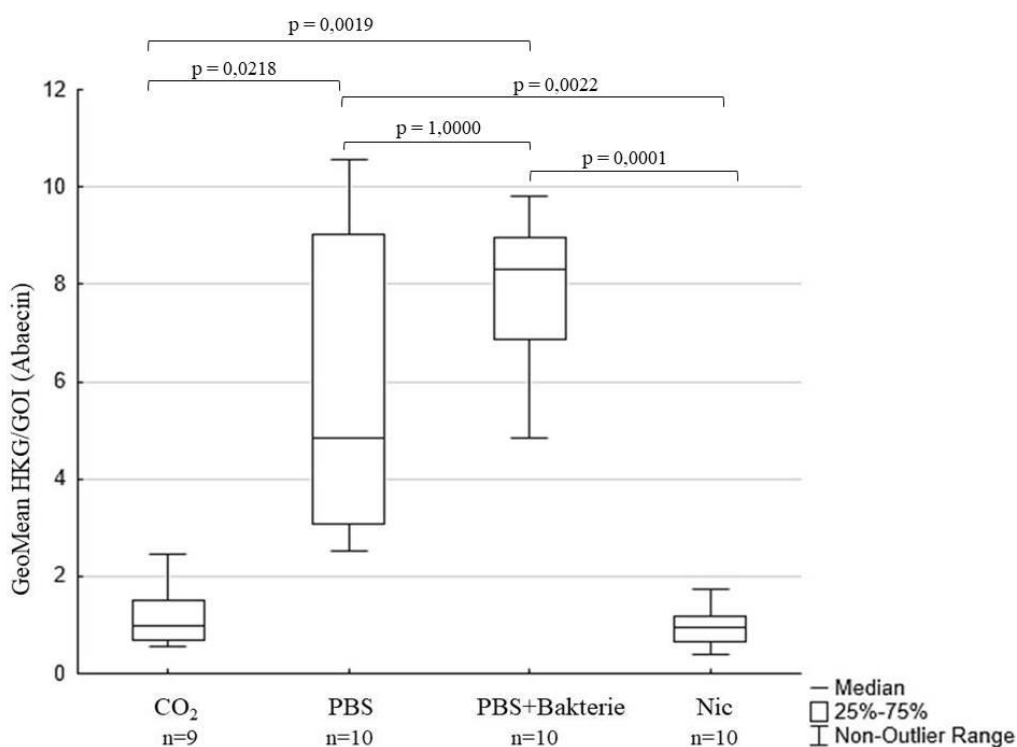
4.6 Relativní kvantifikace exprese genů pro antimikrobiální peptidy u imunizovaných dospělých včel (*A. mellifera*)

Relativní kvantifikace exprese genů pro AmP, konkrétně pro abaecin, apidaecin, hymenoptaecin a defensin-1, byla stanovena u dospělých jedinců včel (*A. mellifera*) v zadečkové tkáni, kde se nachází hlavní biosyntetický orgán tukové těleso. V 10. dni života byly včely posbírány, imunizovány a rozděleny do 4 experimentálních skupin (CO₂, PBS, PBS + Bakterie, kontrola; viz biologický materiál). Vzorky, kdy se každý sestával z 10 zadečků včel, byly dodány vedoucím Dr. Danihlíkem již zpracovány (izolace, přečištění RNA, prepis do cDNA) a naředěny na hodnotu $C_T = 20$ pro HKG *EF1 α -F2*. Ve vzorcích byly dále metodou qPCR měřeny hodnoty C_T pro provozní geny *Arp1* a také *EF1 α -F2*. U všech 39 vzorků byly hodnoty pro tyto dva HKG porovnány a ověřeny aplikací BestKeeper[®] (Pfaffl *et al.*, 2004). Pro vyhodnocení relativní kvantifikace exprese byl každý gen (GOI), tedy jeho účinnost umocněna na hodnotu C_T vztažena na oba zjištěné HKG. Pro vynesení výsledků do krabicových grafů byl tedy vypočítán geometrický průměr relativní exprese dle vzorce:
$$\sqrt{\frac{\text{účinnost (HKG)}_1^{C_T}}{\text{účinnost (GOI)}^{C_T}} \times \frac{\text{účinnost (HKG)}_2^{C_T}}{\text{účinnost (GOI)}^{C_T}}}$$

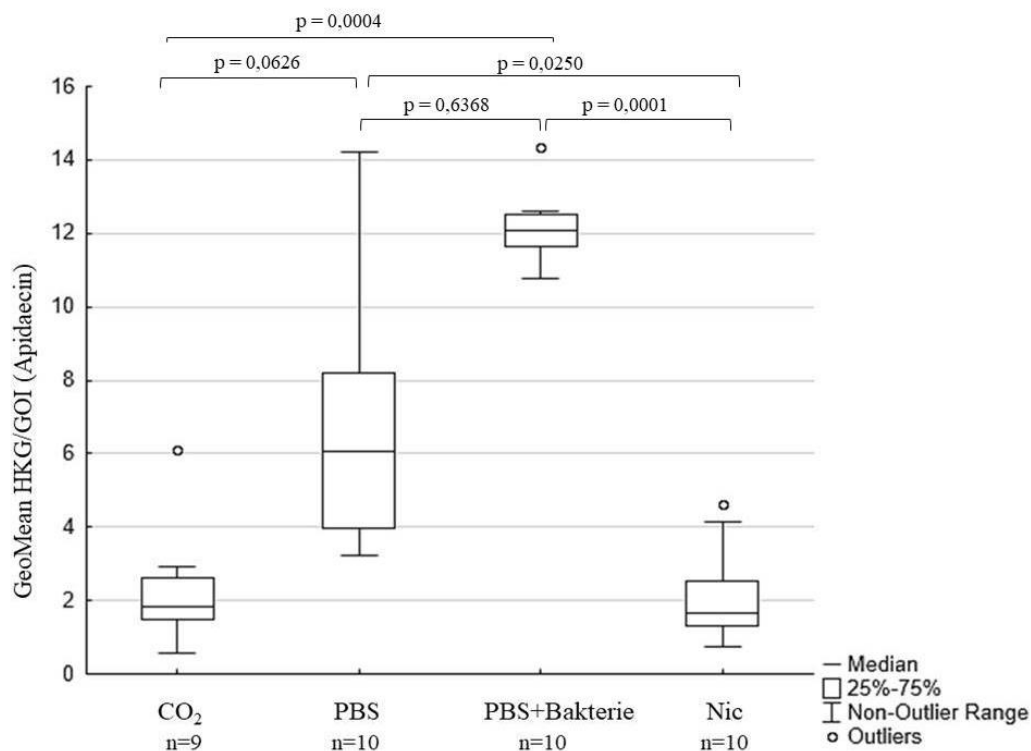
Pro vyhodnocení byla porovnávána relativní kvantifikace exprese daného genu mezi 4 testovanými experimentálními skupinami (Obr. 21 – 24). V některých případech se mediány srovnávaných skupin statisticky liší, a proto jsou v grafech uvedeny zjištěné

hodnoty p, které byly porovnávány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Kruskal-Wallis). Jelikož se ani v jednom případě od sebe statisticky významně nelišily úrovně exprese GOI ($p > 0,05$) mezi skupinou CO₂ a kontrolní skupinou, nejsou pro jejich porovnání hodnoty p v grafech uvedeny (Obr. 21 – 24).

Mediány relativní exprese genu pro peptid abaecin (Obr. 21) byly při celkovém porovnání statisticky významné (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Výrazné odlišnosti nebyly s výjimkou CO₂ a kontrolní skupiny pozorovány také mezi včelami, do kterých bylo injektováno PBS a skupinou, u které bylo PBS obohaceno o suspenzi bakterií. U těchto dvou skupin byla také oproti skupině kontrolní a CO₂ exprese peptidu abaecinu významně vyšší.



Obr. 21: Relativní genová exprese peptidu abaecinu u imunizovaných dospělých včel (*A. mellifera*). Mezi experimentálními skupinami byly pozorovány signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).



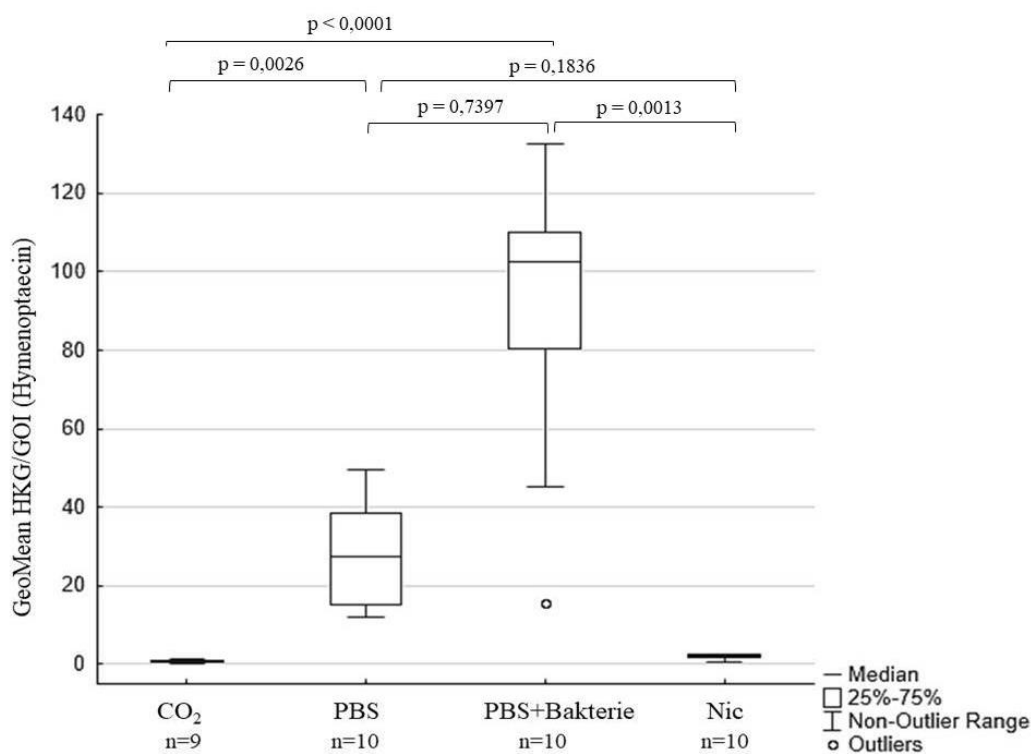
Obr. 22: Relativní genová exprese peptidu apidaecinu u imunizovaných dospělých včel (*A. mellifera*). Mezi experimentálními skupinami byly pozorovány signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).

V relativní expresi apidaecinu byly taktéž prokázány statisticky významné rozdíly (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) mezi porovnávanými imunizovanými skupinami včel (Obr. 22). Na základě vícenásobného porovnání lze tvrdit, že nejvýznamnější rozdíl v expresi apidaecinu byl mezi skupinou včel imunizovaných PBS se suspenzí bakterií oproti kontrolní skupině a také oproti skupině pouze narkotizované CO₂.

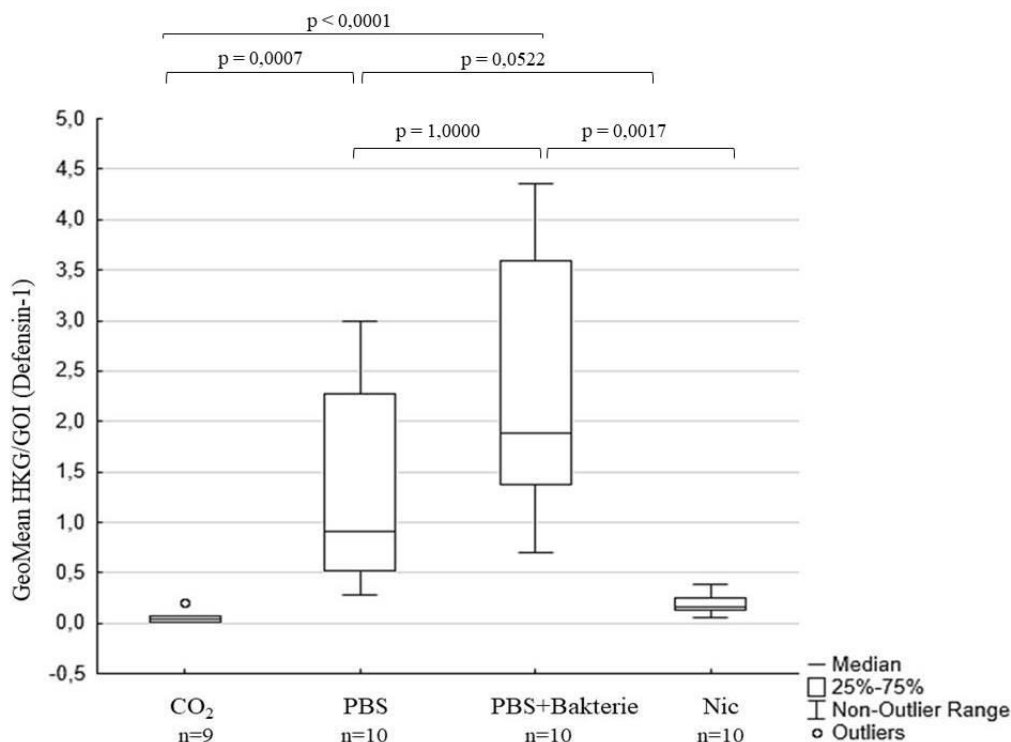
Vůbec nejvyšších hodnot relativní exprese oproti ostatním GOI (Obr. 21, 22, 24) bylo dosaženo v případě genu pro hymenoptaecin, konkrétně u experimentální skupiny včel imunizovaných roztokem PBS s přidavkem suspenze bakterií (Obr. 23). Zde byla relativní exprese genu až přibližně 120× vyšší oproti HKG, ke kterým byl GOI vztažen. Na základě významnosti dle Kruskal-Wallisova testu ($p < 0,05$) byly prokázány statisticky významné rozdíly u imunizovaných skupin včel. Dle vícenásobného porovnání bylo nejvýznamnějších rozdílů dosaženo mezi skupinou imunizovanou PBS s bakteriemi i bez bakterií a skupinou včel, které byly pouze narkotizovány plynem CO₂ (Obr. 23).

Naopak nejnižších hodnot relativní exprese oproti porovnávaným GOI dosáhl gen pro defensin-1 (Obr. 24). Zde byla exprese u včel imunizovaných PBS se suspenzí

bakterií pouze přibližně 3× vyšší oproti HKG, na které byl tento GOI vztažen. Také v tomto případě byly napříč skupinami významné odlišnosti (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) a byl zachován trend (jako u ostatních GOI viz Obr. 21 – 23), že se relativní exprese s náročností imunizace zvyšovala. Statisticky nejvýznamnější rozdíl po vícenásobném porovnání byl sledován mezi skupinou narkotizovanou CO₂ a skupinou imunizovanou PBS se suspenzí (Obr. 24).



Obr. 23: Relativní genová exprese peptidu hymenoptaecinu u imunizovaných dospělých včel (*A. mellifera*). Mezi experimentálními skupinami byly pozorovány signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).



Obr. 24: Relativní genová exprese peptidu defensinu-1 u imunizovaných dospělých včel (*A. mellifera*). Mezi experimentálními skupinami byly pozorovány signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).

4.7 Detekce peptidů metodou SDS-PAGE s následným Western blottingem

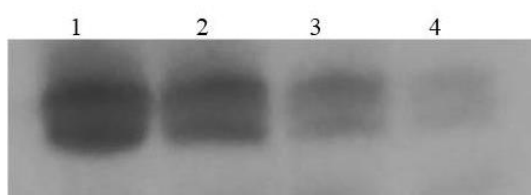
K detekci antimikrobiálních peptidů včely medonosné (*A. mellifera*) defensinu-1, abaecinu a hymenoptaecinu byla použita řada postupů zahrnujících nejen různé přístupy homogenizace dvou hlavních biologických matric (abdomenu a hemolymfy), ale také optimalizace jednotlivých kroků metody SDS-PAGE, při které dochází k dělení proteinů v gelu dle jejich molekulových hmotností a Western blottingu, cílem kterého je detekce konkrétního peptidu/proteinu na membráně. K vyladění detekce sloužily purifikované peptidy defensin-1 a abaecin, proti kterým byly připraveny primární protilátky a antigeny peptidů defensinu-1 (CRK), abaeciu (CFN) a hymenoptaecinu (CTK) vázané na BSA (vyrobena firmou Clonestar).

4.7.1 Optimalizace jednotlivých kroků Western blottingu

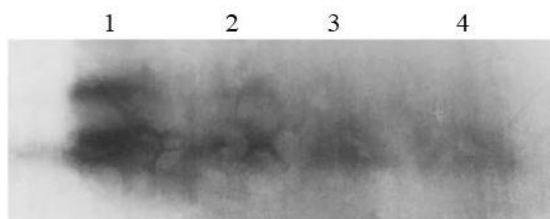
Nejprve bylo nutno optimalizovat počáteční krok celého procesu detekce, kterým je SDS-PAGE. Jelikož bylo cílem detekovat poměrně malé peptidy (Abaecin – 3,9 kDa, Defensin-1 – 5,5 kDa, Hymenoptaecin – 10,2 kDa), byla pro použití přednostně zvolena Tricinová modifikace elektroforézy (Schägger, 2006). Pro separaci a následnou detekci

byly s využitím peptidů kaplovaných na BSA testovány více zesítené gely, konkrétně 16% gel obsahující glycerol (Obr. 25) a 16% gel obsahující močovinu (Obr. 26). Ostřejší bandy byly po transferu na PVDF membránu pozorovány z 16% gelu obsahujícího glycerol. Funkčnost protilátek byla ověřena také prostřednictvím sekvencí aminokyselin, které byly navrženy jako vhodné epitopy pro vazbu protilátky na molekulu peptidu (Obr. 27).

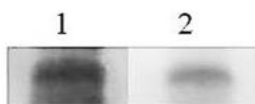
Jako blokační roztok byl používán 5% BSA v TBS pufru. Pro ředění sekundární protilátky se jako optimální a dostačující ukázal poměr 1:10000 s roztokem TBS obsahující detergent 0,1% Tween-20, inkubace probíhala hodinu při laboratorní teplotě. Při nižších ředění byly na membránách po kolorimetrické detekci alkalickou fosfatasou pozorovány nespecifické interakce, kdy docházelo např. k vizualizaci bandů standardu pro elektroforézu (Obr. 28). Taktéž bylo optimalizováno ředění sekundární protilátky pro chemiluminiscenční detekci, kdy se jako vhodný opět jevil poměr 1:10000 (Obr. 29). Při ředění 1:5000 byla pozorována přílišná intenzita bandů. Pro všechny primární protilátky bylo optimální ředění 1:500.



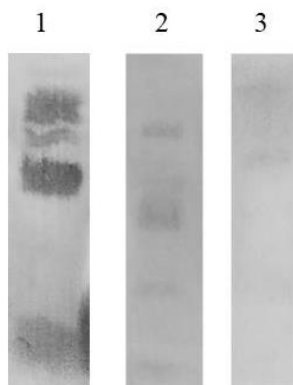
Obr. 25: Detekce abaecinu kaplovaného na BSA (ozn. CFN) po transferu z 16% Tricinového gelu obsahujícího glycerol na PVDF membráně. Vzorek 1 – 0,75 μg ; 2 – 0,375 μg ; 3 – 0,1 μg ; 4 – 0,05 μg .



Obr. 26: Detekce defensinu-1 kaplovaného na BSA (ozn. CRK) po transferu z 16% Tricinového gelu obsahujícího močovinu na PVDF membráně. Vzorek 1 – 0,75 μg ; 2 – 0,375 μg ; 3 – 0,1 μg ; 4 – 0,05 μg .



Obr. 27: Detekce purifikovaných peptidů 1 – defensinu-1 (1,5 µg), 2 – abaecinu (1,5 µg), které byly navrženy jako epitopy pro vazbu protilátky.



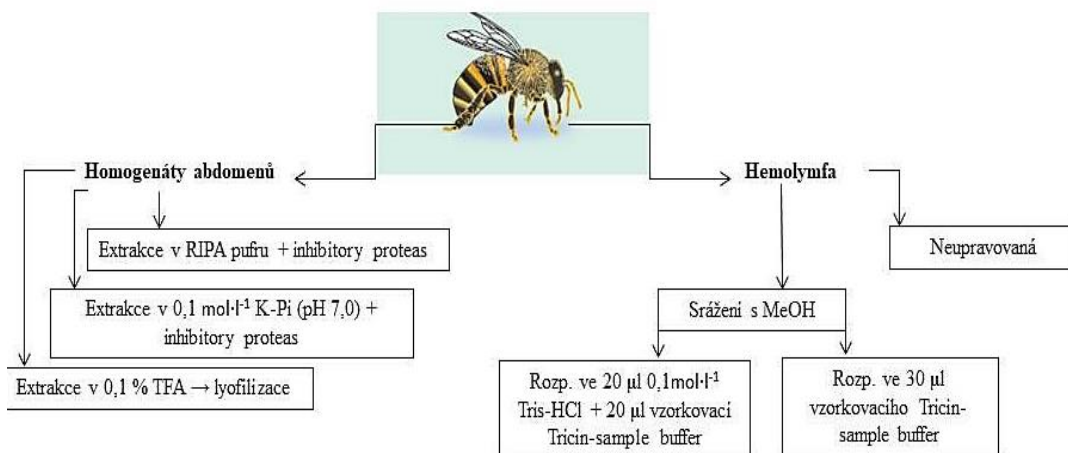
Obr. 28: Optimalizace ředění sekundární anti-králičí protilátky pro kolorimetrickou detekci alkalickou fosfatasou. Ředění protilátky 1 – 1:2500; 2 – 1:7500; 3 – 1:10000. Jako vzorek je na membránách zobrazen standard molekulových hmotností pro elektroforézu, na který by se protilátka vázat neměla.



Obr. 29: Optimalizace ředění sekundární anti-králičí protilátky pro chemiluminiscenční detekci alkalickou fosfatasou. Ředění protilátky A – 1:5000; B – 1:10000. Jako vzorek je na membránách zobrazen 1 – hymenoptaecin kaplovaný na BSA (2 ng); 2 – hymenoptaecin kaplovaný na BSA (1 ng).

4.7.2 Optimalizace detekce proteinů z biologického materiálu

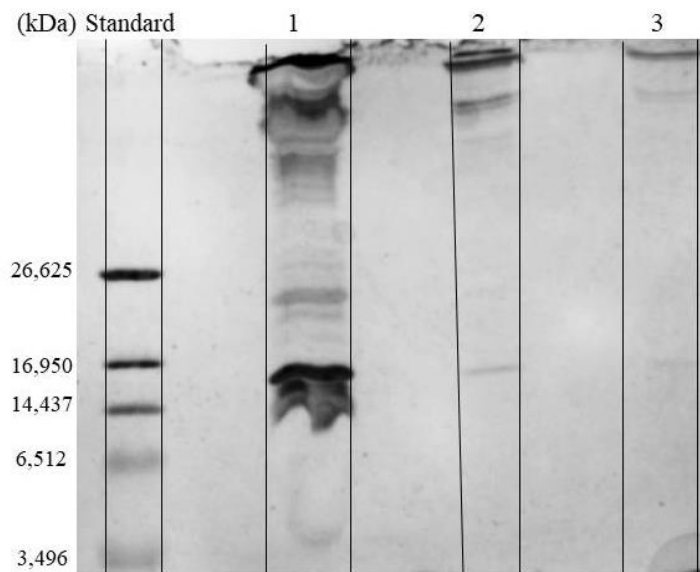
Pro detekci antimikrobiálních peptidů abaecinu, hymenoptaecinu a defensinu-1 byl zvolen jako výchozí materiál hemolymfa a abdomeny, tedy matrice s očekávaným výskytem těchto analytů. Obě matrice byly zpracovány různými postupy (Obr. 30, postupy jsou detailněji popsány v podkapitole 3.2.2) a nanášeny na gely. Abdomeny byly před každou homogenizací zbaveny trávicího traktu obsahující pozřený pyl, tudíž zbyla v dutinách především po stěnách přilnutá tuková tělíska. Po proběhnutí SDS-PAGE bylo pro vizualizaci přímo v gelech použito barvení stříbrem i koloidní barvivo CBB-G250. Obě barviva vykazovala optimální vizualizaci, v obou případech bylo nezbytné využití fixačního roztoku.



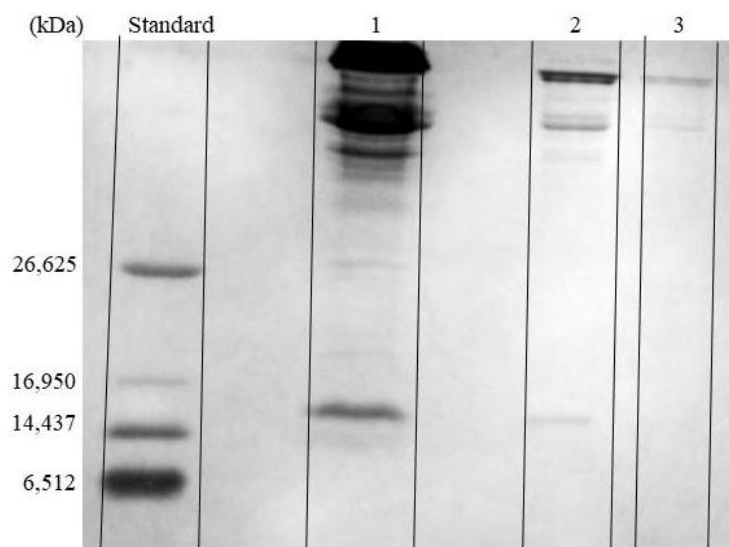
Obr. 30: Schéma postupu optimalizace zpracování biologických matric s očekávanou přítomností AmP.

Po optimalizaci separace peptidů a malých proteinů v gelu byly proteiny blotovány na PVDF membránu a detekovány inkubací s primárními a sekundárními protilátkami značenými AP pro kolorimetrickou detekci, ale také prostřednictvím HRP, což vede k detekci chemiluminiscenční, která by měla poskytovat citlivější vyhodnocení.

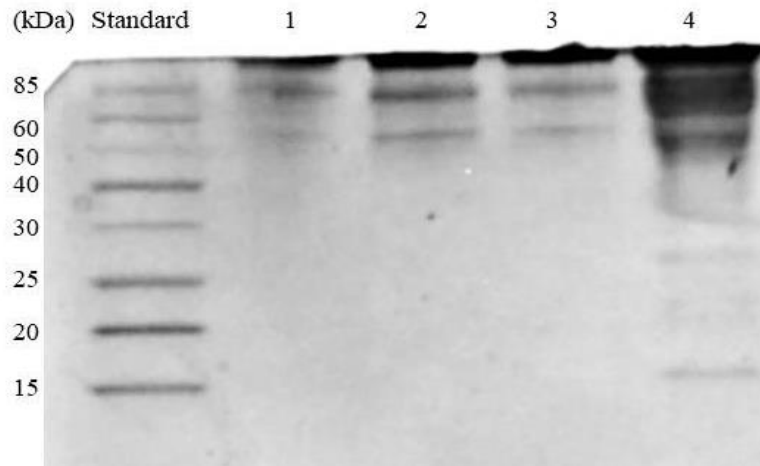
Nejprve byly provedeny pokusy pro získání signálu daných AmP z hemolymfy klinicky zdravých včel. Hemolymfa byla pro optimalizaci nanášena na gel bez úpravy, pouze ředěna vodou a smíchána s daným vzorkovacím pufrům (Tricin-sample buffer, Bio-Rad) pro Tricinovou elektroforézu na 16% gel obsahující glycerol (Obr. 31). Jelikož byly v hemolymfě evidentní bandy proteinů zachycených u čela gelu, byl pro lepší dělení použit glycinový 15% gel a z toho důvodu byla hemolymfa smíchána s 2× Laemmliho vzorkovacím pufrům (Obr. 32). Přestože bylo v gelech evidentní dělení proteinů a peptidů i při docela nízkých molekulových hmotnostech (cca 14 kDa), po přeblotování z gelů nebyly z hemolymfy cílové AmP detekovány. Proto bylo testováno srážení hemolymfy pomocí vychlazeného MeOH na teplotu - 80°C v poměru 1:4, sraženiny pak byly rozpuštěny dvěma různými způsoby, viz Obr. 30. Zpracovaná hemolymfa byla nanesena na 16% Tricinový gel s glycerolem (Obr. 33), ovšem ani z této nebyly na PVDF po blottingu detekovány bandy odpovídající velikosti.



Obr. 31: Hemolymfa včel separovaná v 16% Tricinovém gelu obsahujícím glycerol. Vzorek 1 – neředěná hemolymfa; 2 – hemolymfa ředěná 10×; 3 – hemolymfa ředěná 50×. Standard pro malé proteiny (BioRad). Vizualizace stříbrem.

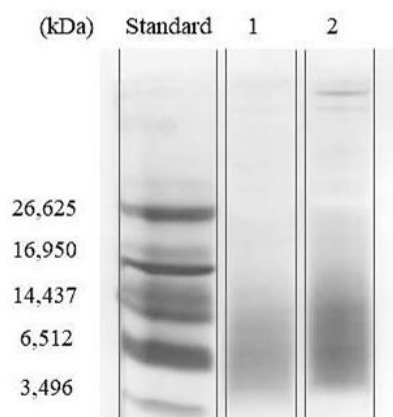


Obr. 32: Hemolymfa včel separovaná v 15% glycinovém gelu. Vzorek 1 – neředěná hemolymfa; 2 – hemolymfa ředěná 10×; 3 – hemolymfa ředěná 50×. Standard pro malé proteiny (BioRad). Vizualizace stříbrem.

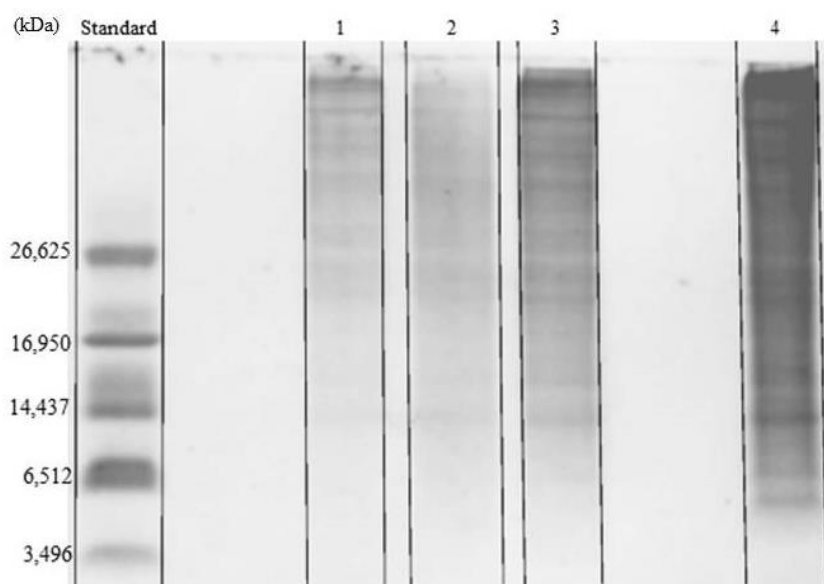


Obr. 33: Hemolymfa včel vysrážená v MeOH separovaná v 16% Tricinovém gelu. Vzorek 1-3 precipitáty hemlymfy rozpuštěny ve 20 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6,8) a 20 μl Tricin-sample buffer (BioRad); 4 – precipitát hemolymfy rozpuštěn ve 30 μl Tricin-sample buffer. Standard pro široké spektrum proteinů (NewEngland BioLab).

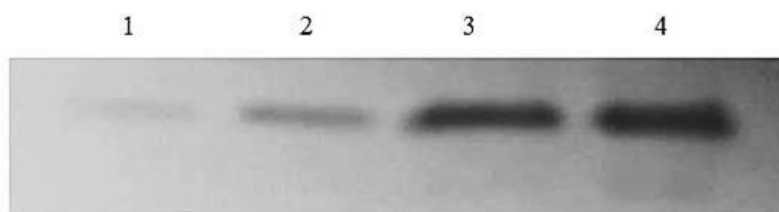
Při další optimalizaci zpracování vzorků byly použity homogenáty zadečků včel, z nichž byly vypreparovány trávicí trakty obsahující pyl. Extrakce byla provedena třemi různými způsoby, viz Obr. 30, vzorky byly naneseny na gel (Obr. 34, Obr. 35) a dále blotovány. Z homogenátů extrahovaných v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-Pi (pH 7,0) i v lyzačním RIPA pufu (Obr. 34) nebyl po přeblotování z 16% Tricinového gelu na PVDF membránu detekován žádný pozitivní band. Z výsledků na gelu po detekci barvivem CBB-G250 je evidentní přílišná hustota splývajících bandů při MW pod 16 kDa (Obr. 34). Pro extrakci byl také optimalizován postup vycházející z extrakce dle Danihlík *et al.* (2014), kdy byly homogenáty zadečků homogenizovány v prostředí 0,1% TFA, povařeny po dobu 10 minut a přes noc lyofilizovány. Ačkoli se tento postup zdál jako nejnáročnější pro stabilitu proteinů (vysoká až 100 °C teplota i nízká - 80°C), jevil se jako nejefektivnější, jelikož jako jediný vedl po separaci na gelu (Obr. 35) k úspěšné detekci AmP defensinu-1 na PVDF membráně (Obr. 36).



Obr. 34: Homogenáty abdomenů v 16% Tricinovém gelu. Vzorek 1 – homogenizace abdomenu včel (imunizovaných PBS se suspenzí bakterií) v 0,1 mol·l⁻¹ K-Pi (pH 7,0); 2 – homogenizace abdomenu (imunizovaných PBS se suspenzí bakterií) v RIPA pufru. Standard pro malé proteiny (BioRad). Barveno koloidním roztokem CBB-G250.



Obr. 35: Homogenáty abdomenů v 16% Tricinovém gelu. Vzorek 1 – homogenát ředěný 10×; 2 – homogenát ředěný 5×; 3 – homogenát ředěný 2×; 4 – homogenát neředěný. Standard pro malé proteiny (BioRad). Barveno koloidním roztokem CBB-G250.



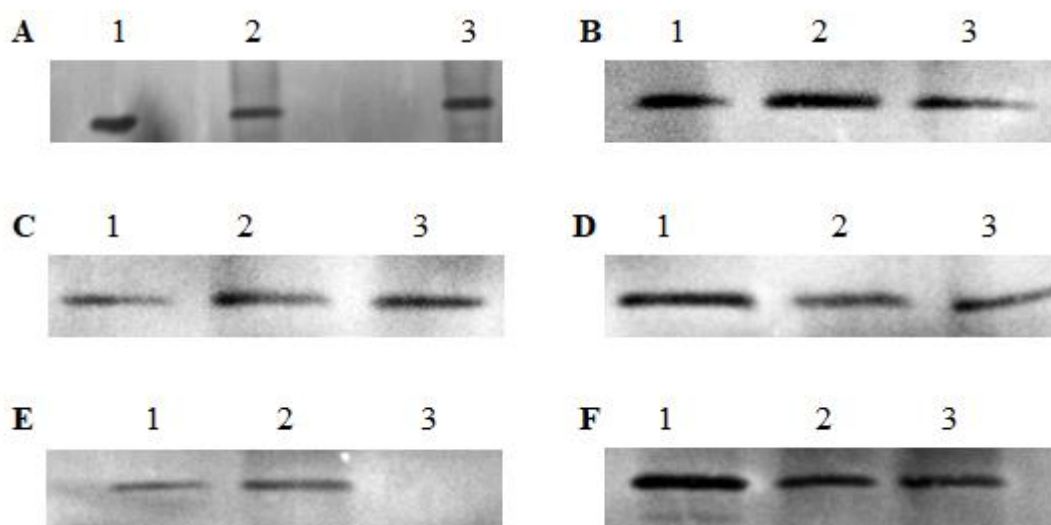
Obr. 36: Kolorimetrická detekce defensinu-1 z homogenátů abdomenů na PVDF membráně po Western blottingu. Vzorek 1 – homogenát ředěný 10×; 2 – homogenát ředěný 5×; 3 – homogenát ředěný 2×; 4 – homogenát neředěný.

4.7.3 Semikvantitativní vyhodnocení detekce defensinu-1

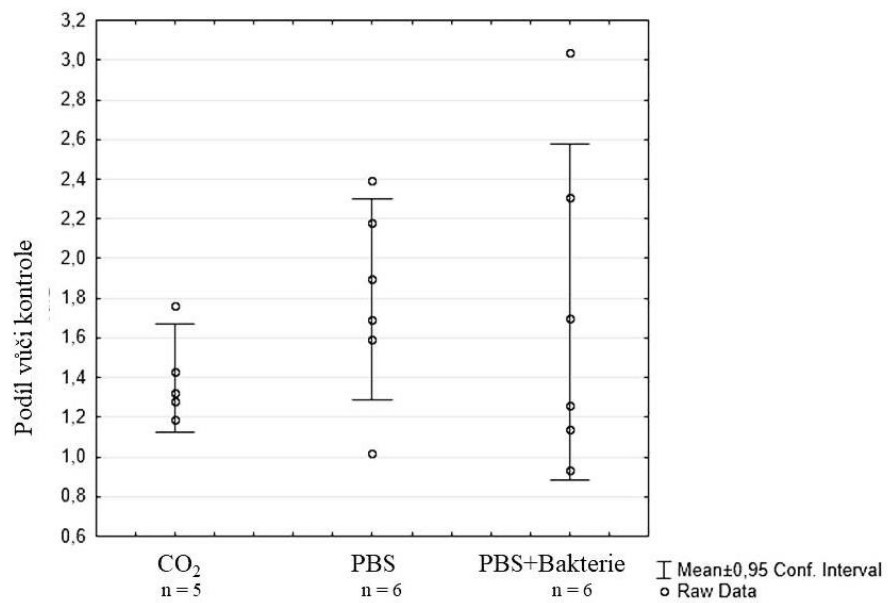
Z cílených antimikrobiálních peptidů byl příslušnými protilátkami detekován z homogenátů abdomenů obsahujících tukové těleso extrahovaných v 0,1% TFA pouze defensin-1. Tento peptid byl detekován v 50 % homogenátů včel klinicky zdravých (n=4; Obr. 37), v 83 % homogenátů narkotizovaných včel CO₂ (n = 6), ve všech homogenátech včel narkotizovaných a imunizovaných roztokem PBS (n = 6) a také včel imunizovaných PBS se suspenzí bakterií *P. larvae* a *E. coli* (n = 6). Výsledky z blotů na PVDF membráně jsou pro příklad ze tří imunizovaných skupin znázorněny na Obr. 38 A-F. Pro vyhodnocení byly denzity bandů na membráně imunizovaných včel vztaženy a srovnány se zprůměrovanými denzitami bandů z homogenátů klinicky zdravých včel (výsledné denzité byla udělena hodnota 1) pomocí softwaru ImageJ, výsledky srovnání jsou uvedeny pod obrázky Obr. 38 A-F a pro shrnutí v grafu viz Obr. 39.



Obr. 37: Kolorimetrická detekce defensinu-1 na PVDF membráně z homogenátů dvou vzorků (n = 2) klinicky zdravých včel. Pro nanesení byla použita koncentrace proteinů 3 μ g.



Obr. 38: Kolorimetrická detekce defensinu-1 na PVDF membráně z homogenátů imunizovaných včel. Obr. A – F: Homogenáty zadečků imunizovaných včel rozděleny pro blotování do 6 skupin. Vzorky s ozn. 1 – imunizace PBS + suspenzí bakterií; 2 – imunizace PBS; 3 – narkotizace CO₂. Pro nanesení byla použita koncentrace proteinů 3 μ g.



Obr. 39: Shrnutí semikvantitativního vyhodnocení denzity bandů detekce AmP defensinu-1 v homogenátech imunizovaných včel vůči kontrole.

5 Diskuze

Humorální imunitní systém včel (*A. mellifera*) mimo jiné zahrnuje tvorbu a produkci antimikrobiálních peptidů, které se staly hlavním zájmem studie experimentální části této práce.

5.1 Sledování změn exprese genů antimikrobiálních peptidů v různém vývojovém stádiu

Metodou qPCR byla sledována a kvantifikována relativní exprese genů antimikrobiálních peptidů hymenoptaecinu, defensinu-1, abaecinu a apidaecinu u včel napříč vývojovými stádii, tedy u plodu – larev (4 denních) a mladých dospělých 10 denních včel (kapitola 4.5 – 4.6). Z výsledků vizualizovaných do grafů jsou mezi imunokompetencí larev a dospělých včel na dané podněty evidentní rozdíly. Larvy byly přímo krmeny sporami bakterie *P. larvae*, což bývá běžná cesta tohoto patogena do těla. Avšak i při nejvyšších koncentracích spor v mateří kašičce (koncentrace $90 \text{ spor} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ mateří kašičky), která jim byla podána jako krmný roztok, byly hodnoty relativní kvantifikace exprese daných genů velmi nízké (Obr. 17 - 20). Larvy jsou nejvíce senzitivní k propuknutí nákazy způsobené sporami bakterie v raném stádiu, tedy 12 – 36 hodin po vylíhnutí (Genersch, 2010). Více než 70 % larev podrobených tomuto krmicímu experimentu 4 denní vystavení sporám nepřežilo. Ztráty však byly pozorovány také u kontrolní skupiny, tudíž se na úmrtnosti kromě vlivu patogena mohl podepsat také stres ze změny prostředí, či další abiotické faktory. Evans (2004) ve své práci testoval odpověď exprese genů kódujících antimikrobiální peptidy abaecin a defensin-1 taktéž na přítomnost spor bakterie *P. larvae*, které byly o koncentraci $100 \text{ spor} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ přidány do potravy larev. Z výsledků je patrné, že k mírné expresi obou genů pro dané peptidy dochází již do 24 hodin od inokulace, přičemž lepším okamžitým indikátorem v závislosti na stáří larev se jeví abaecin (Evans, 2004). Taktéž v mé studii vykazoval gen kódující abaecin, v porovnání s ostatními třemi sledovanými geny, nejabudantnější expresi a to v případě koncentrace $0,75 \text{ spor} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Dospělé 10 denní včely, již ve stádiu kojiček, naproti tomu vykazovaly celkově vyšší relativní kvantifikaci exprese genů kódujících peptidy abaecin, apidaecin, defensin-1 i hymenoptaecin (Obr. 21 – 24). Tyto výsledky korelují s výsledky porovnání imunokompetence v různých vývojových stádiích včel, která provedli Wilson-Rich *et al.* (2008). Tito autoři vycházeli z hypotézy, že by u larev a všeobecně plodu měla být

posílena právě humorální a buněčná složka imunitní odpovědi. V případě zmíněných autorů byla porovnávána jako složka humorální imunity aktivita fenoloxidas, která se dle výsledků s přibývajícím věkem postupně zvyšovala. Spíše se tedy jedná o postupný vývoj vrozeného imunitního systému u jedinců, kdy konkrétně u 4 denních larev pozorujeme, že humorální složka, resp. exprese genů pro dané peptidy, není ještě zcela vyvinutá a schopná zareagovat ve větší míře na přítomnost patogena. Naproti tomu humorální imunita u dospělých včel kojiček vykazuje, že i poměrně malé narušení integrity systému v podobě vpíchnutí fyziologického roztoku PBS pod kutikulu, aktivuje expresi genů antimikrobiálních peptidů (Obr. 21 – 24).

5.2 Optimalizace detekce antimikrobiálních peptidů metodou Western blotting

Jelikož jsou cílovými analyty poměrně malé peptidy (< 10 kDa) bylo přednostně z protokolu dle Schäggera (2006) zvoleno Tricinové provedení SDS-PAGE a z protokolu dle Wu *et al.* (2007) pro detekci po blottingu PVDF membrána o porozitě 0,2 μm . Jako blokační roztok se osvědčil 5% BSA v TBS pufru. Jednotlivé kroky detekce byly optimalizovány pomocí synteticky připravených peptidů a byla zjištěna optimální ředění primárních (1:500) i sekundárních (1:10000) protilátek.

Hlavním místem syntézy antimikrobiálních peptidů je tukové těleso nacházející se v abdomenu včel, kde obklopuje vnitřní část dutiny. Zde se vlivem okolního prostředí (patogenů, pesticidů), pomocí signálních drah (kap. 2.2), formují AmP a jsou dále vyplavovány do hemolymfy a rozváděny do cílových míst. Dle Otvos (2000) se koncentrace antimikrobiálních peptidů v hemolymfě pohybuje pod $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v aktivní formě, do níž se peptid musí dostat, může být koncentrace daleko nižší. Danihlík *et al.* (2014) se pomocí chromatografických metod a hmotnostní spektrometrie zabývali detekcí AmP apidaecinu-1 a jeho obsahem v tkáních i hemolymfě, kde bylo u včel létavek detekována průměrná koncentrace $13 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Pro detekci hymenoptaecinu, abaecinu a defensinu-1 imunochemickou detekcí metodou Western blotting byly tedy zvoleny právě abdomeny obsahující hlavní biosyntetický orgán a hemolymfa jako výchozí biologické matrice.

Nejprve byla pro detekci abaecinu, hymenoptaecinu a defensinu-1 zpracována hemolymfa, tedy směsný vzorek z 10 včel. Ovšem ani jeden z antimikrobiálních peptidů v této matrici detekován nebyl. Je však možné, že detekce nebyla úspěšná z důvodu

výběru vzorku – včely byly zdravé a koncentrace antimikrobiálních peptidů sekretovaných do hemolymfy byla příliš nízká. Randolt *et al.* (2008) se zabývali detekcí peptidů a proteinů obsažených v hemolymfě včel po septickému antiseptickém poranění. V 15% gelu barveném kolidním barvivem CBB-G250 detekovali u jedinců dospělých i v larválním stádiu imunizovaných PBS se suspenzí bakterií *E. coli* (koncentrace 10^4 buněk bakterie v 1 μ l PBS) antimikrobiální peptidy hymenoptaecin, defensin i abaecin. U neinfikovaných dospělých jedinců tyto peptidy přítomny nebyly.

Další matricí byly extrakty abdomenů, z nichž byl před homogenizací vypreparován trávicí trakt obsahující velké množství pozřené pyly, což by pro tuto studii mohlo vykazovat falešné a zkreslené výsledky. Homogenáty byly extrahovány ve třech různých podmínkách, přičemž se jako nejúčinnější ukázala extrakce v 0,1% TFA s následnou lyofilizací (Daníhlík *et al.*, 2014). V těchto vzorcích byl po SDS-PAGE v Tricinovém 16% gelu a následném Western blottingu na PVDF membránu kolorimetricky detekován peptid o molekulové hmotnosti cca 5,5 kDa defensin-1. Tento peptid byl detekován u klinicky zdravých včel ve dvou ze čtyř vzorků a ve většině homogenátů z abdomenů imunizovaných včel. Z výsledků, kdy bylo porováno 6 skupin infikovaných včel, lze říci, že u imunizovaných jedinců byla produkce defensinu-1 vyšší než u klinicky zdravých včel. Tomuto výsledku poměrně korelují data získaná qPCR metodou, kdy také exprese byla u imunizovaných jedinců vyšší než u klinicky zdravých. Při semikvantitativním vyhodnocení na membráně tomu tak konkrétně bylo ve vzorku homogenátu ze včely ošetřené PBS se suspenzí bakterií, jejíž hodnota byla až 3× vyšší než u včely klinicky zdravé.

Randolt *et al.* (2008) i Gätschenberger *et al.* (2012) ve svých studiích uvádějí, že nejvíce abundantním AmP je hymenoptaecin, v rámci této práce však k detekci z homogenátů abdomenů, ani pomocí více citlivé chemiluminiscenční detekce na PVDF membráně, nedošlo. Tento negativní výsledek tak mohl být způsoben například špatnou vazbou připravené protilátky na antigen, či nízkým zastoupením peptidu ve vzorku. Při zpracování byly homogenáty vystaveny teplotě 100 °C, což mohlo vést až k denuraci jak hymenoptaecinu, tak abaecinu. Defensin-1 ve své molekule obsahuje 6 cysteinů, kdy se všechny účastní tvorby disulfidových můstků, které by tak mohly mít za následek vyšší stabilitu peptidu (Bulaj, 2005). Detekován nebyl tedy ani AmP abaecin, což je velmi malý peptid a mohl z gelu případně membrán unikát nebo být během celého procesu z membrány vymyt.

V rámci dalších optimalizací detekce antimikrobiálních peptidů metodou Western blotting je třeba pro hymenoptaecin a abaecin vyvinout jiný postup zpracování vzorků. Jako vhodný krok by se jevilo zakoncentrování vzorku nebo možné použití vyšších koncentrací inhibitorů proteas. Dále by se metodika dala zdokonalit purifikací vzorku využitím chromatografických metod (např. RP-HPLC) (Casteels *et al.*, 1989; Danihlík *et al.*, 2014). Vhodným krokem by také bylo pokusit se o odebrání hemolymfy včelám, které by byly chovány *in vitro*, přičemž by byly vystaveny infekčnímu prostředí patogenů, např. bakteriím *P. larvae* nebo *E. coli*, popřípadě insekticidům. Z takto ošetřených včel by poté mohla být v časových intervalech odebírána hemolymfa a na gelu případně membráně sledováno její složení.

6 Závěr

V práci byl studován humorální imunitní systém včely medonosné (*Apis mellifera*) v různých vývojových stádiích se zaměřením na antimikrobiální peptidy.

1. Byla zpracována literární rešerše popisující srovnání imunitní odpovědi hmyzu se zaměřením na včely (Apoidea).
2. Byly sepsány a zpracovány poznatky o postupu zpracování, izolaci a purifikaci peptidů z biologických matric s jejich následnou imunochemickou detekcí.
3. Částečně byl optimalizován postup detekce antimikrobiálních peptidů abaecinu a defensinu-1:
 - Jednotlivé kroky byly optimalizovány se synteticky připravenými peptidy, díky kterým se podařilo optimalizovat použití gelů (16% Tricinový), PVDF membrány v kombinaci s blokačním roztokem, kterým bylo 5% BSA v TBS pufru.
 - Optimální ředění sekundární protilátky bylo pro kolorimetrickou i pro chemiluminiscenční detekci 1:10000 a ředění primární protilátky 1:500.
 - Jako vhodný materiál pro detekci AmP se ukázaly homogenáty abdomenů včel, u kterých byl vypreparován trávicí trakt. Z homogenátů extrahovaných v 500 μ l 0,1% TFA, povařených a nakonec lyofilizovaných se úspěšně podařilo detekovat antimikrobiální peptid defensin-1 u klinicky zdravých i imunizovaných včel.
4. Metodou qPCR byly sledovány změny v humorálním imunitním systému včel (*A. mellifera carnica*). Byly pozorovány relativní kvantifikace genové exprese genů kódujících antimikrobiální peptidy abaecin, apidaecin, defensin-1 a hymenoptaecin:
 - U larev včel kmených sporami bakterie *P. larvae* nebyly mezi experimentálními skupinami pozorovány statisticky významné rozdíly.
 - Dospělé 10 denní včely narkotizovány CO₂ a imunizovány fyziologickým roztokem PBS, který byl dále obohacen o suspenzi Gram-negativních bakterií *E. coli* a Gram-pozitivních bakterií *P. larvae* vykazovaly pro každý exprimovaný gen mezi skupinami statisticky významné rozdíly.
 - Nejvyšší relativní kvantifikace genové exprese byla pozorována u včel narkotizovaných a imunizovaných roztokem PBS s výše zmíněnou bakteriální suspenzí.

7 Literatura

- Aggrawal K., Silverman N. (2007): Peptidoglycan recognition in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions* **35**, 1496-1500.
- Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. (2010): Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters* **6**, 562-565.
- Aliferis K.A., Copley T., Jabaji S. (2012): Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of insect physiology* **58**, 1349-1359.
- Amdam G.V., Simões Z.L., Hagen A., Norberg K., Schrøder K., Mikkelsen Ø., Kirkwood T.B.L., Omholt S.W. (2004): Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental gerontology* **39**, 767-773.
- Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. (2009): Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology* **11**, 2284-2290.
- Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics* **5**, 209-219.
- Ashida M., Brey P. (1997): Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed. (Brey P.T., Hultmark D.), Chapman & Hall, Londýn, UK, 325 stran.
- Aupinel P., Fortini D., Dufour H., Tasei J., Michaud B., Odoux J., Pham-Delegue M. (2005): Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology* **58**, 107-111.
- Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J., Šimúth J. (2002): Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* **33**, 259-269.
- Baracchi D., Francese S., Turillazzi S. (2011): Beyond the antipredatory defence: honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon* **58**, 550-557.
- Biliková K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klaudiny J., Šimúth J. (2002): Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization 1. *FEBS letters*, **528**, 125-129.
- Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R.A. (1982): Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. *FEBS letters* **144**, 1-5.
- Bogaerts A., Baggerman G., Vierstraete E., Schoofs L., Verleyen P. (2009): The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free?. *Proteomics* **9**, 3201-3208.
- Borba R.S., Klyczek K.K., Mogen K.L., Spivak M. (2015): Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3689-3699.
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N. (2002): Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell* **3**, 711-722.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Büchler R. (2016): The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology* **86**, 40-47.
- Brodtschneider R., Gray A., van der Zee R., Adjlane N., Brusbardis V., Charrière J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Crailsheim K., Dahle B., Danihlík J., Danneels E., de Graaf D.C., Dražić M.M., Fedoriak M., Forsythe I., Golubovski M., Gregorc A., Grzęda U., Hubbuck I., Tunca R.I., Kauko L., Kilpinen O., Kretavicius J., Kristiansen P., Martikkala M., Martín-Hernández R., Mutinelli F., Peterson M., Otten Ch., Ozkirim A., Raudmets A., Simon-Delso N., Soroker V., Topolska G., Vallon J., Vejsnæs F., Woehl S. (2016): Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **55**, 375-378.

- Brodtschneider R., Gray A., Adjlane N., Ballis A., Brusbardis V., Charrière J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Dahle B., de Graaf B.C., Dražić M.M., Evans G., Fedoriak M., Forsythe I., Gregorc A., Grzęda U., Hetzroni A., Kauko L., Kristiansen P., Martikkala M., Martín-Hernández R., Medina-Flores C.A., Mutinelli F., Raudmets A., Ryzhikov V.A., Simon-Delso N., Stevanovic J., Uzunov A., Vejsnæs F., Wöhl S., Zammit-Mangion M., Danihlík J. (2018): Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **57**, 452-457.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology* **3**, 238-250.
- Brutscher L.M., Daughenbaugh K.F., Flenniken M.L. (2015): Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 71-82.
- Bulaj G. (2005): Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology advances* **23**, 87-92.
- Bulet P., Hetru Ch., Dimarcq J., Hoffman D. (1999): Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 329-344.
- Bulet P., Stöcklin R. (2005): Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and peptide letters* **12**, 3-11.
- Bustin S.A., Nolan T. (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques* **15**, 155-166.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. (2005): Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology* **34**, 597-601.
- Callewaert L., Michiels C.W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences* **35**, 127-160.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Tempst P. (1993): Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 7044-7054.
- Casteels P., Tempst P. (1994): Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**, 339-345.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honey bee peptide-antibiotics gene repertoire and required posttranslational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 28569–28575.
- Cerenius L., Lee B.L., Söderhäll K. (2008): The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology* **29**, 263-271.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler, M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R., Oakeshott J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology* **15**, 615-636.
- Corona M., Velarde R.A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K.A., Robinson G.E. (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7128-7133.
- Cremer S., Armitage S.A., Schmid-Hempel P. (2007): Social immunity. *Current biology* **17**, 693-702.
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L., Neumann P. (2012): Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 981-987.
- Danihlík J., Šebela M., Petřivalský M., Lenobel R. (2014): A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1374**, 134-144.

- Danihlik J., Aronstein K., Petřivalský M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research* **54**, 123-136.
- DeGrandi-Hoffman G., Chen Y. (2015): Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 170-176.
- De Gregorio E., Han S.J., Lee W.J., Baek M.J., Osak, T., Kawabata S.I., Brey P.T. (2002): An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Developmental cell* **3**, 581-592.
- Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. (2004): Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* **37**, 112-119.
- Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2005): The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature immunology* **6**, 946-953.
- Eichenseer H., Mathews M.C., Bi J.L., Murphy J.B., Felton G.W. (1999): Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*?. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **42**, 99-109.
- Eitenmiller R.R., Friend B.A., Shahani K.M. (1976): Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme. *Journal of dairy science* **59**, 834-839.
- Ernst O., Zor T. (2010): Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **38**. <http://www.jove.com/details.php?id=1918>.
- Evans J.D. (2004): Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology* **85**, 105-111.
- Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.
- Evans J.D., Spivak M. (2010): Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology* **103**, 62-72.
- Evans J.D., Schwarz R.S., Chen Y.P., Budge G., Cornman R.S., De la Rua P., de Miranda J.R., Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun Ch.M., Moritz F.A.R., Maleszka R., Muñoz I., Pinto M.A. (2013): Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of apicultural research* **52**, 1-54.
- Fluri P., Lüscher M., Wille H., Gerig L. (1982): Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology* **28**, 61-68.
- Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**, 112-125.
- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.
- Gätschenberger H., Gimple O., Tautz J., Beier H. (2012): Honey bee drones maintain humoral immune competence throughout all life stages in the absence of vitellogenin production. *Journal of Experimental Biology* **215**, 1313-1322.
- Genersch E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology* **103**, 10-19.
- Gillespie J.P., Kanost M.R., Tenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology* **42**, 611-643.
- González-Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**, 1-16.
- Goto A., Okado K., Martins N., Cai H., Barbier V., Lamiable O., Silverman, N. Troxler L., Santiago E., Kuhn L., Paik D., Holleufer A., Hartmann R., Liu J., Peng T., Hoffmann J.A., Meignin C., Daeffler L., Imler J.L. (2018): The Kinase IKK β Regulates a STING-and NF- κ B-Dependent Antiviral Response Pathway in *Drosophila*. *Immunity* **49**, 225-234.
- Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E.L. (2015): Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1435-1445.

- Gregorc A., Ellis J.D. (2011): Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide biochemistry and physiology* **99**, 200-207.
- Guidugli K.R., Nascimento A.M., Amdam G.V., Barchuk A.R., Omholt S., Simões Z.L., Hartfelder K. (2005): Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS letters* **579**, 4961-4965.
- Gül N., Ayvalı C. (2002): Purification and determination of the molecular structure of hemolymph lectin of *Agrotis segetum* (Denis and Schiff.). *Turkish Journal of Biology* **26**, 49-55.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9390-9395.
- Hartfelder K., Bitondi M.M., Brent C.S., Guidugli-Lazzarini K.R., Simões Z.L., Stabentheiner A., Tanaka É.D., Wang, Y. (2013): Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-48.
- Hellio C., Bado-Nilles A., Gagnaire B., Renault T., Thomas-Guyon, H. (2007): Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish & shellfish immunology* **22**, 433-440.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., M. del Nozal J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. (2008): How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology* **10**, 2659-2669.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway Jr.Ch.A., Ezekowitz R.A.B. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.
- Hořejší V., Bartůňková J (2005): Základní pojmy, funkce a složky imunitního systému. In: *Základy imunologie*. 4 (Britnická R. ed.), TRITON, Praha, 23.
- Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. (2003): Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophysical journal* **84**, 3751-3758.
- Chen Y.P., Higgins J.A., Feldlaufer M.F. (2005): Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 436-441.
- Chen Y., Evans J.D., Smith I.B., Pettis J.S. (2008): *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of invertebrate pathology* **97**, 186-188.
- Cho E., Kim C., Kook J.K., Jeong Y.I., Kim J.H., Kim Y.A., Endo M., Hwang C.H. (2012): Fabrication of electrospun PVDF nanofiber membrane for Western blot with high sensitivity. *Journal of membrane science* **389**, 349-354.
- Jang I.H., Chosa N., Kim S.H., Nam H.J., Lemaitre B., Ochia, M., Kambris Z., Brun S., Hashimoto C., Ashida M., Brey P.T., Lee W.J. (2006): A Spätzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Developmental cell* **10**, 45-55.
- Kaneko T., Silverman N. (2005): Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular microbiology* **7**, 461-469.
- Klaudiny J., Albert Š., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J. (2005): Two structurally different defensin genes one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 11-22.
- Kleino A., Myllymäki H., Kallio J., Vanha-aho L.M., Oksanen K., Ulvila J., Hultmark D., Valanne S., Rämet M. (2008): Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *The Journal of Immunology* **180**, 5413-5422.
- Kleino A., Silverman N. (2014): The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental & Comparative Immunology* **42**, 25-35.
- Kurien B.T., Scofield R.H. (2006): Western blotting. *Methods* **38**, 283-293.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Laughton A.M., Siva-Jothy M.T. (2011): A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **42**, 140-149.
- Laughton A.M., Boots M., Siva-Jothy M.T. (2011): The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of insect physiology* **57**, 1023-1032.
- Lee C. (2007): Western blotting. In: *Circadian Rhythms. Methods and Protocols*. (Rosato E.) Humana Press, US, New York, 578 stran.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Li W., Ma G., Zhou X. (2006): Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359.
- Li L., Mu L., Wang X., Yu J., Hu R., Li, Z. (2017): A novel expression vector for the secretion of abaecin in *Bacillus subtilis*. *Brazilian journal of microbiology* **48**, 809-814.
- Lourenço A.P., Mackert A., dos Santos Cristino A., Simões Z.L.P. (2008): Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Luiz D.P., Almeida J.F., Goulart L.R., Nicolau-Junior N., Ueira-Vieira C. (2017): Heterologous expression of abaecin peptide from *Apis mellifera* in *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* **16**:76. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0689-6>.
- Mahmood T., Yang P.C. (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* **4**, 429-434.
- McMenamin A., Daughenbaugh K., Parekh F., Pizzorno M., Flenniken M. (2018): Honey bee and bumble bee antiviral defense. *Viruses* **10**, 395-417.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **1**, 135-145.
- Meunier J. (2015): Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 1-10.
- Michiels K., Van Damme E.J., Smaghe G. (2010): Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **73**, 193-212.
- Minagawa S., Hikima J.I., Hirono I., Aoki T., Mori H. (2001): Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Developmental & Comparative Immunology* **25**, 439-445.
- Montaño A.M., Tsujino F., Takahata N., Satta Y. (2011): Evolutionary origin of peptidoglycan recognition proteins in vertebrate innate immune system. *BMC Evolutionary Biology*, **11**:79. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/79>.
- Myllymäki H., Valanne S., Rämet M. (2014): The *Drosophila* imd signaling pathway. *The Journal of Immunology* **192**, 3455-3462.
- Nappi A.J., Ottaviani E. (2000): Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* **22**, 469-480.
- Neyen C., Poidevin M., Roussel A., Lemaitre B. (2012): Tissue-and ligand-specific sensing of gram-negative infection in *Drosophila* by PGRP-LC isoforms and PGRP-LE. *The Journal of Immunology* **189**, 1886-1897.
- Nováková L., Vlčková H. (2009): A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica chimica acta* **656**, 8-35.
- Otvos L. (2000): Antibacterial peptides isolated from insect. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Page Jr. R.E., Peng C.Y.S. (2001): Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology* **36**, 695-711.
- Peiren N., Vanrobaeys F., de Graaf D.C., Devreese B., Van Beeumen J., Jacobs F.J. (2005): The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta* **1752**, 1-5.
- Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, 2002-2007.

- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* **26**, 509-515.
- Pinto L.Z., Bitondi M.M., Simões Z.L. (2000): Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology* **46**, 153-160.
- Ponnuvel K.M., Yamakawa M. (2002): Immune responses against bacterial infection in *Bombyx mori* and regulation of host gene expression. *Current Science* **83**, 447-454.
- Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M.J., Albert S., Tautz J., Beier H. (2008): Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**, 155-167.
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M. (2009): Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1760-1765.
- Reeves A.M., O’Neal S.T., Fell R.D., Brewster C.C., Anderson T.D. (2018): In-Hive Acaricides Alter Biochemical and Morphological Indicators of Honey Bee Nutrition, Immunity, and Development. *Journal of Insect Science* **18**, 8-14.
- Remolina S.C., Hughes K.A. (2008): Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age* **30**, 177-185.
- Reynolds J.A., Tanford C. (1970): Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **66**, 1002-1007.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology* **103**, 96-119.
- Sanchez-Bayo F., Goka K. (2014): Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one* **9**, e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>.
- Santos K.S., dos Santos L.D., Mendes M.A., de Souza B.M., Malaspina O., Palma M.S. (2005): Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect biochemistry and molecular biology* **35**, 85-91.
- Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. (2006): Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 962-967.
- Schägger H., von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**, 368-379.
- Schägger, H. (2006). Tricine–sds-page. *Nature protocols* **1**, 16-23.
- Schmid M.R., Brockmann A., Pirk C.W., Stanley D.W., Tautz J. (2008): Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of insect physiology* **54**, 439-444.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature protocols* **3**, 1101-1108.
- Silverman N., Zhou R., Erlich R.L., Hunter M., Bernstein E., Schneider D., Maniatis T. (2003): Immune activation of NF- κ B and JNK requires *Drosophila* TAK1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48928-48934.
- Simone M., Evans J.D., Spivak M. (2009): Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **63**, 3016-3022.
- Simone-Finstrom M. (2017): Social immunity and the superorganism: behavioral defenses protecting honey bee colonies from pathogens and parasites. *Bee World* **94**, 21-29.
- Sinsabaugh R.L. (2010): Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 391-404.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85.

- Söderhäll K., Cerenius L. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology* **10**, 23-28.
- Souza-Neto J.A., Sim S., Dimopoulos G. (2009): An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17841-17846.
- Sowa-Jasilek A., Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Wydrych J., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M. (2014): Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides* **53**, 194-201.
- Strandberg E., Ulrich A.S. (2004): NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance* **23**, 89-120.
- Sun J.J., Xu S., He Z.H., Shi X.Z., Zhao X.F., Wang J.X. (2017): Activation of toll pathway is different between Kuruma Shrimp and *Drosophila*. *Frontiers in immunology* **8**, 1151-1162.
- Teixeira V., Feio M. J., Bastos M. (2012): Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research* **51**, 149-177.3
- The Antimicrobial peptide database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (5. 10. 2018).
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350-4354.
- Tseng J.M., Huang J.R., Huang H.C., Tzen J.T., Chou W.M., Peng C.C. (2011): Facilitative production of an antimicrobial peptide royalisin and its antibody via an artificial oil-body system. *Biotechnology progress* **27**, 153-161.
- van Dooremalen C., Stam E., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J., van Langevelde F., Blacquièrre T. (2013): Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of insect physiology* **59**, 487-493.
- van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin Ch., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D.R., Pettis J.S. (2009): Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one* **4**, e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
- Vilmos P., Kurucz É. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Walsh G. (2014): Protein purification and characterization. In: *Proteins: biochemistry and biotechnology*. 2nd ed., John Wiley & Sons, US, New York, 448 stran.
- Wang Q., Ren M., Liu X., Xia H., Chen K. (2019): Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. *Molecular immunology* **106**, 69-76.
- Weber A.N., Tauszig-Delamasure S., Hoffmann J.A., Lelièvre E., Gascan H., Ray K.P., Morse M.A., Imler J.L., Gay N.J. (2003): Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology* **4**, 794-800.
- Wegener J., Ruhnke H., Scheller K., Mispagel S., Knollmann U., Kamp G., Bienefeld K. (2016): Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of insect physiology* **91**, 1-9.
- Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. (2000): A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13772-13777.
- Weston C.R., Davis R.J. (2007): The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology* **19**, 142-149.
- Wilson R., Ratcliffe N. A. (2000): Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereus* by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 663-670.
- Wilson-Rich N., Dres S.T., Starks P.T. (2008): The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology* **54**, 1392-1399.
- Wimley W.C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology* **5**, 905-917.

- Wu M., Stockley P.G., Martin W.J. (2002): An improved western blotting technique effectively reduces background. *Electrophoresis* **23**, 2373-2376.
- Wu Y., Li Q., Chen X.Z. (2007): Detecting protein–protein interactions by far western blotting. *Nature protocols* **2**, 3278-3284.
- Wu J.Y., Anelli C.M., Sheppard W.S. (2011): Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one* **6**, e14720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>.
- Yang H., Kronhamn J., Ekström J.O., Korkut G.G., Hultmark D. (2015): JAK/STAT signaling in *Drosophila* muscles controls the cellular immune response against parasitoid infection. *EMBO reports* **16**, 1664-1672.
- Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D., Yu X.Q. (2014): Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 5807-5822.
- Yu X.Q., Gan H., Kanost M.R. (1999): Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect biochemistry and molecular biology* **29**, 585-597.
- Yu X.Q., Kanost M.R. (2000): Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 37373-37381.
- Yue C., Genersch E. (2005): RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* **86**, 3419-3424.
- Zhou J., Zhao J., Zhang S., Shen J., Qi Y., Xue X., Li Y., Wu L., Zhang J., Chen F., Chen L. (2010): Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* **404**, 171-178.
- Zhukovskaya M., Yanagawa A., Forschler B. (2013): Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects* **4**, 609-630.
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* **32**, e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>.

8 Seznam použitých zkratk

Aba - abaecinu

ABPV – acute bee paralysis virus

AMK - aminokyselina

AmP – antimikrobiální peptidy

Api – apidaecin

APS – persíran amonný

Arp – actin related protein

BCA – bicinchoninová metoda

BCIP - 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát

bp – base pair

BSA – hovězí sérový albumin

CD – cirkulární dichroismus

CBVLP – surový lyofilizovaný prášek ze včelího jedu

C_T – prahový cyklus, threshold cyklus

Cys – cystein

DAD – diode array detector

Def-1 – defensin-1

Dif – Dorsal immunity factor

DWV – deformed wings virus

EF-1- α – elongační faktor-1- α

FPLC – fast protein liquid chromatography

GITC - guanidin isothiokyanát

GOI – gene of interest

Gly - glycin

GOX – glukosaoxidas

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HKG – housekeeping gen

Hymn – hymenoptaecin

IMD – imunodeficientní

JAK/STAT – Janus kinase / signal transducer and activator of transcription

JH – juvenilní hormon
JNK - c-Jun N-terminal kinase
K-Pi – K-fosfátový pufr
LPS – lipopolysacharidy
MALDI – Matrix-assisted laser desorption / ionization
MAP – mitogen aktivní proteiny
MeOH – methanol
MeSH – merkaptoethanol
MO – mikroorganismy
MW – molekulová hmotnost
NBT – nitrotetrazoliová modř
NF- κ B - nuclear factor
NC – nitrocelulosa
NTC – no template control
PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAMPs – pathogen-associated molecular patterns
PBS – phosphate-buffered saline
PCR – polymerázová řetězová reakce
PGN – peptidoglykan
PGRP - peptidoglycan recognition protein
PO – fenoloxidasa
Pro - prolin
ProPO – profenoloxidasa
ProPO-AS – profenoloxidasový aktivační systém
PSD – post source decay
PVDF – polyvinyliden fluorid
qPCR – kvantitativní PCR
RNA – ribonukleová kyselina
RP – reverzní fáze
RT – real-time
SDS – dodecylsírán sodný

TBS – Tris-buffered saline

TCT – tracheální cytotoxin

TFA – trifluoroctová kyselina

TLRs – toll-like receptory

TOF – time of flight

Vg – vitellogeninový protein

Wb – Western blotting