

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Modulace imunitního systému včely medonosné během jejího vývoje**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Markéta Krhutová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jiří Danihlík, PhD.</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

.....  
Podpis studenta

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce, panu doktoru Jiřímu Danihlíkovi, za příležitost vypracovat bakalářskou práci týkající se imunity včel. Také za mnoho cenných rad, co se práce v laboratoři i zpracování bakalářské práce týče, za ochotu vyjít vstříc a trpělivost.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Krhutová
Název práce	Modulace imunitního systému včely medonosné během jejího vývoje
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, PhD.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Pro úspěšné vypořádání se s patogeny využívá hmyz imunitní reakce na buněčné a molekulární úrovni. Imunitní systém hmyzu se skládá z vrozené imunity, do které spadají fyzikální bariéry, buněčná a humorální imunita. Mezi jednotlivými úrovněmi imunity však nelze vymezit přesné hranice. Pro imunitu včel je také významné sociální chování. Fyzikální bariéry představuje kutikula a peritrofická membrána, imunitu buněčnou charakterizují buňky hemocyty, které jsou schopny např. fagocytózy (pohlčení patogenu). Humorální imunita stojí převážně na produkci antimikrobiálních peptidů. Jedná se převážně o kationické či amfipatické peptidy schopné interagovat se záporně nabitými membránami patogenů. K produkci peptidů dochází díky signálním drahám, které jsou spuštěny po rozpoznání patogenních částic příslušnými receptory. Jedním z antimikrobiálních peptidů je apidaecin, malý peptid bohatý na prolin. Ten je schopen procházet bakteriální membránou a vázat se na GroEL–GroES komplex, tedy komplex zodpovědný za správné skládání bakteriálních proteinů.

Pro stanovení apidaecinu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi spojená s hmotnostní spektrometrií, při které byla použita ionizace elektrosprejem a analýza kvadrupólem s analyzátozem doby letu (UHPLC-ESI-Q-TOF). Apidaecin byl stanovován v hemolymfě úlových včel odebraných přímo ze včelstev. Dále byla hladina apidaecinu stanovena v jednotlivých tělních částech úlových včel. Hlavy a zadečky pocházely od včel, které byly imunizovány vpichem PBS, hrudě poté ze včel, které byly silně napadeny roztočem kleštíkem včelím.

Byl proměřen standard apidaecinu 1B, bylo popsáno jeho chromatografické chování a hmotnostní spektra. Byla stanovena koncentrace apidaecinu ve včelí hemolymfě. Stanovená koncentrace apidaecinu v jednotlivých měsících nevykazovala mezi včelstvy statisticky významné rozdíly. Zároveň bylo stanoveno množství apidaecinu v tělních tkáních, čímž byl prokázán vliv imunizace či napadení roztočem na imunitní systém. Měření prokázala možnost kvantifikovat apidaecin z hemolymfy i tělních tkání.

Klíčová slova	Včela medonosná, antimikrobiální peptidy, humorální imunita, apidaecin
---------------	--

Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Markéta Krhutová
Title	Modulation of immune system of honey bees during their development
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, PhD.
The year of presentation	2022

### Abstract

The insect uses immune responses on cellular and molecular levels to successfully deal with pathogens. Insects' immune system consists of innate immunity, which is composed of physical barriers, and cellular and molecular immunity. However, it is impossible to precisely define boundaries between the various immunity levels. Social behavior is essential for bees' immunity. Physical barriers are represented by cuticle and peritrophic membrane, cellular immunity consists of cells called hemocytes, which are capable of e. g. phagocytosis (ingestion and elimination of pathogen). A significant part of humoral immunity is the production of antimicrobial peptides. Antimicrobial peptides are mostly cationic or amphipathic peptides capable of interacting with negatively charged membranes of pathogens. These peptides are produced due to signalling triggered after recognising of pathogen particles by receptors. One antimicrobial peptide is apidaecin, a small prolin rich peptide which binds to GroEL–GroES bacterial complex, a complex important for the correct folding of bacterial proteins.

Reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry using electrospray ionisation and quadrupole analysis with a time-of-flight detector (UHPLC-ESI-Q-TOF) was used for apidaecin quantification. Apidaecin was quantified in the hemolymph of hive bees and collected directly from hives. Apidaecin was also quantified in hive bees' tissues. Head and abdomens came from bees immunised with a PBS injection, thoraxes from bees infested with Varroa mite.

The apidaecin 1B standard was analysed, its chromatographic behaviour and mass spectra were described. The concentration of apidaecin in bees' hemolymph was quantified. The concentration of apidaecin in individual months did not show statistically significant differences between hives. At the same time, the amount of apidaecin in body tissues was quantified, which proved the effect of immunisation and bee mite infestation on the immune system. Analysis showed the possibility of quantifying apidaecin from both hemolymph and body parts.

Keywords	Honeybee, antimicrobial peptides, humoral immunity, apidaecin
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Současný stav řešení problematiky</b> .....	<b>2</b>
2.1 Imunita hmyzu .....	2
2.1.1 Fyzikální bariéry .....	2
2.1.2 Buněčná imunita.....	3
2.1.3 Hemocyty .....	3
2.1.3.1 Hemocyty octomilky obecné.....	3
2.1.3.2 Hemocyty včely medonosné .....	4
2.1.4 Mechanismy buněčné imunity .....	4
2.1.4.1 Fagocytóza .....	4
2.1.4.2 Nodulace .....	5
2.1.4.3 Enkapsulace.....	5
2.1.4.4 Melanizace .....	5
2.1.5 Humorální imunita .....	5
2.1.6 Antimikrobiální peptidy <i>A. mellifera</i> .....	6
2.1.6.1 Apidaeciny .....	6
2.1.6.2 Abaecin .....	7
2.1.6.3 Defensiny .....	7
2.1.6.4 Hymenoptaecin .....	7
2.1.6.5 AmP mateří kašičky a včelího jedu.....	7
2.1.7 Signální dráhy aktivující geny kódující AmP .....	8
2.1.7.1 Toll signální dráha.....	8
2.1.7.2 Imd signální dráha.....	9
2.1.7.3 JAK-STAT signální dráha .....	10
2.1.8 Imunitní reakce proti virovým infekcím .....	10
2.1.9 Fenoloxidasová kaskáda .....	11
2.1.10 Immune priming.....	12
2.1.11 Sociální imunita .....	12
2.2 Vývoj hmyzu s proměnou dokonalou .....	13
2.2.1 Kasty včelího společenství .....	14
2.2.1.1 Královna.....	14
2.2.1.2 Trubci .....	14
2.2.1.3 Dělnice .....	15
2.2.2 Vývoj včely medonosné.....	15
2.2.2.1 Vajíčko .....	16



2.2.2.2 Embryo .....	16
2.2.2.3 Larva .....	17
2.2.2.4 Předkukla a kukla .....	17
2.2.3 Změny imunitního systému během vývoje včely medonosné .....	18
2.2.3.1 Imunitní systém plodu.....	18
2.2.3.2 Imunitní systém dospělých jedinců .....	18
2.3 Včelí patogeny .....	19
2.3.1 Choroby včelího plodu .....	19
2.3.1.1 Mor včelího plodu .....	19
2.3.1.2 Hniloba včelího plodu .....	20
2.3.1.3 Zvápenatění včelího plodu .....	21
2.3.2 Choroby dospělých včel .....	21
2.3.2.1 Varroóza .....	21
2.3.2.2 Nosematóza .....	22
2.3.2.3 Trypanosomy .....	22
2.3.3 Virové nákazy .....	23
2.4 Metody používané při studiu AmP .....	23
2.4.1 Sledování genové exprese pomocí kvantitativní PCR v reálném čase .....	23
2.4.2 Enzyme-linked immuno sorbent assay .....	24
2.4.3 Extrakce na pevné fázi .....	25
2.4.4 Kapalínová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií.....	25
<b>3 Experimentální část .....</b>	<b>28</b>
3.1 Materiál .....	28
3.1.1 Chemikálie .....	28
3.1.2 Přístroje a vybavení .....	28
3.1.3 Biologický materiál .....	28
3.1.4 Synteticky připravené AmP .....	29
3.2 Metody .....	29
3.2.1 Hmotnostně spektrometrická analýza standardu apidaecinu 1B přímým nástřikem .....	29
3.2.2 Příprava kalibrační sady apidaecinu pomocí LC/MS.....	29
3.2.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS .....	30
3.2.4 Kvantifikace apidaecinu v tělních částech úlových včel pomocí LC/MS .....	30
<b>4 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>32</b>
4.1 Hmotnostně spektrometrická analýza standardu apidaecinu 1B přímým nástřikem .....	32
4.2 Stanovení retenčního času apidaecinu 1B.....	34

4.3 Příprava kalibrační sady apidaecinu pomocí LC/MS.....	35
4.4 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS .....	36
4.5 Kvantifikace apidaecinu v tělních částech úlových včel.....	37
4.5.1 Včely imunizované vpichem PBS.....	37
4.5.2 Včely po silném napadení kleštíkem včelím.....	39
<b>5 Závěr.....</b>	<b>41</b>
<b>6 Literatura.....</b>	<b>42</b>
<b>7 Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>	<b>45</b>

## **Cíle práce**

- Zpracování literární rešerše o imunitním systému hmyzu se zaměřením na sociální hmyz a včelu medonosnou
- Zpracování literární rešerše o fyziologických změnách během vývoje hmyzu s přeměnou dokonalou se zaměřením na změny v reaktivitě imunitního systému
- Zpracování přehledu včelích patogenů a jejich vlivu na imunitní systém včel
- Stanovení změn v humorálním imunitním systému včely medonosné za fyziologických a patologických podmínek

## 1 Úvod

Hmyz je vystaven mnoha biotickým i abiotickým stresorům. Pro úspěšné vypořádání s riziky využívá buněčné a molekulární obranné mechanismy, imunitu. Imunita bezobratlých je imunitou vrozenou, jedná se o nespecifické mechanismy složené z fyzikálních bariér, buněčné imunity a humorální imunity. Oproti obratlovcům postrádá hmyz adaptivní imunitní systém.

Jedním z nejdůležitějších aspektů humorální imunity je produkce antimikrobiálních peptidů. Produkce těchto peptidů je možná díky signálním drahám, které jsou aktivovány příslušnými receptory, které rozpoznávají patogenní částice. Antimikrobiální peptidy jsou povětšinou kationické či amfipatické biomolekuly, které reagují se záporně nabitými lipidovými membránami, čímž dochází k tvorbě kanálů, kterými z buňky unikají cytosolární molekuly a organely. Jiný princip antimikrobiální aktivity spočívá ve vazbě na komplex zodpovědný za správné skládání proteinů. Tento mechanismus byl popsán u apidaecinů působících na bakteriální buňky. Jedná se o peptidy skládající se z 18 aminokyselin bohaté na prolin.

Imunitní systém dospělých včel a včelího plodu (larvy, kukly) se značně liší. Plod investuje energii spíše do růstu a vývoje, má nízkou schopnost imunitní odpovědi. Imunita plodu je tvořena převážně buněčnou imunitou – hemocyty. Oproti dospělcům je aktivita fenoloxidasy, jednoho z klíčových enzymů humorální imunity, minimální. Rozdíl v imunitním systému je také mezi úlovými včelami (dělnice mladší 21 dní vykonávající práci v úle) a létavkami (starší dělnice vykonávající práci mimo úl). Se stárnutím včely dochází k úbytku hemocytů z důvodu nutnosti minimalizace energetického výdeje. Létavky mají také schopnost vyšší produkce antimikrobiálních peptidů. Sledování včelího zdraví je důležité pro udržení včelstev ve správné kondici, aby tak byly včely schopné vykonávat své opylovací povinnosti a mj. tak udržovat biodiverzitu.

Včely, jakožto organismy žijící ve velké skupině, jsou náchylné k šíření patogenů. Většina patogenů napadá buď včelí plod, nebo dospělce. Plod je citlivý na bakteriální, houbové a virové infekce. Dospělé včely jsou citlivé na infekci houbami, roztoči a viry.

## **2 Současný stav řešené problematiky**

### **2.1 Imunita hmyzu**

Hmyz je téměř všudypřítomný, je proto vystaven různým, potenciálně nebezpečným organismům. Přesto je schopen úspěšného vypořádání s těmito riziky pomocí buněčných a molekulárních obranných mechanismů, známých jako imunita (Rosales, 2017).

Na infekci reagují okamžitě nespecifické mechanismy, které označujeme jako vrozený imunitní systém. Ten se skládá z fyzikálních bariér, humorální imunity a imunity buněčné (Rosales, 2017). Humorální imunita stojí mimo jiné na produkci antimikrobiálních peptidů, imunitní odpověď na buněčné úrovni je zprostředkována hemocyty, což jsou buňky cirkulující v hemolymfě. Nelze přesně vymezit hranice mezi humorální a buněčnou imunitou, některé humorální faktory ovlivňují funkci hemocytů, které jsou zároveň zdrojem antimikrobiálních peptidů. Oproti obratlovcům postrádá hmyz adaptivní imunitní systém, není tedy schopen rozpoznávat patogen specificky (Neubauerová et al., 2009).

#### **2.1.1 Fyzikální bariéry**

Fyzikální bariéry zahrnují integument a peritrofickou membránu. Integument, vnější vrstva těl hmyzu, je tvořen jednou vrstvou buněk pokrytých mnohvrstevnou kutikulou (Rosales, 2017). Kutikula je složena z polysacharidu chitinu, proteinu sklerotinu a lipidů. Podíl zastoupení chitinu a sklerotinu určuje míru tvrdosti nebo pružnosti kutikuly (Beckerová, 2017). Kutikula pokrývá také rozmnožovací cesty, přední a zadní střevo i tracheje. Na těchto místech je pro patogeny obtížnější proniknout do organismu (Ashida, 1995).

Peritrofická membrána je vrstva nerozpustného polysacharidu chitinu a glykoproteinu pokrývající střední část zažívacího traktu. Funguje jako bariéra proti drsným částicám potravy a střevním patogenům. Membrána je však semipermeabilní, a proto není účinná proti virům. Představuje primární ochranu hemocoelu. Jakmile patogeny vstoupí do těchto bariér, dojde k aktivaci buněčné a humorální imunitní odpovědi (Rosales, 2017).

## 2.1.2 Buněčná imunita

Buněčná imunita reaguje okamžitě po vniknutí patogenu do hemocoelu. Vzhledem k existenci mnoha druhů hmyzu je možná celá řada imunitních odpovědí. Ve většině hmyzu však bylo popsáno několik běžných typů odpovědí, jedná se o fagocytózu, nodulaci, enkapsulaci, koagulaci hemolymfy a cytotoxicitu, která je zprostředkována produkcí reaktivních kyslíkových radikálů. Tyto procesy jsou umožněny díky přítomnosti různých typů hemocytů v hemolymfě (Butolo et al., 2021; Rosales, 2017).

## 2.1.3 Hemocyty

V hmyzí říši existuje mnoho typů hemocytů, které lze třídit dle různých kritérií. Klasifikace na základě morfologie často dostatečně nekoreluje s funkcí. Pomocí průtokové cytometrie došlo k separaci tří hlavních typů hemocytů – velkých granulárních buněk, malých semigranulárních buněk a malých hyalinních buněk (Rosales, 2017). Další třídění bylo provedeno za použití antigenních a molekulárních markerů (Strand, 2008). Všechny hmyzí hemocyty obsahují jádro (Kodrík, 2004).

### 2.1.3.1 Hemocyty octomilky obecné

U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) byly definovány tři typy hemocytů. Jedná se o krystalové buňky, plasmocyty a lamelocyty (Strand, 2008).

Krystalové buňky jsou poměrně velké, neadhezivní buňky obsahující krystalické inkluze. Tvoří přibližně 5 % celkového obsahu hemocytů. Produkují zymogen profenoloxidasu (proPO), jež je aktivován během melanizace. Zásoby melaninu jsou důležité pro hojení ran a enkapsulaci (Rosales, 2017).

Plasmocyty tvoří přibližně 90–95 % celkového obsahu hemocytů. Jedná se o poměrně malé buňky, které však oplývají výběžky. Buňka žije po celou dobu života octomilky (40–50 dní). Hlavní funkcí je fagocytóza a enkapsulace parazitů (Rosales, 2017; Kodrík, 2004). Jsou značně adhezivní. Zralé plasmocyty produkují peroxidasin (PXDN, EC 1.11.1.7), jedná se o enzym nacházející se v mezibuněčné hmotě (Strand, 2008).

Lamelocyty jsou ploché buňky vyskytující se pouze v larválním stádiu octomilky. Zodpovídají za enkapsulaci (Rosales, 2017). Jsou detekovatelné pouze v případě napadení larvy parazitem, kdy se diferencují z prohemocytů. Prohemocyty jsou prekurzorové buňky, které jsou uloženy primárně v hematopoetických orgánech (Strand, 2008).

### **2.1.3.2 Hemocyty včely medonosné**

Včela medonosná (*Apis mellifera*) oplývá několika typy hemocytů. Jedná se například o prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, oenocyty, koagulocyty a adipocyty (Beckerová 2017, Strand 2008).

Prohemocyty jsou nejmenší hemocyty zastoupené v hemolymfě. Mají kulovitý tvar a jedná se stejně jako v případě *D. melanogaster* o prekurzorové buňky. Neobsahují organely. Plasmocyty jsou tvarově značně variabilní, obsahují množství drsných endoplasmatických retikul, Golgiho aparátů a mohou také obsahovat granule. Jedná se o nejběžnější typ hemocytů v hemolymfě s cílem fagocytovat (Amaral et al., 2010; Kodrík, 2004).

Granulocyty obsahují značné množství vakuol (Amaral et al., 2010). Jsou charakteristické množstvím membránově vázaných granulí. Hrají roli při tvorbě nodulů a koagulaci hemolymfy (Kodrík, 2004). Na povrchy patogenů se vážou velice silně (Strand, 2008).

Oenocyty se řadí mezi větší hemocyty. Jsou neadhezivní a obsahují komponenty fenoloxidasové kaskády, která je velice důležitá pro včelí imunitu (Amaral et al., 2010; Strand, 2008). Koagulocyty se uplatňují v procesu srážení hemolymfy (Browne et al., 2013). Adipocyty obsahují tukové kapénky, mají malé jádro (Kodrík, 2004).

### **2.1.4 Mechanismy buněčné imunity**

Imunitní odpověď hmyzu začíná navázáním granulocytu či plasmocytu na neznámý povrch nebo na jiné buňky. Tato adheze vede k fagocytóze a také k tvorbě nodulů nebo enkapsulaci (Rosales, 2017).

#### **2.1.4.1 Fagocytóza**

Jedná se o buněčnou odpověď, kdy buňky rozpoznají, navážou se a pohltnou relativně velkou částici. Hemocyty mohou fagocytovat jak biotické, tak syntetické částice (Lavine & Strand, 2002). Rozeznání příslušné částice může být přímé díky specifickým receptorům na povrchu buňky, nebo nepřímé pomocí extracelulárních proteinů opsoninů, které pokryjí částici pro schopnost rozpoznání fagocytickými receptory. Po rozpoznání opsoninů dojde ke spuštění intracelulární kaskády, která končí pohlcením částice (Rosales, 2017).

Proces fagocytózy je řízen lektiny, které se nachází k hemolymfě spolu s lysozymem (EC 3.2.1.17). Přítomnost Gram-negativních (G-) bakterií způsobí navázání N-acetylglukosamin-specifických lektinů na glykosylované části buněčné stěny. Následně se lektiny navážou na plasmocyty a indukují fagocytózu. Lysozym štěpí peptidoglykanové vrstvy, což způsobuje odkrytí kyseliny teichoové a lipomannanu. To je rozpoznáno dalším typem lektinů (Browne et al., 2013). Vzniká fagolysosom a příslušný patogen je usmrcen či degradován efektorovými molekulami (Lavine & Strand, 2002).

#### **2.1.4.2 Nodulace**

Tento mechanismus je aktivován, pokud fagocytická odpověď není dostatečně úspěšná. Uplatňuje se hlavně v případech, kdy se musí organismus vypořádat s velkým množstvím bakterií. Hemocyty nejprve obklopí bakterii a poté se připojí k ostatním za tvorby malých agregátů. Tyto agregáty rostou připojováním dalších hemocytů až do vytvoření velké nodule. Nakonec je nodule pokryta vrstvami plochých hemocytů a melanizována (viz kapitola 2.1.9). Při tvorbě nodulí se uplatňují např. eikosanoidy či proPO (Rosales, 2017). Mikroorganismy pravděpodobně hynou následkem fyziologického stresu, některé však mohou v nodulích přežít po celý život hostitele (Šťastná, 2016).

#### **2.1.4.3 Enkapsulace**

Proces enkapsulace se uplatňuje v případě napadení větším patogenem. Hemocyty cizorodý objekt obklopí několika vrstvami. Kapsule je poté melanizována a patogen usmrcen reaktivními cytotoxickými produkty nebo nedostatkem kyslíku (Rosales, 2017).

#### **2.1.4.4 Melanizace**

Melanizace spočívá v tvorbě melaninu. Tvorba melaninu je aktivována v procesu hojení ran a v rámci vytváření nodulí či kapsulí při obraně proti patogenům. Klíčovým enzymem je fenoloxidasa (PO, EC 1.14.18.1), viz kapitola 2.1.9 (Rosales, 2017).

#### **2.1.5 Humorální imunita**

Jedním z prvních identifikovaných mechanismů obranných reakcí hmyzu je produkce antimikrobiálních peptidů (AmP). Produkce AmP je možná díky několika signálním drahám, které jsou spuštěny specifickými receptory. Mezi další obranné reakce hmyzu



patří fenoloxidasová kaskáda, immune priming či specifické odpovědi na virové infekce (Rosales, 2017; Mikonranta et al., 2014).

### **2.1.6 Antimikrobiální peptidy *A. mellifera***

V hmyzí říši bylo popsáno více než 200 AmP. Některé hmyzí genomy kódují velké množství AmP, ale pouze 7 jich bylo nalezeno v hemolymfě včely medonosné. V mateří kašičce byly detekovány další isoformy určitých AmP. Peptidy secernované do hemolymfy se vzájemně doplňují a mají za cíl zničit mikrobiální buňky. Aktivitu vykazují proti prvokům, bakteriím a houbám. Některé peptidy však cílí primárně na jeden typ patogenu (Daníhlík et al., 2016).

Jedná se o různorodou skupinu látek s rozmanitou antimikrobiální aktivitou. Většinou jde o kationické nebo amfipatické peptidy, které jsou tudíž schopny interagovat se záporně nabitými lipidovými membránami obsahujícími lipopolysacharidovou vrstvu (LPS). Interakcí s membránovými komponenty dochází k formování kanálů, kterými z buňky patogenu unikají ionty, metabolity, případně až proteiny, což má fatální následky. Některé AmP jsou schopny interagovat s proteiny uvnitř cizorodé buňky, DNA či RNA. AmP cílí na prokaryotické buňky, které mají ve srovnání s buňkami eukaryotickými nižší membránový potenciál (Daníhlík et al., 2016). V následujících podkapitolách jsou popsány AmP, které byly nalezeny u *A. mellifera*.

#### **2.1.6.1 Apidaeciny**

Jedná se o malé peptidy bohaté na prolin skládající se z 18 aminokyselin. Zvýšená produkce apidaecinů je pozorována brzy po propuknutí infekce. Nejvyšší koncentrace v hemolymfě je však dosaženo po 36 hodinách. Analýza včelí komplementární DNA (cDNA) ukázala přítomnost tří isotypů mRNA, které kódují různé apidaeciny (Daníhlík et al., 2016).

Apidaeciny vykazují aktivitu vůči G<sup>-</sup> bakteriím. Prochází lipidovou dvouvrstvou bez lytického efektu a jsou schopny vázat se na GroEL–GroES komplex, který je zodpovědný za skládání proteinů. Za správné navázání na receptorovou molekulu bakteriální membrány je odpovědný C<sup>-</sup> konec peptidu (Daníhlík et al., 2016).

### 2.1.6.2 Abaecin

Abaecin je dalším AmP s vysokým obsahem prolinu. Jeho prekursor obsahuje signální sekvenci o velikosti 19 aminokyselin, která je odštěpena po aktivaci peptidu. Konečný peptid obsahuje 33–34 aminokyselin. Inhibuje růst Gram-pozitivních (G+) bakterií. Tento peptid byl nalezen také v hemolymfě čmeláků, zde je však *O*-glykosylovaný. Studie prokázaly mírnou dědičnost exprese abaecinu, hladiny abaecinu by proto mohly být důležitým markerem pro selekci rezistenčních včelstev (Daníhlík et al., 2016).

### 2.1.6.3 Defensiny

V genomu *A. mellifera* byly nalezeny dva různé geny kódující defensin. První defensin byl izolován z mateří kašičky a byl pojmenován royalisin. Studie dále prokázaly defensin jako hlavní antimikrobiální součást medu. V obou případech se jedná o isoformy defensinu-1. Jedná se o peptidy obsahující 51 aminokyselin bohaté na cystein a tvořící tři disulfidové můstky mezi šesti cysteiny. Defensin-1 je produkován při bakteriálních infekcích, zatímco defensin-2 reaguje na přítomnost LPS. Defensin-1 nacházející se v hemolymfě cílí na G<sup>-</sup>, G<sup>+</sup> bakterie i houby, royalisin pouze na G<sup>+</sup> bakterie (Daníhlík et al., 2016).

### 2.1.6.4 Hymenoptaecin

Jedná se o lineární peptid skládající se z 93 aminokyselin, obsahuje mnoho glycinu. Inhibuje růst G<sup>-</sup> i G<sup>+</sup> bakterií. Jeho exprese je masivně posílena při napadení dospělé včely i plodu (Daníhlík et al., 2016).

### 2.1.6.5 AmP mateří kašičky a včelího jedu

Mimo royalisin byly v mateří kašičce identifikovány 4 typy peptidů, označované jako jelleiny. Produkují je dělnice a secernují je do kašičky. Jelleiny-1, 2 a 3 vykazují antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám, G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím, jelleiny posledního typu však nevykazují žádnou antimikrobiální aktivitu. Toto je pravděpodobně způsobeno chybějícím leucinem na C<sup>-</sup> konci jelleinů-4 (Daníhlík et al., 2016).

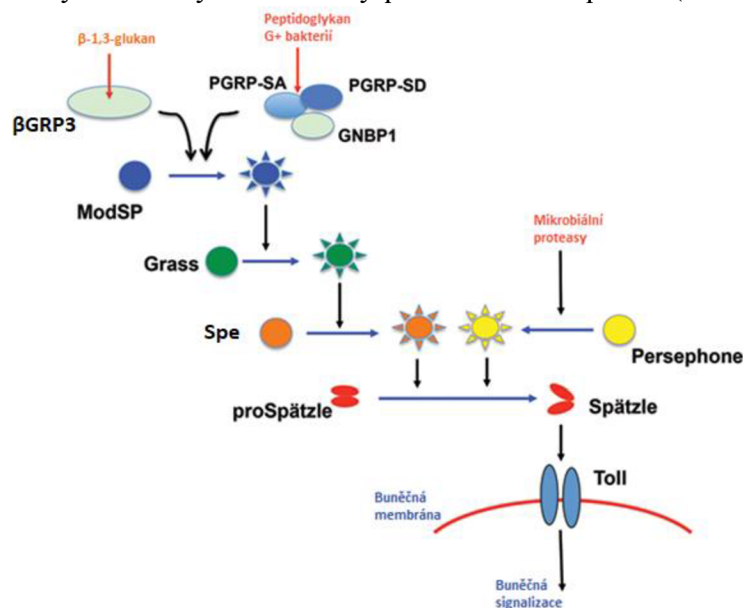
Hlavním peptidem včelího jedu je melittin. Jedná se o amfipatickou molekulu s lytickou aktivitou působící na G<sup>-</sup> a G<sup>+</sup> bakterie. Dalšími peptidy ve včelím jedu jsou apamin, melectin, či macropin, vyskytující se u solitárně žijící včely *Macropis fulvipes* (Daníhlík et al., 2016).

## 2.1.7 Signální dráhy aktivující geny kódující AmP

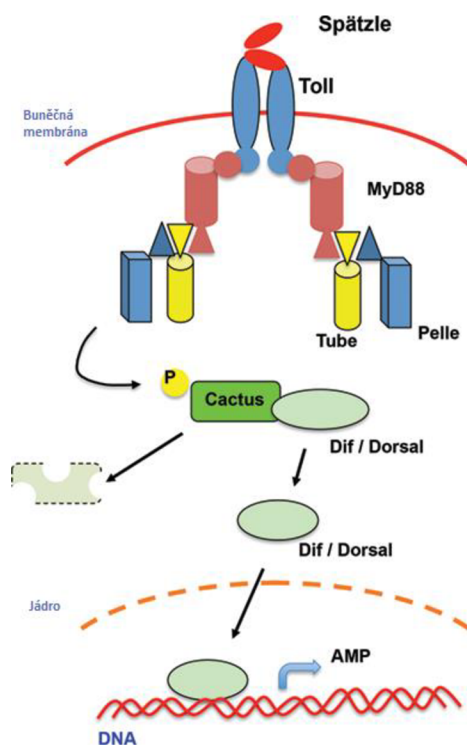
Jakmile je mikroorganismus detekován patogen rozpoznávajícími receptory (PRR), dochází k aktivaci signálních drah uvnitř buňky způsobující adekvátní odpověď. Převážně dochází k uvolňování AmP tukovým tělesem. K tomuto slouží signální dráha Toll, dráha imunitní nedostatečnosti (Imd) a Janus kinasa (EC 2.7.10.2) – převodník signálu a aktivátor transkripce (JAK-STAT) dráha. G<sup>+</sup> bakterie a houby působí převážně na signální dráhu Toll, G<sup>-</sup> aktivují Imd (Rosales, 2017).

### 2.1.7.1 Toll signální dráha

Toll je transmembránový receptor jehož aktivace vyžaduje proteolyticky štěpenou formu extracelulárního peptidu Spätzle (Obr. 1). Komponent buněčných stěn hub  $\beta$ -1,3-glukan a peptidoglykan G<sup>+</sup> bakterií jsou rozpoznány příslušnými receptory (glukan a peptidoglykan rozpoznávající proteiny –  $\beta$ GRP3 a PGRP). Tyto interakce iniciují proteasové kaskády sbíhající se na úrovni serinových proteas ModSP, které následně aktivují proteasu Grass. Tato proteasa aktivuje Spätzle processing enzym (Spe). Některé mikrobiální proteasy mohou být detekovány proteasou Persephone (Rosales, 2017).



Obr. 1: Proteasová kaskáda nutná pro Toll aktivaci. Horizontální modré šipky reprezentují proteolytickou přeměnu proenzymů (kolečka) na aktivní formy (hvězdy). Vertikální černé šipky zobrazují místo aktivace proteas. Toll ligand Spätzle je aktivován sérii proteas, k jejichž aktivaci dochází po rozpoznání patogenů příslušnými receptory (upraveno dle Rosales, 2017).

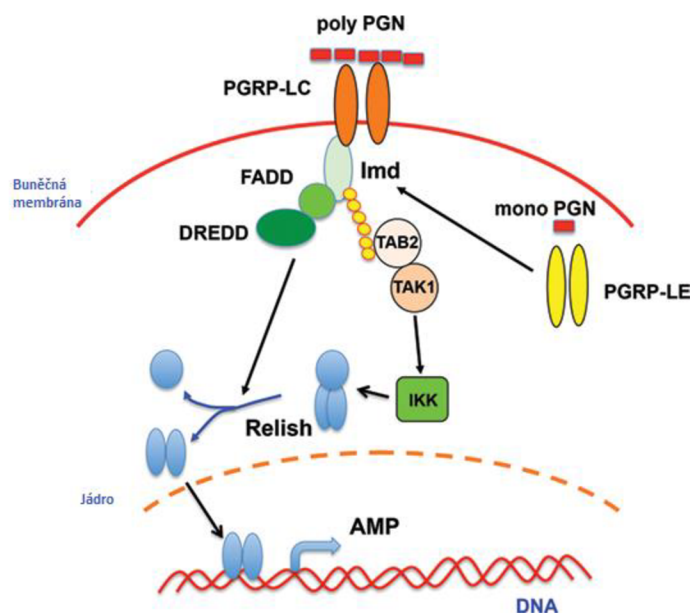


Obr. 2: Toll signální dráha. Po rozpoznání Spätzle dochází k dimerizaci Toll receptoru a navázání adaptorových proteinů, ústící ve fosforylaci a degradaci inhibitoru transkripčních faktorů Cactus. Transkripční faktory Dorsal nebo Dif se uvolní, translokují do jádra, kde aktivují transkripci AmP (upraveno dle Rosales, 2017).

Navázáním Spätzle na Toll receptor dochází k dimerizaci intracytoplasmatických domén a navázání adaptorového proteinu MyD88 (Obr. 2). Tento protein váže další adaptorový protein, Tube, jež naváže protein Pelle. Tím dochází k transdukci signálu na Cactus, inhibitor transkripčních faktorů kappa B (NF- $\kappa$ B), vrcholící jeho autofosforylací a degradací. Výsledkem této signální dráhy je uvolnění NF- $\kappa$ B, jejich translokace do jádra a aktivace transkripce AmP (Rosales, 2017). Touto dráhou je regulována exprese např. defensinu-1 (Daníhlík et al., 2016).

### 2.1.7.2 Imd signální dráha

K aktivaci této dráhy dochází, jakmile peptidoglykan rozpoznávací proteiny, konkrétně PGRP-LC a PGRP-LE navážou meso-diaminopimelovou kyselinu (DAP), která je součástí peptidoglykanu většiny G<sup>-</sup> bakterií. Výsledkem je signální dráha, která ústí v aktivaci NF- $\kappa$ B transkripčního faktoru Relish (Obr. 3) (Rosales, 2017).



Obr. 3: Imd signální dráha. Polymerický DAP-peptidoglykan (PGN) je rozpoznán PGRP-LC. Imd se váže na Fas-asociovaný protein s doménami smrti (FADD), což vyvolá připojení FADD-death-related ced-3/Nedd2 proteinu (DREDD). DREDD štěpí Imd, který je aktivován ubiquitinací (polyubikvitin značí žlutá kolečka). Dochází k napojení TAK1-asociovaného vázaného proteinu (TAB2) a aktivaci transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ )-aktivační kinasy 1 (TAK1). TAK1 aktivuje komplex IKK, který fosforyluje Relish. Pro proces je nutný také DREDD. Po uvolnění se Relish translokuje do jádra, kde aktivuje transkripci AmP. Intracelulárně může být rozpoznán monomerní peptidoglykan receptorem PGRP-LE (upraveno dle Rosales, 2017).

### 2.1.7.3 JAK-STAT signální dráha

Tato dráha byla nejprve popsána jako dráha zodpovědná za regulaci mnoha procesů v rámci humánní imunity, např. aktivaci leukocytů. Až posléze došlo ke zkoumání této dráhy ve hmyzí říši. Oproti tomu výše zmíněné signální dráhy byly popsány zprvu u *D. melanogaster* (Rosales, 2017).

Oproti drahám Toll a Imd, které regulují produkci AmP, tato dráha reguluje produkci dalších látek, jako jsou cytokiny a stresové proteiny. Tyto látky jsou však také produkovány tukovým tělesem. Byla dokázána aktivita této dráhy při napadení organismu virem (Rosales, 2017).

### 2.1.8 Imunitní reakce proti virovým infekcím

Existují viry, které napadají pouze hmyzí buňky, stejně tak ale viry, které jsou přeneseny na savce po kousnutí napadeným hmyzem. Porozumění imunitní odpovědi hmyzu na virovou nákazu má tedy značnou medicínskou i hospodářskou důležitost (Rosales, 2017).

Hlavním mechanismem obrany je dráha RNA interference (RNAi). Dochází k rozpoznání virové dvouvláknové RNA, což vyvolá produkci malých interferujících RNA (siRNA). Tyto siRNA cílí na degradaci virální RNA, čímž dochází k přerušení replikace viru. Některé viry jsou však schopny produkovat RNAi supresorové proteiny, které blokují syntézu siRNA (Rosales, 2017).

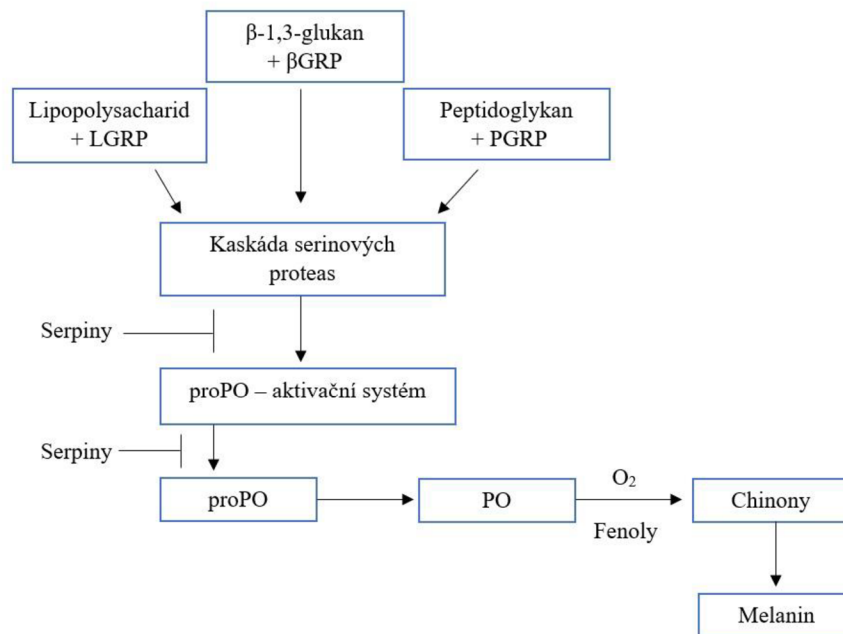
Pro zvládnutí virové nákazy jsou důležité i další signální dráhy. JAK-STAT dráha funguje stejně jako savčí systém interferonů. Buňka napadena virem vyšle signál aktivující tuto dráhu v sousední neinfikované buňce, což vede k antivirové aktivitě (Rosales, 2017).

Dalším z obranných mechanismů je autofagie, kdy uvnitř buňky dochází k tvorbě autofagosomů. Tyto váčky jsou schopny pohltit částice v cytoplasmě, např. poškozené organely a proteiny. Autofagosom následně splyne s lysozomem a degraduje svůj obsah (Rosales, 2017).

### **2.1.9 Fenoloxidasová kaskáda**

Přítomnost cizích objektů jako jsou parazité či mikroorganismy a mechanické poškození tkáně ústí v ukládání melaninu okolo patogenu či tkáně. Melanin proto obalením patogenu znemožní či zpomalí jeho růst. Tvorba melaninu je konečným krokem fenoloxidasové kaskády (Obr. 4), během které však vzniká také množství vysoce reaktivních a toxických chinonových meziproductů. Za tuto tvorbu zodpovídá PO, k jejíž aktivaci dochází sérii proteolytických reakcí (Cerenius & Söderhäll, 2004).

Reakce ústící v aktivaci PO označujeme jako proPO – aktivační systém. Sestává se z proteinů schopných navázat se na polysacharidy a další molekuly, které jsou součástí mikroorganismů, proteas, které se aktivují přítomností výše zmíněných mikrobiálních produktů a dalších faktorů regulujících celý systém, např. inhibitorů proteas – serpinů (Dostálková, 2016). PO následně katalyzuje prvotní kroky tvorby melaninu, jedná se o oxygenaci monofenolů na *o*-difenyly a následnou oxidaci *o*-difenyly na *o*-chinony (Cerenius & Söderhäll, 2004).



Obr. 4: Schéma fenoloxidasové kaskády. Cizorodé částice jsou rozpoznány příslušnými patogen rozpoznávajícími receptory ( $\beta$ GRP, LGRP, PGRP). Sérii serinových proteas dochází k rozštěpení inaktivní formy profenoloxidasu (proPO) na aktivní fenoloxidasu (PO). PO následně katalyzuje oxygenaci fenolů a oxidaci difenolů. Kaskádu regulují serpiny (upraveno dle Cerenius & Söderhäll, 2004).

### 2.1.10 Immune priming

Pokud jsou obratlovci napadeni patogenem, se kterým se již jejich organismus setkal, mají na obrannou reakci připraveny protilátky produkované adaptivním imunitním systémem. Bezobratlí však tento imunitní systém nemají, přesto již studie prokázaly, že organismus, který byl již infekci jednou vystaven, má lepší schopnost vypořádání se s opakovanou infekcí. Tento fenomén byl nazván immune priming. Objev naznačuje, že vrozený a adaptivní imunitní systém si je funkčně blíže, než bylo předpokládáno. Přesné mechanismy, které by vysvětlovaly immune priming, však stále nejsou známy. Jak ukazuje studie Mikoranta et al. (2014), larvy *Parasemia plantaginis* vykazují mnohem menší mortalitu při inokulaci *Serratia marcescens*, pokud jsou předtím orálně vystaveny stejnému patogenu v neinfekční dávce.

### 2.1.11 Sociální imunita

Sociální hmyz je vystaven vyššímu riziku přenosu nemocí, jelikož žije ve velkých koloniích. Pro snížení tohoto rizika jsou nutné individuální i skupinové obranné mechanismy. Mechanismy, které obnášejí kolektivní akce pro předejití, potlačení či vymýcení onemocnění, se nazývají sociální imunita. Modelovým organismem

pro studium sociální imunity je *A. mellifera*. Tyto obranné mechanismy mohou být značně konstitutivní (běžně prováděné, první linie obrany), nebo indukovatelné, které jsou aktivnější až jako odpověď na vystavení patogenu. Mezi konstitutivní sociální obranné mechanismy patří allogrooming a čistící pud, zatímco mezi indukovatelné patří přidělení pracovních úkolů. V rámci individuální imunity patří ke konstitutivním mechanismům fenoloxidasová kaskáda, produkce AmP náleží k indukovatelným mechanismům (López-Urbe, 2017).

Allogrooming spočívá v odstraňování cizorodých částic a nečistot z těl dalších jedinců ve společenstvu. Čistícím pudem rozumíme schopnost včely rozpoznat a odstranit larvy a kukly infikované patogenem. Včely musí poškozený plod odstranit dříve, než v něm patogen dospěje do infekčního stádia. Včely odstraňují z úlu mrtvé jedince, zároveň však často samy hynou mimo úl, aby snížily riziko napadení úlu patogenem. Jsou také schopny udržovat v úlu stálou teplotu. Jakmile se do úlu dostane cizí jedinec, obklopí jej a dokáže zvýšit teplotu až na 45 °C, čímž jej usmrtí (Evans & Spivak, 2010).

Antimikrobiální látky mohou včely produkovat, nebo sbírat. Sbírají rostlinnou pryskyřici, kterou vystylají celý úl. Sběh je konstitutivní, je však zvýšen v případě napadení patogenem. Antimikrobiální látky včely produkují pro ochranu celé skupiny a jsou přidávány do potravy. Mezi hlavní antimikrobiální látky produkované včelami patří glukosaoxidas (GOX, EC 1.1.3.4), která oxiduje glukosu na kyselinu glukonovou za uvolnění peroxidu vodíku. Ten má antiseptické vlastnosti. Další důležitou látkou je antimikrobiální peptid defensin. Obě látky tvoří složku konstitutivních obranných mechanismů, po infikování včelstva patogenem totiž nedochází k zvýšení jejich produkce (López-Urbe, 2017).

## **2.2 Vývoj hmyzu s proměnou dokonalou**

Více než 80 % hmyzích druhů prochází významným typem metamorfózy (proměny), kdy je mezi stádium larvy a dospělce vmezeřeno stádium kukly. Tělo hmyzu je během tohoto stádia kompletně přestavěno. Tuto proměnu nazýváme proměnou dokonalou, která se mimo jiné vyznačuje tím, že se tělo larvy významně liší od těla dospělce (Rolff et al., 2019).

Včely patří mezi živočichy, kteří prochází tímto typem proměny. V následujících podkapitolách jsou popsány jednotlivá vývojová stádia, stejně jako rozdělení včel dle kast a funkce ve včelstvu.



### **2.2.1 Kasty včelího společenství**

Včely žijí v početných společenstvech, ve včelstvech, která vznikla v rámci přizpůsobování se životním podmínkám. Ta se skládají z oplozené matky (královny), trubců a dělnic (Veselý, 2013). V rámci včelstva jsou běžně desítky tisíc dělnic, až tisíc trubců a jedna královna (Page & Peng, 2001).

#### **2.2.1.1 Královna**

Jedná se o nepostradatelnou členku včelstva, o oplozenou samičku. Zajišťuje obnovu dělnic a trubců, denně klade až 1500 vajíček. Včelstva bývají značně monogynní (jednomatečná), výjimečně však mohou klást zároveň matka s dcerou. O královnu pečují úlové včely, které ji krmí výměškem hltanových žláz a čistí ji (Veselý, 2013).

Královna měří 20–25 mm. Mimo kladení vajíček nevykonává další práce, proto nemá plně vyvinuty voskotvorné či hltanové žlázy. Vyznačuje se nápadně dlouhým zadečkem, ten je vyplněn pohlavními orgány, především mohutnými vaječníky. Královna je ovšem důležitá také z hlediska produkce mateří látky. Mateří látka je produktem kusadlové žlázy, jedná se o feromon kolující v potravě. Díky němu dochází ke spojování příslušných jedinců ve společenství. Potlačuje rojovou náladu včel a je základem dělby práce ve včelstvu. Mateří látka je předávána s regurgitovanou potravou úlovými včelami, ty ji získávají olizováním těla matky (Veselý, 2013).

Matka se páří pátý až osmý den po vylíhnutí v rámci snubních letů. Páří se postupně s 6–10 trubci, o oplozenou matku následně pečují úlové včely. Po 5–17 dnech po spáření začne klást vajíčka. Pokud je nedokonale osemeněná nebo neosemeněná, klade pouze neoplozená vajíčka, v takovém případě se jedná o trubcokladnou matku. Výkonná matka klade vajíčka souvisle a pravidelně, mezerovitý plod značí problém. Královny mohou žít 3–4 roky (Veselý, 2013).

#### **2.2.1.2 Trubci**

Jedná se o včelí samce. Rodí se partenogenezi z neoplozených vajíček a ve včelstvu se vyskytují v letních měsících. Oproti ostatním kastám mají zavalitější tělo a nemají žihadlo. Ve včelstvu se nepodílejí na žádné pracovní činnosti, jediným posláním je osemenění matky. Jakmile nastane nedostatek nektaru či medovice, dělnice trubce z úlu vyhazují a matka již neklade vajíčka do trubčích plástů. Vyhazují však pouze staré trubce.

Trubci nejsou věrni svému včelstvu a jejich přelétávání do cizích včelstev může podpořit šíření onemocnění (Veselý, 2013).

### **2.2.1.3 Dělnice**

Jedná se o nejpočetnější kastu ve včelstvu, určuje jeho ráz. Dělnice se líhnou z oplozených vajíček stejně jako matky, kvalita potravy během larválního vývoje však předurčí nedokonalý vývin vaječnicků, nemohou proto být nikdy osemeněny. Rozlišujeme je na úlové včely a létavky. Úlohy dělnic ve včelstvu se mění se stářím včely, které se projevuje také změnami v anatomii a fyziologii (Veselý, 2013).

Úlové včely vykonávají práci v úlu. Po vylíhnutí mají malé žlázy s nízkou sekreční aktivitou. Okolo 3.–5. dne života začíná docházet k produkci enzymu invertasy (EC 3.2.1.26) hlitanovými žlázami, který je potřeba pro přeměnu nektaru na med. Tyto žlázy jsou plně vyvinuty okolo 6.–11. dne života. Proto dělnice tohoto věku krmí larvy (krmička, kojička) (Page & Peng, 2001). Plod také zahřívají, krmí i matku a mladé trubce (Veselý, 2013). Voskové žlázy dosahují plného vyvinutí během 10.–15. dne života, takto staré včely se podílejí na stavitelských pracích v úlu (stavitelky). Vonné žlázy, zodpovědné za produkci alarmujícího feromonu, dosahují maxima své aktivity během 2.–3. týdne života, čímž indukují defenzivní chování dělnice, která je v této době strážkyní (Page & Peng, 2001). Včely dle vůně poznávají své družky, k cizím se však chovají agresivně, primárně k cizí královně (Veselý, 2013).

Létavky vykonávají práce mimo úl. Přináší do něj nektar, vodu, rouskovaný pyl či propolis. Stáří včely můžeme poznat dle opotřebení těla. Létavky mají řídké brvy na zadečku a roztřepená křídla. Hlitanová žláza a žlázy voskové jim zakrňují, již je tolik nepoužívají (Veselý, 2013).

### **2.2.2 Vývoj včely medonosné**

Na začátku vývoje včely je vajíčko, to se následně mění v larvu, předkuklu, kuklu až dospělého jedince – imaga. Pojmeme včelí plod označujeme všechny fáze vývoje od vajíčka po kuklu. Plod se ve včelstvu vyskytuje od začátku zimy do podzimu (Veselý, 2013). V závislosti na kastě se liší doba vývoje. Královny se líhnout nejrychleji, dospělcem se stávají za 16 dní. Trubci potřebují pro vylíhnutí 24 dní, dělnice 21 (Page & Peng, 2001). Vývoj je značně ovlivněn teplotou a výživou. Nedostatečná výživa či nevhodná teplota prostředí růst zpomalují (Veselý, 2013).

### 2.2.2.1 Vajíčko

Vajíčko má tvar protáhlého válce, jeho horní konec je tlustší než spodní. Hlavička zárodku vzniká v horní části. Hmotnost a velikost vajíček jsou nepřímo úměrné nakladenému množství, pokud královna naklade v určitém období více vajíček, budou menší. Povrch tvoří dvě blány, vnější vaječná (chorion) a vnitřní žloutková (amnion). Vnější blána je síťována bradavičnatými výrůstky, na horním pólu vajíčka se však síť rozplývá v kráterové prohlubni, mikropyli. V tomto místě dochází k průniku spermií do vajíčka, včelí vajíčko je polyspermní. Vajíčko má buď 32 chromozomů (vývoj matky či dělnice), nebo poloviční množství, 16, v tomto případě dojde k vývinu trubce (Veselý, 2013).

### 2.2.2.2 Embryo

Zřetelné změny nastávají po 30 hodinách vývoje, kdy dochází ke vzniku zárodečných listů. Zárodek se příčnými rýhami rozdělí na 21 kroužků, prvních 6 vytváří hlavu včetně základů očí, tykadel a ústních ústrojů. Vývoj embrya trvá 70–76 hodin. Před zakončením zárodečného vývoje dochází k vlnitému pohybu zárodku. Embryo se krouživým pohybem podkovovitě ohne a položí na bok na dno buňky, ze zárodku se tak stává larva (Veselý, 2013).

S vývojem embrya souvisí také odlišná exprese genů. Po celou dobu embryonálního vývoje dochází k expresi základního proteomu, který je zodpovědný za syntézu proteinů, metabolickou energii, transport molekul a vývoj jedince. Tyto děje můžeme proto označit za ústřední děje embryogeneze (Fang et al., 2014).

U embryí mladších 24 hodin dochází k syntéze proteinů ovlivňujících úschovu živin a metabolismus nukleových kyselin, což odpovídá růstu buněk, ke kterému dochází v této fázi embryogeneze. Embrya stará 24–48 hodin vykazují tvorbu proteinů regulujících buněčný cyklus, transportujících molekuly, tvořících cytoskelet a proteinů s antioxidační aktivitou. Tato exprese odpovídá základní organogenezi. Mimo jiné dochází také k biosyntéze aminoacyl-tRNA a metabolismu  $\beta$ -alaninu. Starší embrya (48–72 hodin) syntetizují proteiny zapojené do metabolismu mastných kyselin a morfogeneze, což předpovídá vývoj orgánů (Fang et al., 2014).

### **2.2.2.3 Larva**

Při přeměně v larvu není v buňce žádná potrava, kterou dodávají krmičky. Všechny části vajíčka, včetně blán, jsou zužitkovány na formování těla larvy. Až po započetí dýchání a pohybu ústního ústrojí dochází k příchodu dělnic a krmení. Růst larvy je obdivuhodný, v potravě přímo plave (Veselý, 2013).

Zcela zásadní součástí larválního vývoje je určení, zda se bude dále vyvíjet královna či dělnice. Za toto odlišení zodpovídá převážně složení potravy a dochází k němu nejpozději během třetího dne larválního stádia. Stádium larvy trvá 5–6 dní, odlišná výživa trvající pouze 2–3 dny je tedy schopna určit budoucí kasty včely. Larvy, které jsou po celou dobu krmeny výměšky hltanových žláz, mateří kašičkou, rychleji rostou a přibývají na váze. Z těchto larev se vyvinou královny. Larvy, které jsou krmeny výměšky hltanových žláz, pylem a medem nerostou tak rychle, váží méně a vyvinou se v dělnice (Page & Peng, 2001).

Larva se během vývoje čtyřikrát svléká a na úplném konci poprvé kálí. V té chvíli je již v buňce vzprímená a začíná spřádat zámotek, kokon. Ten tvoří z jemného předuva, jež vzniká tuhnutím výměšek snovací žlázy. Předuvo je zpevněno výkaly a výměškem pokožky. Na konci larválního stádia buňku zavíčkují úlové včely (Veselý, 2013).

### **2.2.2.4 Předkukla a kukla**

V předkuklu se plod mění po vytvoření kokonu. Jedná se o krátké, ale velmi intenzivní stádium přeměny larvy v kuklu. Na konci má již předkukla vzhled dospělé včely (Veselý, 2013).

Kukla je morfologicky úplně podobná dospělé včele. Tělo je členěno na hlavu, hrud' a zadeček. Přestavba však probíhá uvnitř těla jedince, vznikají důležité orgány. Usuzovat stupeň vývoje můžeme dle zbarvení pokožky nebo složených očí. Oči nejprve zřůžovějí a ztmavnou, pokožka následně chitinizuje. Den před vylíhnutím dochází k poslednímu svlékání. Při líhnutí včela kusadly odstraní víčko a dostane se ven z buňky, čímž se z ní stává mladuška (čerstvě vylíhnutá včela) (Veselý, 2013). Královna stráví ve stádiu kukly méně dní než ostatní kasty, proto se vylíhne dříve (Page & Peng, 2001).

### **2.2.3 Změny imunitního systému během vývoje včely medonosné**

Mezi plodem a dospělcem včely je velký fyziologický i behaviorální rozdíl. To způsobuje různou citlivost k různým patogenům (Wilson-Rich et al., 2008). Spojení vývojového stádia a rizika napadení patogenem určuje, kolik bude včela investovat do své imunity (Laughton et al., 2011).

#### **2.2.3.1 Imunitní systém plodu**

Plod je upoután v plástvi, není tedy schopen pohybu a útěku od parazitů. Plod obecně vykazuje větší počty hemocytů než dospělec, kukly mají hemocytů nejvíce. Schopnost enkapsulace, kterou hmyz používá pro usmrcení patogenů, které nemohou být fagocytovány, se však během růstu či stárnutí včely nemění (Wilson-Rich et al., 2008).

Plod vykazuje nízkou PO aktivitu, ta se příliš neliší mezi larvami a kuklami. PO aktivita je však oproti aktivitě u dospělých včel téměř minimální (Wilson-Rich et al., 2008). Larvy trubců navíc v prvotních dnech larválního vývoje nevykazují téměř žádnou PO aktivitu. Nízká schopnost imunitní odpovědi je vysvětlována růstem v poměrně hygienických podmínkách včelstva. O plod se starají kojičky a krmičky, z tohoto důvodu investuje spíše do růstu a vývoje (Laughton et al., 2011).

#### **2.2.3.2 Imunitní systém dospělých jedinců**

Dospělé včely s věkem upouštějí od prací v úlu a začínají jej opouštět. Tento přechod je spojen i se změnami ve schopnostech imunitní odpovědi (Cappa et al., 2020). Přeměna úlové včely na létavku je spojena také se snížením prekursoru vaječného žloutku vitellogeninu, což zapříčiní buněčnou smrt hemocytů (Laughton et al., 2011). Snížení počtu hemocytů u dospělých včel je způsobeno také nutností snížení energetické náročnosti, a tedy přechodem od buněčné k humorální imunitě, což potvrzuje i vyšší hladina PO (Butolo et al., 2021).

Po vylíhnutí prudce stoupá PO aktivita. Starší včely (létavky) vykazují ze všech vývojových stádií nejvyšší PO aktivitu, s rostoucím věkem je více exprimován proPO gen (Wilson-Rich et al., 2008). Trubci vykazují nižší aktivitu PO než dělnice (Laughton et al., 2011). Úlové včely však mají větší tukové tělísko, což jim umožňuje produkovat více AmP (Wilson-Rich et al., 2008). Trubci nemohou příliš investovat do produkce AmP, v rámci imunitní odpovědi spoléhají převážně na PO (Laughton et al., 2011).

Včely strážkyně stojí svou schopností imunitní odpovědi mezi létavkami a mladšími úlovými včelami. Přestože hlídkují u vstupu do úlu, kontrolují včely a brání vstupu cizích jedinců, nevykazují zvýšenou aktivitu imunitního systému. Toto může být vysvětleno zvýšenou hladinou juvenilního hormonu, snížením koncentrace vitellogeninu a energetickou náročností strážící činnosti. Strážkyně svou funkci vykonávají pouze 1–3 dny, následně se z nich stávají létavky a do úlu se již nevracejí, nejedná se tedy o příliš velkou hrozbu z hlediska sociální imunity, a proto nevyžadují zvýšení obranyschopnosti (Cappa et al., 2020).

## **2.3 Včelí patogeny**

Organismy žijící ve velkých skupinách jsou náchylné k šíření patogenů. Včelstvo představuje optimální podmínky inkubátoru pro růst patogenů a jejich horizontální přenos. Zároveň je tento „inkubátor“ plný až desítek tisíců citlivých hostitelů. U obranných strategií je rozlišována rezistence a tolerance. Rezistence označuje schopnost potlačit rozšíření patogenů, zatímco tolerance představuje snížení újmy způsobené rozšířením patogenu. Společenstvo tvořené rezistentními jedinci k určitému patogenu bude pravděpodobně rezistentní i na úrovni celého společenství. Pokud však nejsou všichni jedinci rezistentní k patogenu, společenstvo bude pravděpodobně tolerantní. Společenstvo sestávající se z jedinců tolerujících určitý patogen se může stát rezistentním (Kurze et al., 2016).

Většina patogenů napadá buď včelí plod, nebo dospělé, jen minimum napadá veškerá vývojová stadia. V úlu se běžně nachází mnoho patologických mikroorganismů v tolerovatelných množstvích. Včelí plod je citlivý na bakteriální, houbové a virové infekce. Dospělé včely jsou citlivé na infekce houbami, které byly dříve označovány za prvoky (např. hmyzomorka včelí), roztoče a viry (Wilson-Rich et al., 2008).

### **2.3.1 Choroby včelího plodu**

#### **2.3.1.1 Mor včelího plodu**

Mor včelího plodu je způsoben sporulující G<sup>+</sup> bakterií *Paenibacillus larvae*. Spory této bakterie mohou přežívat v potravě pro larvy i v půdě po mnoho let, bakterie jsou také rezistentní k vysokým teplotám (Hansen & Brødsgaard, 2015).

*P. larvae* napadá larvy všech kast ve včelstvu. Nejcitlivější jsou larvy mladší 24 hodin. Spory z kontaminované potravy klíčí v lumenu střeva a prochází peritrofickou membránou. Bakterie se následně množí v hemocoelu. Následkem je úhyn larvy, rozložení jejího těla a opětovná sporulace bakterie. Úlové včely následně plástev uklízí, čímž se spory znovu dostávají do oběhu. Dospělé včely jsou rezistentní, mohou však přenášet bakterii po dlouhou dobu a zapříčinit infekci, pokud se spory dostanou do potravy larev. Pokud včela „ukrade“ med z infikovaného včelstva, může dojít k přenosu mezi koloniemi (Hansen & Brødsgaard, 2015).

Pokud dojde k úhynu plodu v pozdním larválním stádiu, či stádiu kukly, zůstává mrtvý jedinec v zavíčkované buňce. Víčko však bývá propadlé a tmavé, často může být také protržené činností včel, které se snaží plástev vyčistit. Plod umírajícího včelstva je mezerovitý, v nezavíčkovaných plástvích jsou mrtvé larvy. Mrtvé larvy se rozkládají na hnědou, mazlavou, zapáchající hmotu, která se lepí na sirku (Hansen & Brødsgaard, 2015).

Pro včelstvo je při nákaze *P. larvae* velice důležitá sociální imunita, konkrétně čistící pud. Larvy při infekci produkují více proPO, lysozymu a hymenoptaecinu. Aktivita PO se zvyšuje v larvách starších 24 hodin, i proto je u starších larev vyšší šance, že infekci přežijí (Chan et al., 2009).

### **2.3.1.2 Hniloba včelího plodu**

Původcem tohoto onemocnění je G<sup>+</sup> anaerobní bakterie *Melissococcus plutonius* (Biová et al., 2021). Nejcitlivější jsou larvy v nezavíčkovaných buňkách staré 4–5 dní. Infikovaná larva se v buňce hýbe a umírá zkroucená podél stěn nebo podélně natažená. Barva larvy se mění z bílé na žlutou, následně hnědou až šedočernou. Některé larvy mohou uhynout po zavíčkování, důsledkem jsou propadlá víčka jako u moru včelího plodu. Infekce však nemusí být letální, může dojít k vylíhnutí včely, často se však jedná o zakrnělé jedince (Forsgren, 2010).

Jakmile larva zkonzumuje kontaminovanou potravu, bakterie kolonizuje střevo. *M. plutonius* konkuruje larvě v příjmu živin, proniká peritrofickou membránou a ničí tkáň. Pokud plod umírá ve stádiu kukly, bakterie je schopna přežít ve výkalech a infikovat další larvy. Pokud plod hyne před kálením, většina bakteriálních buněk je ze včelstva odstraněna, jakmile včely čistí buňku (Forsgren, 2010).

### 2.3.1.3 Zvápenatění včelího plodu

Tuto chorobu způsobuje houba *Ascophæra apis*. K největšímu rozšíření infekce dochází během jara, kdy jsou ideální podmínky pro růst houby. Do těla plodu se dostávají askospory přes kutikulu nebo při pozření kontaminované potravy. Spory však nedokáží vyklíčit na kutikule, pro rozvinutí infekce se proto musí dostat do těla trávicím traktem. Nejcitlivější na nákazu jsou larvy mladší 4 dní. Dospělé včely nejsou citlivé, mohou však přenášet nákazu v rámci včelstva i mezi včelstvy (Aronstein & Murray, 2010).

Spory klíčí v lumenu střeva po aktivaci CO<sub>2</sub>. Infikované larvy prudce sníží příjem potravy, a nakonec přestanou potravu přijímat. Po proniknutí peritrofitickou membránou rostou mycelia v tělesných dutinách. Smrt nastává v důsledku mechanického a enzymatického poškození, narušení cirkulace hemolymfy a toxikózy. Houba vegetativně roste a pokrývá celou larvu tlustou vrstvou bílého mycelia. Uhynulé larvy následně schnou a vytvářejí mumie (Aronstein & Murray, 2010).

Nenasycené mastné kyseliny a vosky kutikuly působí antifungálně. Po prostoupení fyzikálními bariérami jsou nejčastějšími obrannými mechanismy buněčné imunity fagocytóza a enkapsulace. Dochází také k aktivaci PO, produkci lysozymu a antimikrobiálních peptidů. Z hlediska ochrany včelstva je velice důležitý také čistící pud (Aronstein & Murray, 2010).

## 2.3.2 Choroby dospělých včel

### 2.3.2.1 Varroóza

Za tímto onemocněním stojí kleštík včelí (*Varroa destructor*). Jedná se o téměř celosvětově rozšířeného parazita, který pro včelařství představuje obrovské riziko. Je to ektoparazit, který nepřežívá bez hostitele. Životní cyklus kleštíka lze rozdělit na foretickou fázi, kdy je viditelný na dospělých včelách a fázi reprodukční, která probíhá v zavíčkovaných buňkách trubců a dělnic. Samečci se vyskytují pouze v zavíčkovaných buňkách plodů, na dospělých včelách nepřežívají. Samičky jsou díky včelám transportovány do buněk nebo rozšířeny pracovní činností včel. Parazit se dostává do buňky krátce před zavíčkováním a po průniku se uchytí u larvální potravy, kterou konzumuje, zároveň vysává hemolymfu plodu. Samička klade vajíčka, první bývá neoplozená a líhne se z něj sameček, následující vajíčka jsou oplozená. Parazit běžně



naklade 5 vajíček v buňce dělničího plodu a 6 vajíček v buňkách plodu trubčího (Rosenkranz et al., 2010).

Infikovaný plod ztrácí na hmotnosti, dospělé včely, které byly infikovány během larválního vývoje, žijí po kratší dobu. Dospělé infikované včely mají zhoršenou schopnost neasociativního učení a zhoršenou schopnost navigace. Kleštík včelí je také přenašeč mnoha virů. Právě v důsledku přidružených virových infekcí dochází k rapidnímu poklesu včel ve včelstvu či ztrátě čistícího pudu (Rosenkranz et al., 2010).

V rámci obranných reakcí je důležitý grooming. Včely čistí samy sebe, ale i další jedince. Dokud není včelstvo příliš oslabené, projevuje se také čistící pud. Včely odstraňují infikovaný plod. Tento proces neznamená úhyn parazita, naruší to však jeho reprodukční cyklus a prodlouží foretickou fázi, během které může být ze včelstva odstraněn v rámci groomingu (Rosenkranz et al., 2010).

### **2.3.2.2 Nosematóza**

Nosematóza je způsobena mikrosporidii hmyzomorkou včelí (*Nosema apis*), v Evropě je také rozšířena *Nosema ceranae* (Fries, 2010). Je to parazit napadající trávicí trakt, jelikož včela může spolknout spory při vyklizení výkalů z infikované buňky. Zkracuje délku života a stojí za zvýšením mortality v zimním období. Při napadení krmiček dochází ke snížení aktivity hltanových žláz (Webster et al., 2004).

Mechanismus infekce je založen na uvolnění pólového vlákna, které vyčnívá z klíčící spory. Vlákno silou pronikne do buňky hostitele, díky čemuž se do buňky dostává také sporoplasma, parazit se zde množí, až dokud nedochází k uvolňování spor (Fries, 2010).

### **2.3.2.3 Trypanosomy**

Trypanosomy jsou jednobuněční eukaryotičtí bičíkovití parazité bezobratlých, obratlovců i rostlin. Trypanosomy infikující hmyz prožívají svůj životní cyklus jen v rámci jednoho hostitele. Napadají zadní střevo a interagují s buňkami hostitele. Bičíkem se připevní na stěnu střeva, čímž způsobují poškození buněk (Strobl et al., 2019). Napadení těmito parazity spouští signální dráhy, u včel je prokazatelná produkce defensinu 2 (Schwarz & Evans, 2013).

### 2.3.3 Virové nákazy

Viry napadají všechna vývojová stádia i včelí kasty. Přestože se povětšinou jedná o skryté infekce, mohou výrazně ovlivnit zdraví včely, včelstva a zkrátit délku života. Mezi nejčastěji se u včel vyskytující vir patří virus deformovaných křídel. Jedná se o jeden z mála virů, který se u včely projevuje definovanými symptomy, kterými jsou scvrklá křídla, zmenšení těla a ztráta barvy u dospělých včel. Napadá také včelí plod (Chen & Siede, 2007).

Mezi další rozšířená onemocnění patří virus pytlíčkovitého plodu. Napadá plod i dospělé, nejnáchylnější jsou však larvy staré dva dny. Šíření viru nastává, jakmile dojde k nákaze včel, které vyklízí mrtvé larvy. Virové částice se dostávají do hltanových žláz, čímž kontaminují potravu pro larvy. Zároveň mohou předat nákazu jiným dospělým včelám během výměny potravy. Létavky pak virus roznáší kontaminací pylu, který sbírají. Larvy se infikují, pokud pozřou potravu obsahující virové částice. Vir se v larvě replikuje, což má za následek kožovitý vzhled kůže. Larvy při vyjmutí z buňky vypadají jako vodou naplněný pytlík (Chen & Siede, 2007).

Pro královny je specifický vir černé královny. Hojně se replikuje v kuklách, což způsobuje ztmavnutí kukly a její úhyn. Následně černá i stěna buňky. Do plodu se dostává sekrecí hltanových žláz kojiček. Vir může infikovat i dělnice, většinou však neprojevují symptomy. Nákaza tímto virem je spojena s dalšími včelími parazity, např. kleštíkem včelím či hmyzomorkou včelí (Chen & Siede, 2007).

Z hlediska imunitního systému včely v boji s virovou nákazou využívají jak individuální, tak sociální imunity. Dochází k aktivaci Toll, Imd i JAK-STAT signální dráhy. Jsou produkovány AmP jako např. abaecin, apidaecin či defensin. V rámci sociální imunity je nejdůležitější čistící pud (Chen & Siede, 2007).

## 2.4 Metody používané při studiu AmP

### 2.4.1 Sledování genové exprese pomocí kvantitativní PCR v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k namnožení genetické informace *in vitro*, během každého cyklu se množství DNA zdvojnásobí. Pro provedení PCR je nutná DNA polymerasa (EC 2.7.7.7), uměle připravené DNA oligonukleotidové primery a templátové vlákno DNA. Reakce probíhají v termocykleru. Protože se pracuje

za vysokých teplot, je nutné používat termostabilní DNA polymerasu. Používá se Taq polymerasa, která je izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Původní dvojvlákno DNA je denaturováno teplem a na konce jednotlivých vláken jsou navázány komplementární primery. DNA polymerasa následně dokončí replikaci řetězce. Po opětované denaturaci dochází k opakování celého cyklu (Madigan et al., 2018).

PCR reverzní transkripce slouží pro získání DNA z templátu mRNA. Využívá se enzymu reversní transkriptasa (EC 2.7.7.49) pro převod informace z mRNA do cDNA. Vzniklé dvojvlákno sestávající z mRNA a cDNA je následně hydrolyzováno RNAsou H (EC 3.1.13.2) a dochází k běžnému cyklu PCR. Kvantitativní PCR využívá fluorescenčních prób, které se vážou na namnožené úseky DNA a tím umožňují jejich kvantifikaci. Často používaným barvivem je SYBR Green, které se interkaluje do dvoušroubovice DNA a pouze navázané fluoreskuje (Madigan et al., 2018).

Kvantitativní PCR použil např. Danihlík et al. (2018) pro stanovení exprese genů kódujících apidaecin a abaecin v zadečcích včel při studiu vlivu pylu ve stravě včel na produkci AmP.

#### **2.4.2 Enzyme-linked immuno sorbent assay**

Enzym-linked immuno sorbent assay (ELISA) patří k imunochemickým metodám, kdy je na molekulu antigenu či protilátku kovalentně navázán enzym. Často se jedná o peroxidasu (EC 1.11.1.7), alkalickou fosfatasa (EC 3.1.3.1) či  $\beta$ -galaktosidasu (EC 3.2.1.23). Příslušné enzymy katalyzují přeměnu specifických substrátů za tvorby stanovitelných barevných produktů. Existuje několik typů této metody, často používaná je sendvičová ELISA (Madigan et al., 2018).

Na počátku sendvičové ELISA je imobilizovaná protilátka na podkladu. Po přidání vzorku dochází k navázání antigenu na protilátku. Po inkubaci a promytí, při kterém je odstraněn nenavázaný antigen, je přidána další protilátka, na kterou je navázán enzym. Nakonec je přidán substrát a navázaný enzym katalyzuje příslušnou reakci. Silnější zbarvení indikuje větší přítomnost antigenů ve vzorku (Aydin, 2015).

Tato metoda byla použita např. ke stanovení defensinu v mateří kašičce při vyvíjení nových kritérií pro hodnocení medu (Bíliková & Šimúth, 2010).

### 2.4.3 Extrakce na pevné fázi

Při extrakci na pevné fázi (SPE) se váží složky vzorku na tuhý sorbent. Může se vázat analyt s tím, že ostatní molekuly se na sorbentu nezachytí, nebo naopak dojde nejdříve k eluci analytu. Sorbent může být polární, nepolární a zároveň může být modifikován pro vazbu kationtů či aniontů z roztoku. Po nanesení vzorků a zadržení analytů dochází k promývání pro odstranění nečistot. Nakonec je jiným rozpouštědlem eluován i analyt. Tato metoda slouží obecně k přečištění a zakoncentrování vzorku (Záruba, 2016).

Pro přečištění vzorku AmP lze použít slabou kationtovou výměnu na reverzní fázi, např. WCX Oasis (Waters, Milford, USA). Sorbent je polymerní reverzní fáze a jsou na něm navázány záporné funkční skupiny, které elektrostaticky interagují s kationtovými peptidy ve vzorku. Po nanesení vzorku následuje promývání, hydrogenuhlíčanem sodným můžeme vymýt kyselé složky, methanolem složky neutrální, a nakonec acetonitrilem požadované peptidy (Daníhlík et al., 2014).

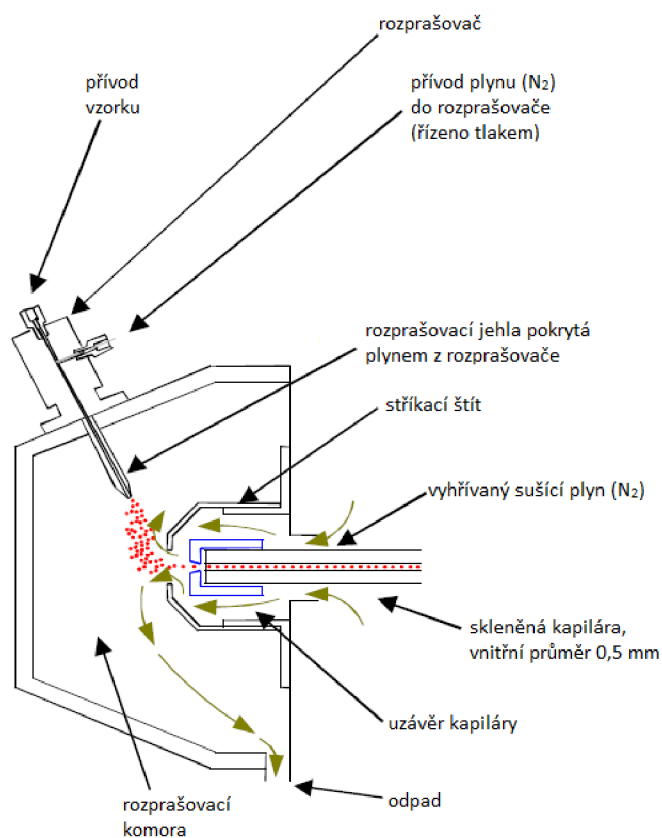
### 2.4.4 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie (LC) je separační metoda založená na dělení analytu mezi mobilní fázi (MF) a stacionární fázi (SF). Při provádění této metody dochází k nástřiku malého množství vzorku do proudu MF. Díky působení slabých molekulových sil dochází k interakci molekul analytu s molekulami MF i SF a pro každou složku vzorku tak dochází k ustanovení rovnováhy mezi její frakci v SF a MF. Rovnováhu popisuje distribuční konstanta. Pokud mají jednotlivé složky vzorku rozdílné distribuční konstanty, lze je separovat. Proudění MF následně rovnováhu poruší a uvolní složky ze SF do MF. Ustanovení a porušení rovnováhy se neustále opakuje, a tak dochází ke zpoždování pohybu složek kolonou oproti MF. Složky, které se SF interagují silněji jsou déle zadržovány. Tak dochází k postupnému rozdělení složek. Přístroj pro provádění chromatografie se nazývá chromatograf a jejím výstupem je chromatogram. Kvalitativní údaj získáme z retenčního času, který odpovídá pozici maxima chromatografického píku. Plocha píku odpovídá množství analytu ve vzorku (Záruba, 2016).

Pro analýzu peptidů se nejčastěji používá rozdělovací kapalinová chromatografie se systémem reverzních fází (Vaňková, 1999). V tomto uspořádání dochází k rozdělení složek mezi dvě kapalně fáze, je nutná jejich nemísitelnost, SF proto bývá chemicky vázaná (nejčastěji se jedná o chemicky modifikovaný silikagel) (Záruba, 2016). Na silikagelu jsou navázány alkyly o 4 až 18 uhlících (SF je nepolární). Dochází tedy

k hydrofobní interakci se složkami vzorku. MF je polární, jedná se o směs polárních rozpouštědel s vodou či pufrem, kdy schopnost vymývat vzorek z kolony (eluční síla) roste s klesající polaritou (Vaňková, 1999). Při provádění analýz je časté spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je založena na rozdělení iontů v plynné fázi dle poměru hmotnosti a náboje. Spolu se separací můžeme zároveň analyzovat četnost jednotlivých iontů. Vzorek z chromatografické kolony (eluát) vstupuje nejprve do iontového zdroje, kde dochází k ionizaci neutrálních molekul (Záruba, 2016). Jednou z ionizačních technik je ionizace elektrosprejem (ESI), která probíhá za atmosférického tlaku (Obr. 5). Eluát prochází kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí, díky kterému se na výstupu z kapiláry tvoří kapičky nesoucí náboj. Při následném odpařování rozpouštědla dochází ke zmenšování kapiček, čímž se zvyšuje hustota povrchového náboje, až do uvolnění molekulárních iontů (Holčapek, 1998).



Obr. 5: Schéma ESI. Ionty vznikají díky vysokému napětí, které je vloženo na kapiláru (upraveno dle materiálů Bruker Daltonics, Německo).

Ionty jsou následně elektrostaticky urychleny a dostávají se do separátoru. Při analýze peptidů můžeme použít trojitý kvadrupól (tandemová MS) s analyzátozem doby letu (TOF). V kvadrupólovém separátoru je trajektorie iontů ovlivňována působením stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí připojeného na 4 kovové tyče, kdy sousední tyče mají vždy opačnou polaritu a tyče naproti sobě stejnou. Ionty procházejí rozdílnou rychlostí na základě jejich hmotnosti a náboje. Následuje kolizní cela, kde dochází k fragmentaci iontů, které prošly prvním separátorem. Po fragmentaci vstupují ionty do druhého kvadrupólu (Záruba, 2016). Při následném průchodu TOF dochází k rozdělení iontů v čase v důsledku různé rychlosti, kterou se pohybují trubici o známé délce. Pokud mají dva ionty stejné nábojové číslo i totožnou počáteční rychlost, na detektor, který se nachází na konci trubice, dorazí nejdříve ten lehčí z nich (Volný, 2020). V detektoru se energie dopadajících iontů mění na elektrický signál (Záruba, 2016).

Propojení LC a MS bylo použito např. pro identifikaci a kvantifikaci apidaecinu 1 ve vzorcích tkání i hemolymfy úlových včel a létavek (Daníhlík et al., 2014).

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

- Agilent Technologies: ESI-L Low Concentration Tuning Mix
- Sigma-Aldrich: kyselina mravenčí (FA), kyselina trifluoroctová (TFA)

#### **3.1.2 Přístroje a vybavení**

Hmotnostní spektrometr Compact (Bruker Daltonics, Německo)

HPLC systém UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Kulový mlýnek Fast Prep FP120 (Thermo Electron Corporation, USA)

Lyofilizátor (Gregor Instruments, Česká republika)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)

Vakuová odparka Concentrator (Eppendorf, Německo)

Vortex (Stuart, UK)

#### **3.1.3 Biologický materiál**

Vzorky lyofilizované včelí hemolymfy byly dodány školitelem. Včely, kterým byla hemolymfa odebrána pocházely ze 3 včelstev (24, 27, 60) žijících ve včelíně v Kývalce (Česká republika). Ze stejné oblasti pocházely také mladušky, jejichž hemolymfa byla použita jako pozadí pro sestavení kalibrační sady (Daníhlík et al., 2014).

Odběr hemolymfy probíhal po dobu 4 měsíců roku 2018:

- 20. 6. 2018
- 18. 7. 2018
- 20. 8. 2018
- 21. 9. 2018

Také vzorky částí včelích těl byly dodány školitelem a pocházely ze včelnice z Kývalky. Úlové včely, kterým byl stanoven apidaecin v hlavách nebo zadečcích byly imunizovány vpichem PBS. Apidaecin byl také stanoven v hrudích včel napadených kleštíkem včelím.

### 3.1.4 Synteticky připravené AmP

Standardy apidaecinu 1B (čistota > 99 %) a isotopově [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ] značeného apidaecinu 1B (na C– konci; čistota > 98 %) byly připraveny chemickou syntézou firmou Clonestar Peptide Services (Brno, Česká republika).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Hmotnostně spektrometrická analýza standardu apidaecinu 1B přímým nástřikem

1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok apidaecinu 1B v 0,1% TFA byl nasát do MS kapiláry a proměřen pomocí MS (přímý nástřik, průtoková rychlost 100  $\mu\text{l}\cdot\text{hod}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Příprava kalibrační sady apidaecinu pomocí LC/MS

Pro přípravu roztoků kalibrační sady byly použity 4 včelí mladušky, které sloužily jako matrice pro přípravu kalibrační řady standardu apidaecinu (Daníhlík et al., 2014), z každé mladušky byly odebrány 2  $\mu\text{l}$  hemolymfy. Hemolymfa byla následně lyofilizována. Před přípravou kalibrační řady byla hemolymfa rozpuštěna ve 100  $\mu\text{l}$  5% FA. Vialky byly vortexovány, po dobu 5 minut sonikovány v ultrazvukové lázni a centrifugovány (4 °C, 16 100 $\times$ g, 10 minut). Následně byl supernatant přepipetován do mikrozkušavky. Do každé MS vialky bylo napipetováno 15  $\mu\text{l}$  supernatantu. Standard apidaecinu 1B i interního izotopově značeného standardu apidaecinu 1B byl použit v koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledné koncentrace standardu ve vialkách zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1: Jednotlivé koncentrace apidaecinu v MS vialkách a množství v nástřiku do LC/MS.

Číslo vialky	Koncentrace ve vialce [ $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Nástřik [ $\mu\text{l}$ ]	Množství v nástřiku [ $\text{pmol}$ ]
1	5	5	0,025
2	10	5	0,050
3	20	5	0,100
4	50	5	0,250
5	100	5	0,500
6	150	5	0,750
7	200	5	1
8	300	5	1,500
9	400	5	2
10	600	5	3
11	800	5	4
12	1000	5	5
13	1500	5	7,500



Číslo vialky	Koncentrace ve vialce [nmol·l <sup>-1</sup> ]	Nástřik [μl]	Množství v nástřiku [pmol]
14	2000	5	10
15	2500	5	12,500
16	3000	5	15

Roztoky ve vialkách byly následně odpařeny na vakuové odparce (45 minut, 45 °C). Poté byly standardy rozpuštěny ve 40 μl 0,1% TFA, vialky zavíčkovány a použity pro LC/MS.

UHPLC separace byla provedena na koloně Kinetex 1,7 μm EVO C<sub>18</sub>, 100 Å, 150×2,1 mm, C<sub>18</sub> s předkolonou. Kolona byla umístěna do termostatu s teplotou 40 °C. Mobilní fáze byly (A) 0,5% FA ve vodě a (B) 0,5% FA v acetonitrilu. Separace byla provedena s průtokovou rychlostí 0,2 ml·min<sup>-1</sup> s gradientem: 0–3 min 2% B, 3–12 min 2–45% B, 12–14 min 45–95% B, 14–17 min 95% B, 17–18 min 95–2% B, 19–20 min 2% B (Dostálková et al., 2021).

Data z MS byla získána při nastavení: hmotnostní rozsah 100–2800 Da, spektrální rychlost 4 Hz, napětí koncové desky 500 V, napětí na kapiláře 4500 V, tlak rozprašovače 2,5 bar, přívod sušícího plynu 6 l·min<sup>-1</sup>, sušící teplota 200 °C, HPC interní kalibrace mravenčanem sodným (Dostálková et al., 2021).

### 3.2.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS

Pro stanovení apidaecinu v hemolymfě byly použity vzorky lyofilizované hemolymfy ze 3 včelstev (24, 27, 60). V každém měsíci bylo získáno 5 mikrozkušavek, v jedné mikrozkušavce se nacházely 2 μl hemolymfy z jedné včely, celkově byla pro přípravu jednoho vzorku odebrána hemolymfa 10 včelám.

Každý vzorek hemolymfy byl rozpuštěn ve 100 μl 5% FA. Vzorky byly následně vortexovány, 5 minut sonikovány v ultrazvukové lázni a centrifugovány (4 °C, 16 100×g, 10 minut). Do MS vialky bylo pipetováno 20,4 μl 5% FA, 10 μl rozpuštěného vzorku a 9,6 μl interního standardu. Vzorky byly následně proměřeny pomocí LC/MS, nástřik 5 μl.

### 3.2.4 Kvantifikace apidaecinu v tělních částech úlových včel pomocí LC/MS

Do mikrozkušavky byla vložena lžička skleněných kuliček. Do zkušavek byly přidány tělní části včel (hlava, hrud', zadeček). Bylo připraveno celkem 45 vzorků, vzorky

obsahovaly vždy 1, 2 nebo 3 téže tělní části. Vše bylo připravováno v 5 biologických replikátech. Ke vzorkům bylo přidáno 200  $\mu$ l 0,1% TFA a vzorek byl homogenizován v kulovém mlýnku (20 sekund při maximální rychlosti). Ke všem vzorkům bylo poté opět přidáno 200  $\mu$ l 0,1% TFA a homogenizace byla opakována. U vzorků s třemi zadečky proběhl proces přidání 0,1% TFA a homogenizace ještě jednou, pro vzorky s dvěma a třemi hrudmi dvakrát.

Vzorky byly následně centrifugovány (4 °C, 16 100 $\times$ g , 10 minut), supernatant přepipetován do čistých mikrozkušavek. Následně došlo k další centrifugaci (4 °C, 16 100 $\times$ g , 20 minut) a přepipetování supernatantu. Supernatant byl poté zamražen a přes noc lyofilizován.

Pro LC/MS byly vzorky připraveny shodně se vzorky hemolymfy (3.2.3). Veškeré zpracování dat bylo provedeno pomocí softwarů Bruker Compass HyStar (Bruker, verze 5.0.37.0), DataAnalysis (Bruker, version 4.4) Compass ofControl (Bruker, verze 5.2) a TASQ2.2 (Bruker Daltonics). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí Microsoft Excel 365 (Microsoft) a TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., verze 14.0.0). Data získaná proměřením včelí hemolymfy byla otestována na normalitu a dle výsledku vyhodnocena statisticky pomocí testu ANOVA či neparametrického testu ANOVA (Kruskal–Wallis test).

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Hmotnostně spektrometrická analýza standardu apidaecinu 1B přímým nástřikem

Různé nábojové stavy apidaecinu byly viditelné na hmotnostním spektru změřeném přímým nástřikem do zdroje (Obr. 6), 1× nabitý peptid se ve spektru nevyskytuje, nejintenzivnější je ion 3× nabitý. Pík s m/z 352,342 odpovídá nízkomolekulární látce, která představuje nečistotu pravděpodobně z procesu výroby. Naměřené hodnoty m/z odpovídají teoretickým hodnotám vycházejícím z monoisotopové molekulární hmotnosti apidaecinu (2107,16 Da) (Tab. 2).

Výpočet pro 2× nabitý API:

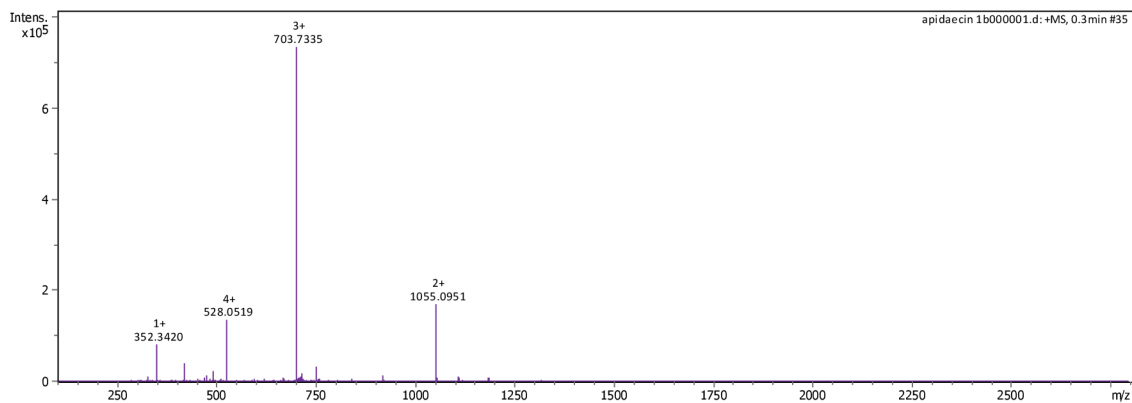
$$M_{\text{apidaecin}} = 2107,16 \text{ Da}$$

$$M_{r_{H^+}} = 1,01$$

$$\frac{m}{z} = \frac{M_{\text{apidaecin}} + 2 \cdot M_{r_{H^+}}}{2} = \frac{2107,16 + 2 \cdot 1,01}{2} = 1054,59$$

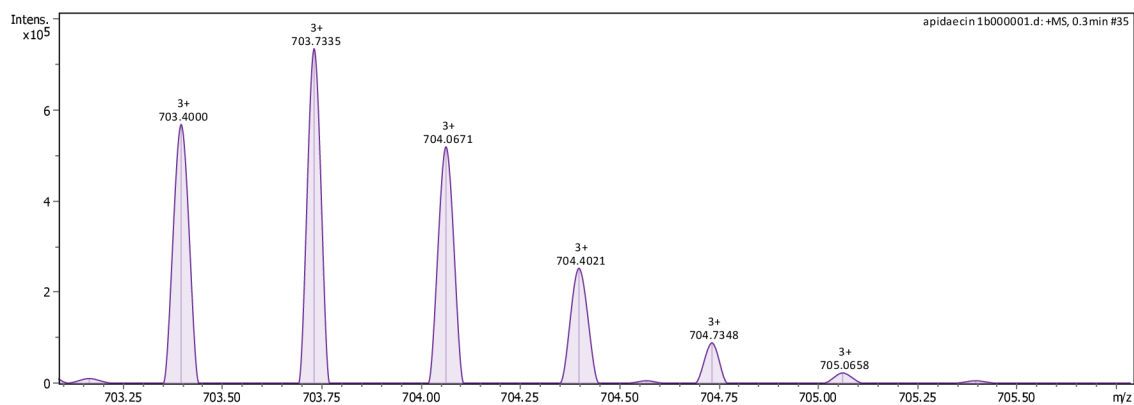
Tab. 2: Teoretické hodnoty m/z pro apidaecin.

Stupeň ionizace	m/z
1×	2108,17
2×	1054,59
3×	703,39
4×	527,80



Obr. 6: MS spektrum nábojových stavů standardu apidaecinu.

Isotopová spektra jednotlivých iontů ukazují, že nejvíce zastoupený je peptid, ve kterém se vyskytuje jeden izotop <sup>13</sup>C<sub>6</sub> (Obr. 7).

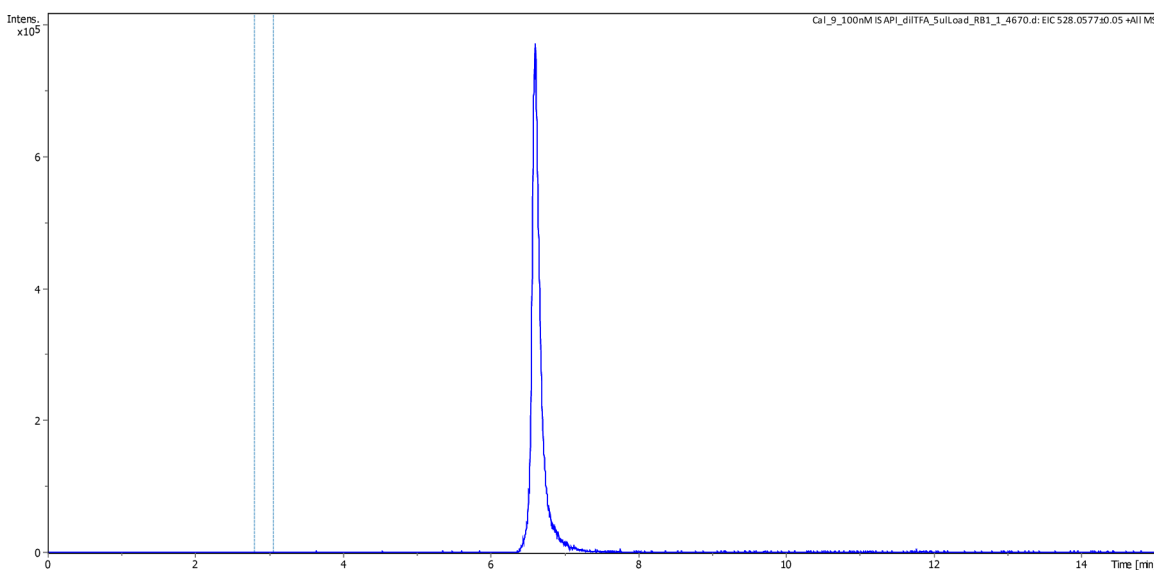


Obr. 7: Isotopové MS spektrum 3× nabitého apidaecinu.

## 4.2 Stanovení retenčního času apidaecinu 1B

Po nástřiku standardu apidaecinu byl stanoven retenční čas, při němž dochází k eluci peptidu z kolony Kinetex 1,7  $\mu\text{m}$  EVO C<sub>18</sub>, 100 Å, 150×2,1 mm, C<sub>18</sub> s předkolonou při daných chromatografických podmínkách. Na chromatogramu získaném proměřením apidaecinu pomocí UHPLC je zobrazen retenční čas apidaecinu 6,60 minut (Obr. 8).

Dle získaného chromatogramu je patrné, že se apidaecin eluuje v mírně chvostujícím píku. Pro zjištění stability retenčního času byly určeny průměrné retenční časy apidaecinu při měření kalibračních roztoků, vzorků hemolymfy a vzorků homogenátů tělních částí (Tab. 3). Nejbližší času 6,60 minut je průměrný retenční čas standardu apidaecinu, retenční časy apidaecinu z biologických vzorků se mírně odlišují např. v důsledku matricových efektů. Očekávaná variabilita retenčních časů při analýze pomocí LC se pohybuje okolo  $\pm 0,02$ – $0,05$  minut. Při analýze např. proteinů však může být variabilita ještě větší. Při provádění LC na reverzní fázi je jedním z nejčastějších důvodů variability retenčních časů změna koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi. Také změna teploty kolony může vést k proměně retenčního času, udává se, že změna teploty o 1 °C může vést ke změně retenčního času o až 2 %. V případě separace ionizovatelných skupin má vliv na retenční čas také hodnota pH mobilní fáze. V rámci studií byla při změně pH o 0,2 jednotky zjištěna změna retenčního času odpovídající změně teploty o 10 °C. Změny může způsobit také rozdílná průtoková rychlost a mixování mobilních fází při separaci v gradientu mobilních fází (Dolan, 2014). Rozdíly v retenčním čase při provádění analýzy apidaecinu tedy odpovídají předpokládané variabilitě.



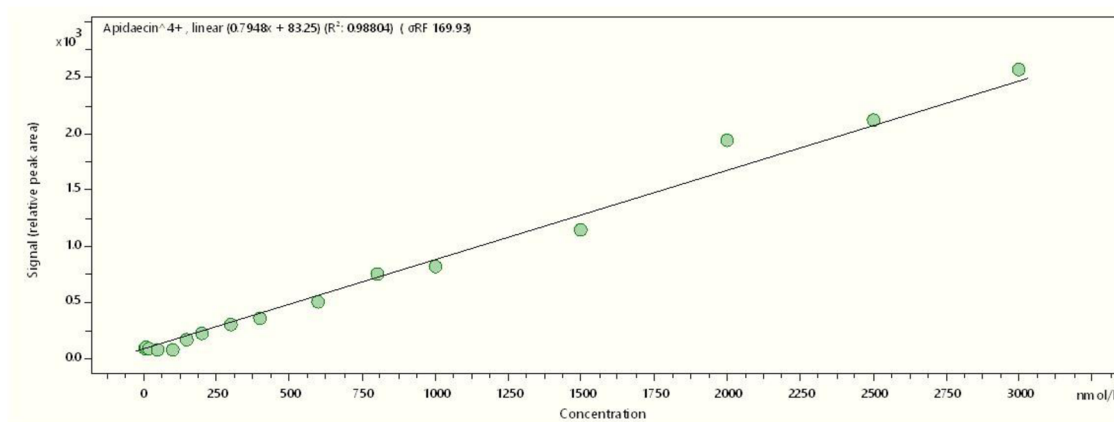
Obr. 8: Chromatogram standardu apidaecinu 1B.

Tab. 3: Srovnání retenčních časů apidaecinu v jednotlivých měřených vzorcích. n vyjadřuje počet proměřených vzorků daného typu.

Vzorky	Retenční čas [min]
Kalibranty (n = 16)	6,61 ± 0,02
Hemolymfa (n = 51)	6,64 ± 0,03
Tělní části (n = 26)	6,66 ± 0,02

### 4.3 Příprava kalibrační sady apidaecinu pomocí LC/MS

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost koncentrace standardu apidaecinu na intenzitě signálu (Obr. 9). Lineární závislost vyjadřuje rovnice  $y = 0,7948x + 83,25$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,98804$ .



Obr. 9: Kalibrační křivka apidaecinu. Jednotlivé kalibranty zobrazují zelená kolečka.

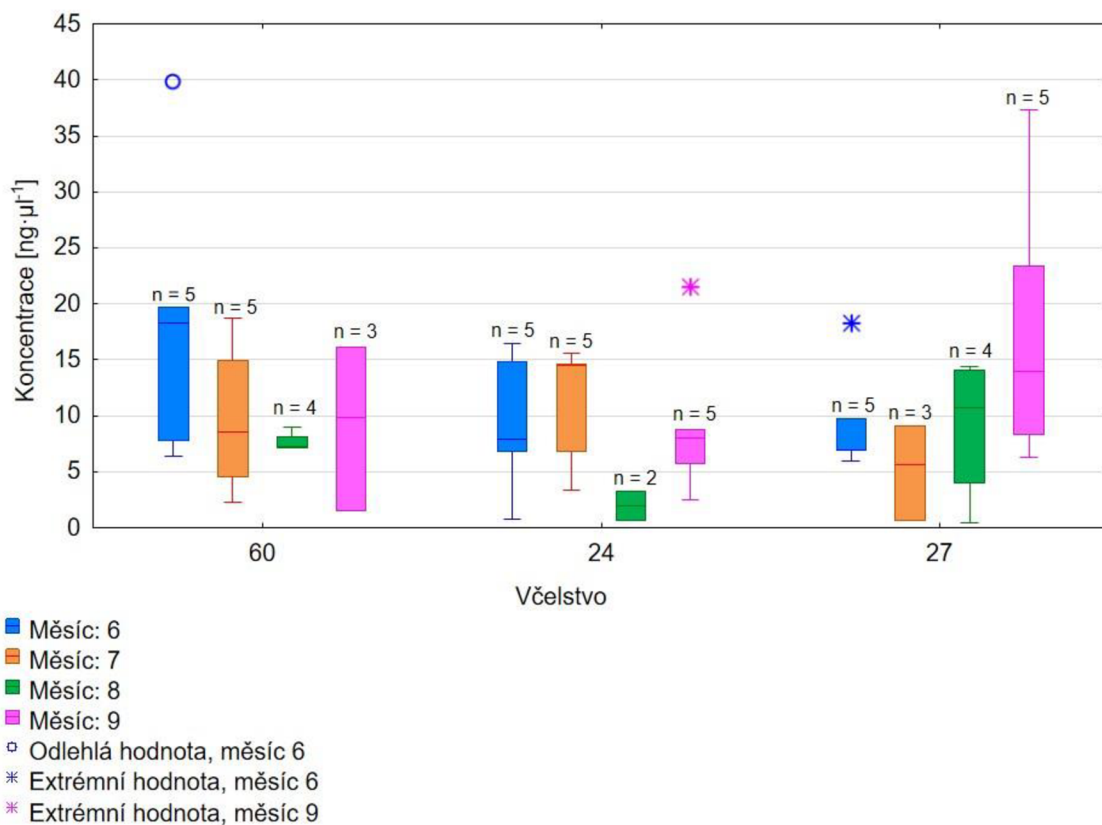
#### 4.4 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS

Výsledky měření apidaecinu v hemolymfě včel ukazují měnící se koncentraci apidaecinu v průběhu 4 měsíců (Obr. 10). Nejvyšší koncentrace apidaecinu byla zaznamenána u včelstva 27 v rámci zářijového odběru. Naopak nejmenší koncentrace apidaecinu lze pozorovat u včelstva 25 v rámci odběru srpnového. Statistickým vyhodnocením nebyly v měsíci červnu detekovány rozdíly v koncentracích apidaecinu mezi včelstvy (Kruskal–Wallis ANOVA,  $p = 0,403$ ), stejně tak v měsíci červenci (Kruskal–Wallis ANOVA,  $p = 0,482$ ), srpnu (Kruskal–Wallis ANOVA,  $p = 0,261$ ) a září (Kruskal–Wallis ANOVA,  $p = 0,406$ ).

Koncentrace apidaecinu byla měřena na vzorku náhodně vybraných včel z experimentálních včelstev, ve vzorcích se nacházela hemolymfa úlových včel různého věku. Včely byly odebírány z plodiště, jeden vzorek obsahoval hemolymfu odebranou 10 včelám. Ačkoliv je prokázáno, že vnější podmínky (klimatické podmínky, biotické faktory, dostupnost potravy) ovlivňují hladiny AmP, provedená měření rozdíly neprokázala. Změny však prokázala např. studie Danihlíka et al. (2018), ve které byl studován vliv složení potravy na produkci AmP.

Variabilita v koncentracích může být také způsobena přítomností včel různého stáří v jednom vzorku. Čerstvě vylíhnuté včely nejsou schopné intenzivní humorální imunitní odpovědi ve srovnání se staršími včelami, u těchto včel tedy nelze očekávat vyšší koncentrace apidaecinu. Dle studie publikované Danihlíkem et al. (2014) se koncentrace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pohybuje přibližně do  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , tomu odpovídají i naměřené hodnoty. Vyšší hodnoty koncentrace můžou znamenat stimulaci imunitního systému, např. mikrobiálním patogenem. Dle těchto poznatků lze např. předpokládat, že při srpnovém odběru hemolymfy ze včelstva 25 byla hemolymfa odebrána spíše mladším včelám, zatímco při zářijovém odběru z včelstva 27 včelám starším.

Vlivem mnoha faktorů se však nemění pouze koncentrace apidaecinu v hemolymfě, ale také genová exprese. Studie Dostálkové et al. (2021) prokázala nižší relativní genovou expresi apidaecinu zimní generace včel oproti generaci letní. Při imunizaci PBS však relativní genová exprese apidaecinu nevykazovala mezi generacemi statisticky významné rozdíly, stejně jako v případě inokulace včel bakterií, kdy však došlo k vyšší genetické expresi u zimní generace včel. Vliv na genovou expresi má také složení potravy (Danihlík et al., 2018). Zajímavým bylo zjištění Chaimanee et al. (2012), kdy relativní genová exprese apidaecinu klesala 3 až 6 dní po inokulaci hmyzomorkou včelí.



Obr. 10: Naměřené koncentrace apidaecinu v hemolymfě, n vyjadřuje počet biologických opakování.

## 4.5 Kvantifikace apidaecinu v tělních částech úlových včel

### 4.5.1 Včely imunizované vpichem PBS

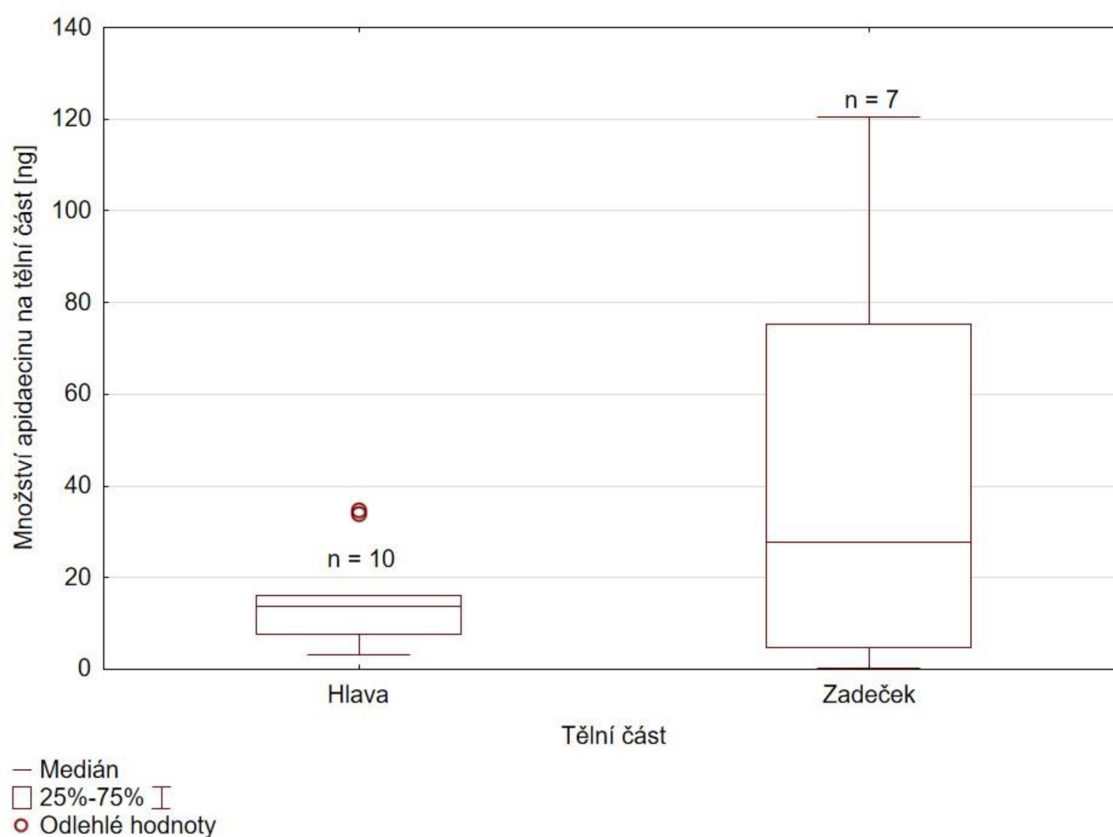
Výsledky stanovení množství apidaecinu v tělních částech úlových včel zobrazují rozdílná množství apidaecinu v tělních částech (Obr. 11). V obou tělních částech byl apidaecin detekován a stanoven, což značí produkci AmP po imunizaci. Větší množství apidaecinu bylo naměřeno v zadečcích, to však souvisí také s rozdílnou velikostí daných tělních částí. Zde byla určena hmotnost apidaecinu na jednu tělní část, jako např. ve studii Danihlíka et al. (2014). Je však také možné každou tělní část zvážit a uvádět množství apidaecinu v 1 mg tělní části, např. jako ve studii Danihlíka et al. (2018).

Stanovením byla prokázána možnost zpracovávat tělní tkáň včel a stanovovat apidaecin přímo z jejich homogenátů, a to bez nutnosti přečištění vzorku (např. pomocí SPE). Při odebrání hemolymfy je třeba delšího kontaktu se včelami, v případě zpracování tělních částí však stačí pouze zpracovat zamražené vzorky v laboratoři. Výhodou je také



možnost zpracovávat vzorky v průběhu celého roku a analyzovat tak např. vzorky letních včel během zimy. Pro homogenizaci postačí poměrně levná 0,1% TFA a rychle proveditelná homogenizace v kulovém mlýnku. Oproti zpracování hemolymfy je však práce v laboratoři prodloužena o nutnost dvojnásobné centrifugace pro oddělení všech pevných složek a nečistot. Přestože vzorky pochází z bohaté biologické matrice, naměřené retenční časy se nelišily od retenčních časů standardů (viz Tab. 3).

Přítomnost apidaecinu v hlavičkách byla prokázána také studií Houdeleta et al. (2022). S požitím metody MALDI (laserová ionizace za účasti matrice) imaging byla zaznamenána vysoká koncentrace apidaecinu v hlavičkách včel po podání spor hmyzomorky, stejně jako např. royalisinu.

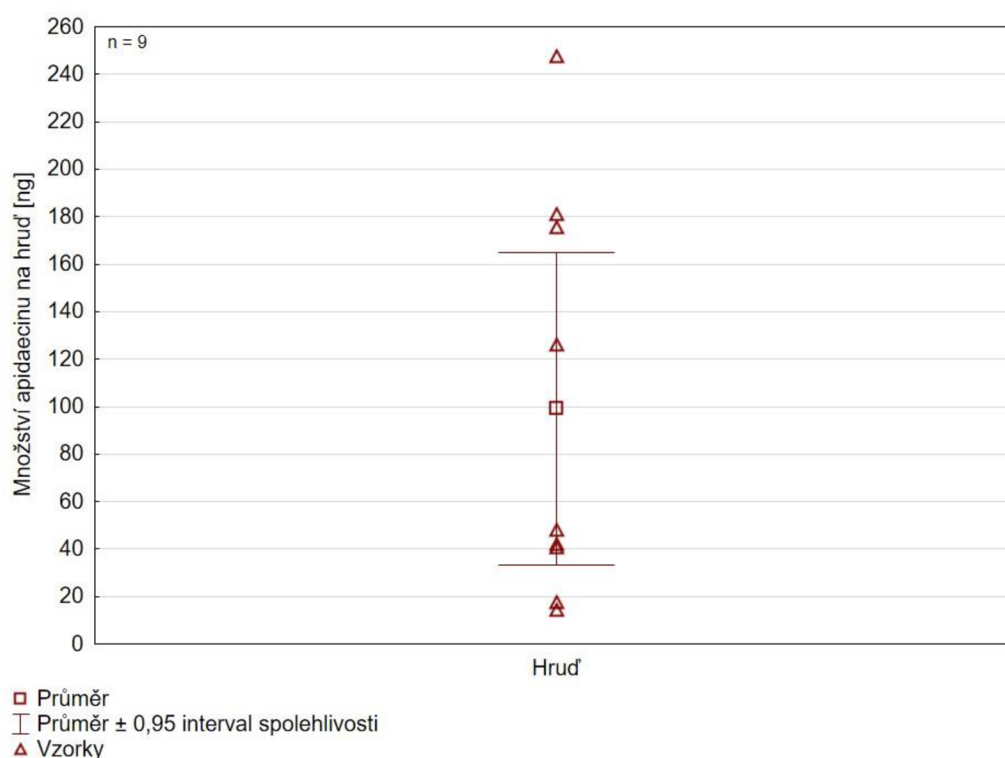


Obr. 11: Naměřená množství apidaecinu v tělních částech úlových včel po imunizaci PBS, n vyjadřuje počet biologických opakování.

#### 4.5.2 Včely po silném napadení kleštíkem včelím

Stanovení apidaecinu v hrudích úlových včel napadených kleštíkem včelím zobrazuje vliv roztoče na včelí imunitní systém (Obr. 12). Nelze provést přímé srovnání mezi množstvím apidaecinu v hrudích infikovaných a zdravých včel vzhledem k neproměření kontrolní skupiny sestávající se ze včel zdravých. Při srovnání např. se starší publikací však naměřené množství apidaecinu přesahuje množství ve zdravých úlových včelách (Daníhlík et al., 2014), což značí stimulaci imunitní odpovědi roztočem.

Jednalo se o pilotní měření pro ověření možnosti stanovení apidaecinu v homogenátu včelí tkáň. Přestože je hrud' poměrně velká tělní část, podařilo se ji homogenizovat několika přidavky 0,1% TFA a homogenizací v kulovém mlýnku. Stejně jako v případě jiných tělních částí přípravu vzorků prodlužuje pouze nutnost dvojnásobné centrifugace. Apidaecin se však podařilo stanovit i bez potřeby vzorek dále přечиšťovat.



Obr. 12: Naměřená množství apidaecinu v hrudích úlových včel napadených kleštíkem včelím, n vyjadřuje počet biologických opakování.

Vzhledem k úspěšnému stanovení je možné pokračovat ve výzkumu včelího humorálního imunitního systému ve spojitosti s kleštíkem včelím. Bylo by možné např. pozorovat vliv kleštíka včelího na produkci AmP v jednotlivých tělních částech. Kleštík včelí parazituje primárně na zadečku, kde se živí tukovým tělesem včely, jak bylo

stanoveno ve studii Ramseyho et al. (2019) pomocí transmisní elektronové mikroskopie s využitím fluorescenčního značení. AmP však byly detekovány a stanoveny také v hlavách včel ve studii Houdeleta et al. (2022), zde však byly včely imunizovány jiným parazitem a byla použita metoda MALDI imaging. Použití jedné metody pro stanovení AmP v tělních částech by tak mohlo více přiblížit charakter infekce kleštíkem včelí a imunitní odpovědi.

## **5 Závěr**

- Byla zpracována literární rešerše o imunitním systému včely medonosné se zaměřením na sociální hmyz a včelu medonosnou
- Byla zpracována literární rešerše o fyziologických změnách během vývoje hmyzu s přeměnou dokonalou se zaměřením na změny v reaktivitě imunitního systému
- Byl zpracován přehled včelích patogenů a jejich vliv na imunitní systém včel
- Byla stanovena koncentrace apidaecinu ve včelí hemolymfě a množství apidaecinu v tělních částech včel po imunizaci

## 6 Literatura

- Amaral, I. M. R., Neto, J. F. M., Pereira, G. B., Franco, M. B., Beletti, M. E., Kerr, W. E., Bonetti, A. M., & Ueira-Vieira, C. (2010). Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, 41(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.10.003>
- Aronstein, K. A., & Murray, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S20-S29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>
- Ashida, M., & Brey, P. T. (1995). Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(23), 10698-10702. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10698>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Beckerová D. (2017): *Humorální imunita včel*. [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.
- Bíliková, K., & Šimúth, J. (2010). New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8776-8781. <https://doi.org/10.1021/jf101583s>
- Biová, J., Charrière, J.-D., Dostálková, S., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Bzdil, J., & Danihlík, J. (2021). *Melissococcus plutonius* Can Be Effectively and Economically Detected Using Hive Debris and Conventional PCR. *Insects*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/insects12020150>
- Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597-603. <https://doi.org/10.4161/viru.25906>
- Butolo, N. P., Azevedo, P., Alencar, L. D., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2021). Impact of low temperatures on the immune system of honeybees. *Journal of Thermal Biology*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103082>
- Cappa, F., Petrocelli, I., Cini, A., Pepiciello, I., Giovannini, M., Lazzeri, A. M., Perito, B., Turillazzi, S., & Cervo, R. (2020). Immunity of honeybee guards reflects their transition from house bees to foragers. *Ethology Ecology & Evolution*, 32(3), 289-295. <https://doi.org/10.1080/03949370.2019.1695228>
- Cerenius, L., & Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Danahlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Danahlík, 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.041>
- Danahlík, J., Škrabišová, M., Lenobel, R., Šebela, M., Omar, E., Petřivalský, M., Crailsheim, K., & Brodschneider, R. (2018). Does the Pollen Diet Influence the Production and Expression of Antimicrobial Peptides in Individual Honey Bees?. *Insects*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/insects9030079>
- Dolan, J. W. (2014). How Much Retention Time Variation Is Normal?. *LCGC North America*, 32(8), 546-551. <https://www.chromatographyonline.com/view/how-much-retention-time-variation-normal-0>
- Dostálková S. (2016): *Úloha antimikrobiálních peptidů v imunitní obraně včel při infekcích bakteriálními patogeny*. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.

- Dostálová, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3). <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S62-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Fang, Y., Feng, M., Han, B., Lu, X., Ramadan, H., & Li, J. (2014). In-depth Proteomics Characterization of Embryogenesis of the Honey Bee Worker (*Apis mellifera ligustica*). *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(9), 2306-2320. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.037846>
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S5-S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S73-S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- Hansen, H., & Brødsgaard, C. J. (2015). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80(1), 5-23. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099415>
- Holčapek, M., & Jandera, P. (1998). SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS). *Chemické listy*, 92(4), 278-286. [www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz)
- Houdelet, C., Arafah, K., Bocquet, M., & Bulet, P. (2022). Molecular histoproteomy by MALDI mass spectrometry imaging to uncover markers of the impact of *Nosema* on *Apis mellifera*. *PROTEOMICS*. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100224>
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D., & Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1090-1095. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.016>
- Chan, Q. W. T., Melathopoulos, A. P., Pernal, S. F., & Foster, L. J. (2009). The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-387>
- Chen, Y. P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research*, 70, 33-80. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Kodřík D. (2004): *Fyziologie hmyzu*. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.
- Kurze, C., Routtu, J., & Moritz, R. F. A. (2016). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, 119(4), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.03.007>
- 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(7), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- López-Urbe, M. M., Fitzgerald, A., & Simone-Finstrom, M. (2017). Inducible versus constitutive social immunity: examining effects of colony infection on glucose oxidase and defensin-1 production in honeybees. *Royal Society Open Science*, 4(5). <https://doi.org/10.1098/rsos.170224>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15 ed.). Pearson.
- Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M., & Freitak, D. (2014). Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Frontiers in Zoology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23>
- Neubauerová, T., Macková, M., Macek, T., & Koutek, B. (2009). Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy*, 103(6), 460-468. [www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz)

- Page, 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(4-6), 695-711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Rolff, J., Johnston, P. R., & Reynolds, S. (2019). Complete metamorphosis of insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0063>
- Rosales, C. (2017). Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect Physiology and Ecology*. In Teach Publicaiton. CCBY, 179-212.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96-S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Schwarz, R. S., & Evans, J. D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology*, 40(3-4), 300-310. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Strobl, V., Yañez, O., Straub, L., Albrecht, M., & Neumann, P. (2019). Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *International Journal for Parasitology*, 49(8), 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.006>
- Šťastná L. (2016): *Buněčná imunita včel*. [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.
- Vaňková, H. (1999). Peptidové mapy. *Chemické listy*, 93(2), 120-127. [www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz)
- Veselý, V. (2013). *Včelařství* (Vyd. 3). Brázda.
- Volný, M. (2020). HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR DOBY LETU. *Chemické listy*, 114(2), 113-118. [www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz)
- Webster, T. C., Pomper, K. W., Hunt, G., Thacker, E. M., & Jones, S. C. (2004). Nosema apis infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35(1), 49-54. <https://doi.org/10.1051/apido:2003063>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Záruba, K. (2016). *Analytická chemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

## 7 Seznam použitých symbolů a zkratek

AmP	antimikrobiální peptid/y
βGRP	β-1,3-glukan rozpoznávající receptory
cDNA	komplementární DNA
DAP	diaminopimelová kyselina
DREDD	FADD-death-related ced-3/Nedd2 protein
ELISA	enzym-linked immuno sorbent assay
FA	kyselina mravenčí
FADD	Fas-asociovaný protein s doménami smrti
G-	Gram – negativní
G+	Gram – pozitivní
GOX	glukosaoxidas
Imd	dráha imunitní nedostatečnost
JAK-STAT	Janus kinasa–převodník signálu a aktivátor transkripce
LC	kapalinová chromatografie
LGRP	lipopolysacharidy rozpoznávající proteiny
LPS	lipopolysacharidová vrstva
MALDI	laserová ionizace za účasti matrice
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NF-κB	transkripční faktory kappa B
PCR	polymerasová řetězová reakce
PGN	polymerický peptidoglykan
PGRP	peptidoglykan rozpoznávající proteiny
PO	fenoloxidas
proPO	profenoloxidas
PRR	patogen rozpoznávající receptory
PXDN	peroxidasin
Q	kvadrupólový analyzátor
RNAi	dráha RNA interference
SF	stacionární fáze
siRNA	malé interferující RNA
SPE	extrakce na pevné fázi



Spe	Spätzle processing enzym
TAB2	TAK1-asociovaný vázaný protein
TAK1	aktivační kinasa transformujícího růstového faktoru beta
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie