

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium antimikrobiálních peptidů v epiteliální
imunitě včely medonosné**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Linda Tölgová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala 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. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Katedře biochemie Univerzity Palackého za poskytnutý prostor k práci na mé experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Linda Tölgová
Název práce	Studium antimikrobiálních peptidů v epiteliální imunitě včely medonosné
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

V posledních letech byl pozorován vysoký úbytek včelstev. Včela je nepostradatelnou součástí ekosystému, jelikož se účastní opylení rostlin, které je nezbytné pro rozmnožování některých rostlin. Vymření včel by způsobilo vážné ekologické i ekonomické problémy, proto je třeba studovat jejich imunitní systém. V teoretické části této bakalářské práce jsou shrnuty dostupné informace o individuální imunitě včely medonosné (*Apis mellifera*) se zaměřením na střevní epitel a antimikrobiální peptidy. Střevní epitel slouží jako ochranná bariéra před patogeny, které pronikají do těla včel spolu s potravou. Antimikrobiální peptidy jsou důležitou složkou humorální imunity. Jejich produkce je aktivována imunitními signálními dráhami. Jsou produkovány hemocyty nebo tukovým tělískem.

V praktické části byla stanovena koncentrace celkových proteinů ve včelí hemolymfě Bradfordovou metodou. Dále byla provedena analýza včelí hemolymfy metodou tricínové polyakrylamidové elektroforézy s přidavkem nebo bez přidavku močoviny s následným barvením gelu koloidním barvivem Coomassie Brilliant Blue G250. Proteiny byly přeneseny z gelu na polyvinylidenfluoridovou membránu Western blottingem. Pro kontrolu správného přenosu proteinů byly membrány barveny Ponceau S. Antimikrobiální peptidy abaecin, hymenoptaecin a defensin-1 byly následně imunochemicky detekovány prostřednictvím specifické vazby primárních protilátek a sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase. V hemolymfě byly detekovány abaecin a defensin-1, zatímco hymenoptaecin nebyl detekován. Metody je třeba dále optimalizovat.

Dále byla testována metoda imunohistochemické detekce abaecinu a defensinu-1 ve vzorcích celých střev. Vzorky byly inkubovány se specifickými primárními protilátkami a sekundární protilátkou konjugovanou s fluoresceinisothiokyanátem. Následně byly vzorky pozorovány pod mikroskopem ve viditelném světle a fluorescenčním spektru. U střev, která byla inkubována s primární protilátkou pro abaecin nebo defensin-1, byl pozorován fluorescenční signál.

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, <i>Apis mellifera</i> , individuální imunita, střevní epitel, včela medonosná
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Linda Tölgová
Title	Studies of antimicrobial peptides in honey bee epithelial immunity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2021

Abstract

A high decrease in bee colonies has been observed in recent years. Bees are an indispensable part of the ecosystem, as they participate in the pollination of plants, which is essential for the reproduction of some plants. The extinction of bees would cause serious environmental and economic problems, therefore it is necessary to study their immune system. The theoretical part of this bachelor thesis summarizes the available information about individual immunity of the honey bee (*Apis mellifera*) with a focus on the intestinal epithelium and antimicrobial peptides. The intestinal epithelium serves as a protective barrier against pathogens which enter the body of bees along with food. Antimicrobial peptides are an important component of humoral immunity. Their production is activated by the immune signalling pathways. They are produced by hemocytes or fat body.

In the practical part, total protein concentration in bee hemolymph was determined by the Bradford method. Furthermore, bee hemolymph was analysed by the method of tricine polyacrylamide electrophoresis with or without the addition of urea, followed by staining of the gel with colloidal dye Coomassie Brilliant Blue G250. Proteins were transferred from the gel to the polyvinylidene fluoride membrane by Western blot. Membranes were stained with Ponceau S to check for proper protein transfer. The antimicrobial peptides abaecin, hymenoptaecin and defensin-1 were subsequently immunochemically detected by specific binding of primary antibodies and secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase. Abaecin and defensin-1 were detected in the hemolymph, while hymenoptaecin was not detected. The methods need to be further optimized.

Furthermore, the method of immunohistochemical detection of abaecin and defensin-1 in whole intestinal samples was tested. The samples were incubated with specific primary antibodies and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody. Subsequently, the samples were observed under a microscope in the visible light and fluorescence spectra. A fluorescent signal was observed in the intestines that were incubated with the primary antibody for abaecin or defensin-1.

Keywords	Antimicrobial peptides, <i>Apis mellifera</i> , individual immunity, intestinal epithelium, honey bee
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH	
1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Individuální včelí imunita	10
2.1.1 Fyzikální bariéry	10
2.1.1.1 Epiteliální imunita	11
2.1.2 Buněčná imunita	13
2.1.3 Humorální imunita	16
2.1.3.1 Lektiny	16
2.1.3.2 Lysozomy	16
2.1.3.3 Fenoloxidasová kaskáda	17
2.2 Antimikrobiální peptidy	18
2.2.1 Struktura, vlastnosti a produkce antimikrobiálních peptidů	18
2.2.2 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů	19
2.2.3 Apidaecin	22
2.2.4 Abaecin	23
2.2.5 Defensiny	23
2.2.6 Hymenoptaecin	25
2.2.7 Antimikrobiální peptidy obsažené ve včelím jedu	25
2.3 Signální dráhy	26
2.3.1 Signální dráha IMD	26
2.3.2 Signální dráha Toll	26
2.3.3 Signální dráha JAK/STAT	28
2.4 Přehled publikovaných metod detekce a kvantifikace antimikrobiálních peptidů	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 Materiál a přístroje	31
3.1.1 Chemikálie	31
3.1.2 Biologický materiál	33
3.1.3 Instrumentace a pomůcky	33
3.2 Metody	34
3.2.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda	34
3.2.1.1 Zásobní roztoky pro Bradfordovu metodu	34
3.2.1.2 Vlastní postup měření	35
3.2.2 SDS-PAGE elektroforéza	35
3.2.2.1 Příprava roztoků	35
3.2.2.2 Příprava gelů	36
3.2.2.3 Průběh elektroforézy	37
3.2.3 Detekce celkových proteinů Coomassie Brilliant Blue	37
3.2.4 Western blotting	38
3.2.4.1 Příprava roztoků	38
3.2.4.2 Semi-dry blotting	38
3.2.5 Detekce proteinů na blotovací membráně barvením Ponceau S	38
3.2.6 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů	39
3.2.7 Imunohistochemická detekce antimikrobiálních peptidů ve střevě včely	40
3.2.7.1 Příprava roztoků	40
3.2.7.2 Vlastní postup detekce	40
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	42
4.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda	42
4.2 Detekce celkových proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue	43
4.3 Detekce proteinů na blotovací membráně barvením Ponceau S	46
4.4 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů	49

4.5	Imunohistochemická detekce antimikrobiálních peptidů	52
5	ZÁVĚR	57
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62

Cíle práce

Vypracovat literární rešerši shrnující dostupné poznatky o funkci antimikrobiálních peptidů jako složkách humorální imunity hmyzu, se zaměřením na epiteliální imunitu a včelu medonosnou.

Optimalizace metody detekce vybraných antimikrobiálních peptidů ve včelí hemolymfě metodou Western blotting.

Testování metody imunohistochemické detekce vybraných antimikrobiálních peptidů ve vzorcích celých včelích střev.

1 ÚVOD

V posledních letech bylo pozorováno chronické zvyšování nemocnosti včelstev, které může vést až ke kolapsům celých úlů. Včelí choroby jsou způsobené celou řadou původců bakteriálních a virových infekcí, k jejichž přenosu také přispívá infekce včelstev parazitem *Varroa destructor*. Studium včelí imunity a exprese antimikrobiálních peptidů (dále jen AmP) v reakci na různé patogeny může přispět k lepšímu pochopení imunitních odpovědí, snazší kontrole patogenních infekcí, a potenciálně až k nalezení řešení úhynu včelstev (Evans *et al.*, 2006; Mondet *et al.*, 2020).

Imunitní systém včel lze rozdělit na sociální imunitu včelstva a individuální imunitu jedince. Součástí individuální imunity včel je bariérová imunita, působící na povrchu kutikuly a epitelu, a systémová imunita, která působí za ochrannou bariérou. Systémová imunita se dělí na buněčnou a humorální imunitu. Humorální imunita včel spočívá v produkci humorálních faktorů, kterými jsou např. AmP. Exprese AmP je řízena imunitními signálními dráhami Toll, IMD, JAK/STAT a JNK (Jefferson *et al.*, 2013; Danihlík *et al.*, 2015).

Střevní mikrobiom, který se nachází ve střevním epitelu včel, ovlivňuje imunitní systém. Včely s přirozeným střevním mikrobiomem disponují vyššími hladinami AmP, konkrétně apidaecinem a hymenoptaecinem, než včely bez mikrobiomu. Regulace AmP je odlišná u různých druhů symbiotických bakterií včelího mikrobiomu (Kwong *et al.*, 2017).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Individuální včelí imunita

Včelí hnízdo, kde pospolu žije až deset tisíc jedinců na malém prostoru s konstantní teplotou 35 °C, vysokou vlhkostí a za neustále probíhajícího kontaktu mezi jedinci včetně vzájemného krmení z úst do úst (tzv. trofalaxe), je ideální prostředí pro růst a rychlé šíření patogenů. Včely tomuto ohrožení přizpůsobily svou fyziologii, sociální i individuální imunitní systém (Klaudiny *et al.*, 2005; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Individuální imunitní systém včel se dělí na bariérovou imunitu, jejíž obranné mechanismy působí na povrchu kutikuly a epitelu, a systémovou imunitu, která zajišťuje obranu proti patogenům za ochrannou fyzikální bariérou. Důležitými imunitními složkami je humorální a buněčná imunita (Jefferson *et al.*, 2013).

Patogen, napadající včelu, čelí třem základním liniím obrany. První obrannou linií je fyzikální bariéra, bránící proniknutí patogenu do těla. Po překonání fyzikální bariéry patogeny stimulují imunitní odpověď, na které se podílí imunitní buňky a humorální imunita, která spočívá v produkci humorálních látek. Exprese humorálních látek je regulována pomocí komplikovaného systému vnitrobuněčných signálních drah (Daníhlík *et al.*, 2015).

2.1.1 Fyzikální bariéry

Kutikula, stěny zažívacího traktu a tracheální soustavy tvoří první obrannou bariéru, se kterou se setkává patogen (Gliński a Jarosz, 2001). Proti parazitickým houbám, s výjimkou kvasinek a plísní, produkujících enzym chitinasu (EC 3.2.1.14), je kutikula chráněna vosky a nenasycenými mastnými kyselinami. Pokud dojde k enzymovému či mechanickému narušení kutikuly, patogeny se dostanou do těla a mohou způsobit těžkou infekci, která může vést až k usmrcení organismu. Žaludek neobsahuje chitinovou výstelku, proto je nejméně chráněnou bariérou trávicí soustavy. Patogeny pak mohou proniknout skrz žaludeční stěnu přímo do hemocoelu. Žaludek je bráněn před růstem a množением patogenů látkami jako jsou např. fytoncidy, které mají antimikrobiální vlastnosti a včela je přijímá prostřednictvím potravy z rostlin (Gliński a Buczek, 2003). K udržení epitelu trávicí soustavy aktivně napomáhají společenství komensálních a symbiotických mikroorganismů (Ryu *et al.*, 2010).

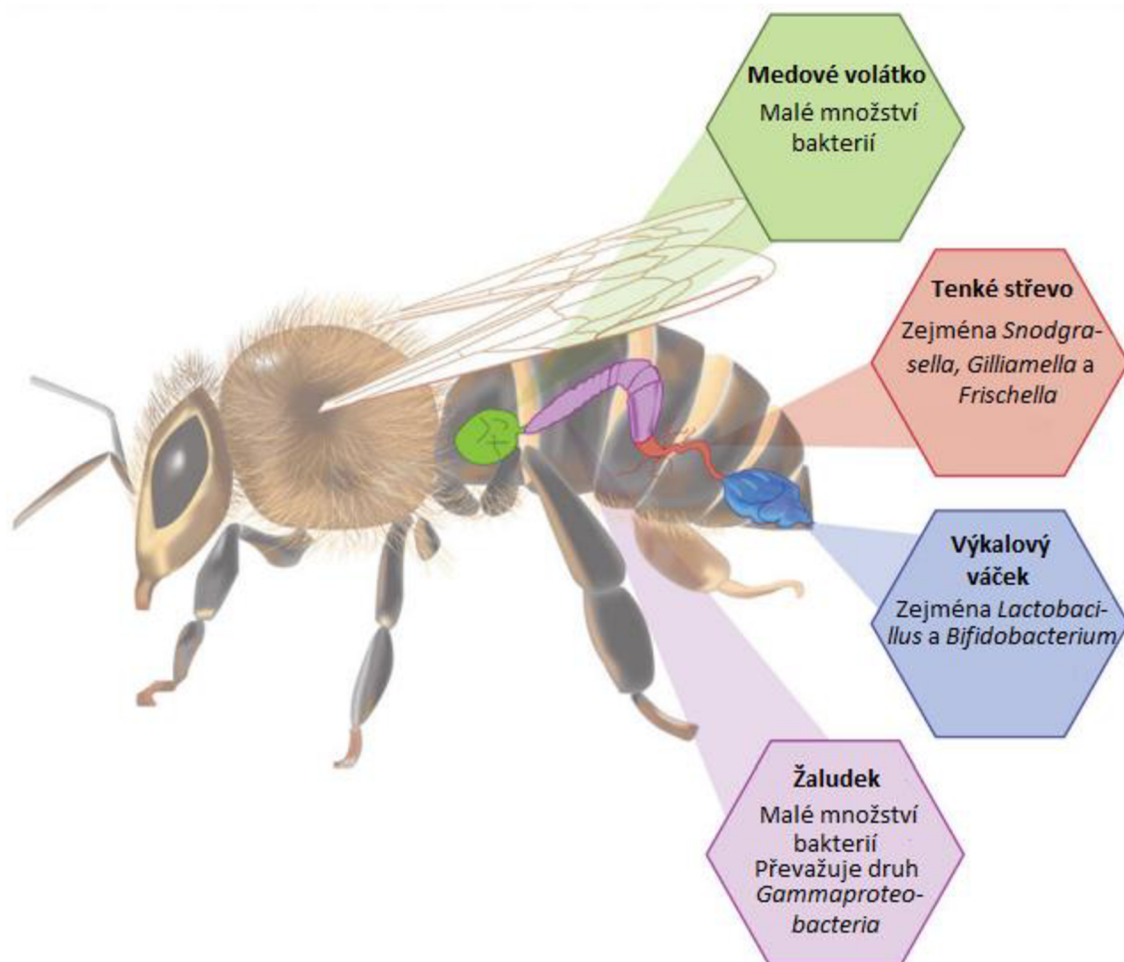
2.1.1.1 Epiteliální imunita

Imunitní systém včel je významně ovlivněn symbiotickým střevním mikrobiomem, který se primárně účastní zpracování potravy, ale také usnadňuje zneškodnění patogenů. Střevní mikrobiom, který se dlouhodobě vyvíjel pomocí sociálního chování včel, obsahuje přibližně devět bakteriálních druhů (Kwong *et al.*, 2017). Bakterie *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, dva druhy *Lactobacillus* kmene *Firmicutes* (Firm-4 a Firm-5) a *Bifidobacterium* jsou součástí střev všech dospělých včelích dělnic a lze je pokládat za základní včelí mikrobiom. Zbylé čtyři druhy bakterií, kterými jsou *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara* a *Acetobacteraceae*, byly nalezeny u mnoha včelích dělnic, ale v některých případech chyběly (Raymann a Moran, 2018).

Hojnost a druhová pestrost střevního mikrobiomu je odlišná, jak v určitém životním stádiu dělnic, tak i mezi jednotlivými orgány trávicí soustavy, která se dělí na medové volátko, žaludek, tenké střevo a výkalový váček (Obr. 1) (Martinson *et al.*, 2012). Základní včelí mikrobiom je přítomný ve všech částech trávicí soustavy, avšak v různém množství jednotlivých druhů (Raymann a Moran, 2018). Martinson *et al.* (2012) studovali pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace vliv individuálního vývoje dělnic na střevní mikrobiom. V trávicí soustavě larev a mladých dělnic se vyskytovalo malé nebo téměř žádné množství symbiotických bakterií ve srovnání se staršími dělnicemi. Medové volátko starších dělnic obsahovalo velmi malé množství bakterií (Martinson *et al.*, 2012). Moran *et al.* (2012) uvádějí že, v tenkém střevě starších dělnic jsou nejvíce zastoupeny bakteriální druhy *S. alvi* a *G. apicola*. Souvislá vrstva bakterií *S. alvi* se nachází zejména na epitelálních záhybech tenkého střeva. Poblíž přelomu žaludku a tenkého střeva v oblasti pyloru, se vyskytují bakterie *F. perrara*, které v tomto místě vyvolávají tvorbu hnědé skvrny způsobené melanizací. Melanizace je aktivována stimulací imunitních cest.

Martinson *et al.* (2012) dále popisují odlišnosti mezi žaludkem, tenkým střevem a výkalovým váčkem v bakteriálních druzích Firm-5, *S. alvi* a *G. apicola*. V žaludku převažoval druh bakterie *S. alvi* a celkové množství bakterií zde bylo vyšší než v medovém volátku. V tenkém střevě převládaly bakterie *S. alvi* a *G. apicola*, dále se tam nacházelo menší množství bakterií Firm-5, které vytvářely shluky. Výkalový váček obsahoval velké množství *Lactobacillus* s převažujícím množstvím bakterií Firm-5. V každé části trávicí soustavy probíhají různé katabolické procesy,

a proto se v jednotlivých částech vytváří odlišné mikrobiální společenství (Martinson *et al.*, 2012). Úplný střevní mikrobiom dělnice získávají před vylétnutím z úlu prostřednictvím sociální komunikace, kontaktu s fekáliemi a vlivem prostředí v úlu (Powell *et al.*, 2014).



Obr. 1 Schématické znázornění rozložení bakteriálních komunit v trávicím traktu starších dělnic. Zleva medové volátko, žaludek, tenké střevo a výkalový váček (převzato a upraveno dle Raymann a Moran, 2018).

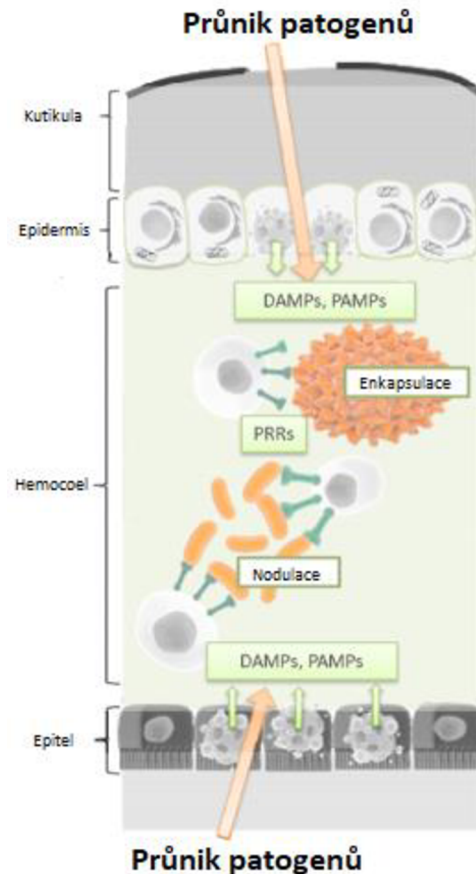
Stresové podmínky, jako je nedostatek potravy, teplotní šok či antibiotika, mohou výrazně narušit střevní mikrobiom. Poškozený střevní mikrobiom má pak značný vliv na reakci včel na tyto stresové podmínky, tím pádem i nepříznivý vliv na stimulaci imunitního systému (Tian *et al.*, 2012).

Jelikož v epiteliální imunitě oproti systémové imunitě probíhá neustálý mikrobiální kontakt, jehož příčinou jsou symbiotické bakterie, epiteliální imunita reguluje AmP mnohem komplexněji než imunita systémová (Ryu *et al.*, 2010). Kwong *et al.* (2017) prokázali, že včely s nepatogenním střevním mikrobiomem – tedy včely naočkované *S. alvi*, *G. apicola*, *F. perrara*, *Bifidobacterium spp* a *Lactobacillus* kmene *Firmicutes*, měly ve střevní tkáni vyšší koncentraci AmP, konkrétně apidaecinu a hymenoptaecinu, než včely bez střevního mikrobiomu. Regulace AmP byla také závislá na konkrétním druhu bakterií např. *S. alvi* zvyšovala genovou expresi apidaecinu. Podle Emery *et al.* (2017) bakterie *F. perrara* stimulovala dramatický nárůst apidaecinu.

Kwong *et al.* (2017) dále uvádějí, že bakterie střevního mikrobiomu měly rozdílnou citlivost na jednotlivé druhy AmP včel. Běžný včelí mikrobiom, v porovnání s včelami naočkovanými *Escherichia coli*, byl více odolný vůči apidaecinu. Konkrétně grampozitivní bakterie (*Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus Firm-5*) byly značně odolné vůči apidaecinu a hymenoptaecinu, za to gramnegativní bakterie, zejména *S. alvi*, vykazovaly vyšší citlivost na hymenoptaecin.

2.1.2 Buněčná imunita

Otevřený krevní oběh, ve kterém proudí hemolymfa, zajišťuje rychlejší šíření hemocytů, zároveň však snadnější vniknutí a rozšíření patogenů do celého těla. Průnik patogenů, které se dostaly přes střevní epitel do hemocoelu poškozením kutikuly nebo spolu s potravou (Obr. 2), je doprovázen uvolněním molekulárních vzorů asociovaných s poškozením (dále jen DAMPs) a molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (dále jen PAMPs) (Dubovskiy *et al.*, 2016). PAMPs mohou být například lipopolysacharidy (dále jen LPS) a peptidoglykany (Ryu *et al.*, 2010). Rozpoznávací receptory molekulárních vzorů (dále jen PRR), které jsou navázány na hemocyty nebo volně přítomné v hemolymfě, reagují na DAMPs a PAMPs, čímž dochází k přilnutí hemocytů na cizorodé molekuly a buňky (Dubovskiy *et al.*, 2016).

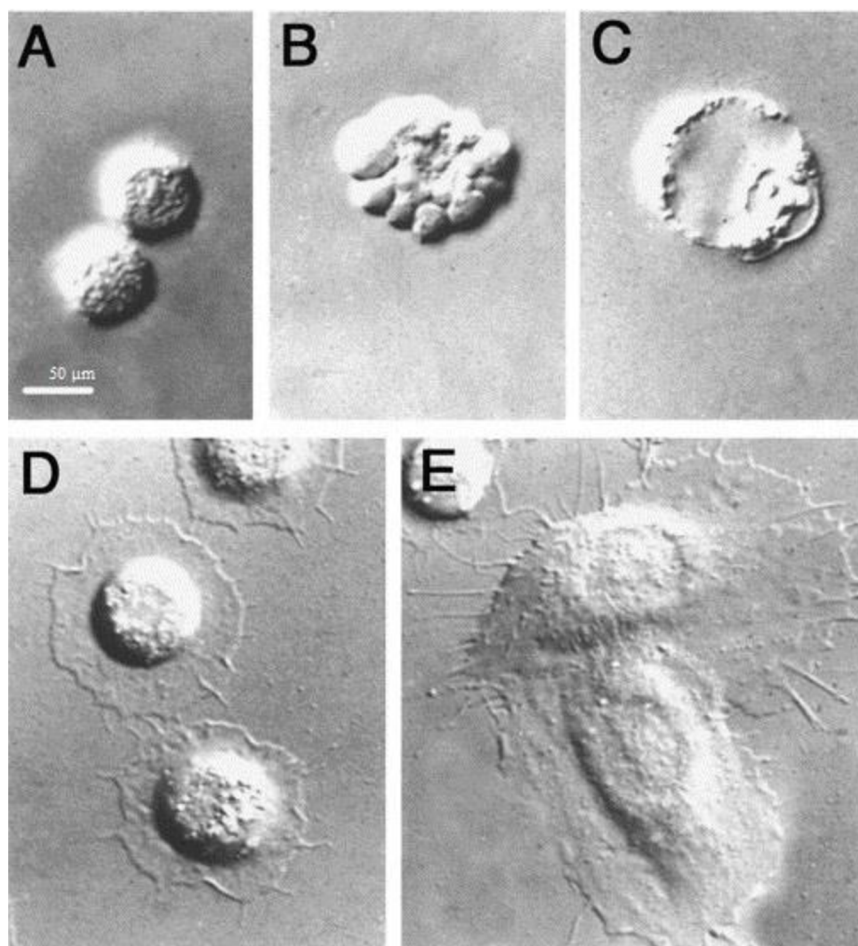


Obr. 2 Schématické znázornění průniku patogenů do hemocoelu doprovázené DAMPs a PAMPs, s následnou tvorbou enkapsul a nodul (převzato a upraveno podle Dubovskiy *et al.*, 2016).

Buněčná imunita, zprostředkovaná hemocyty, zajišťuje bariéru mezi proniklými objekty a hemocoelem třemi hlavními obrannými strategiemi, kterými jsou procesy zapouzdření, nodulace a fagocytóza. Při procesu zapouzdření hemocyty obalí větší patogeny a nerozložitelné materiály, přičemž dochází ke spolupráci mezi několika hemocyty. Výsledkem procesu je tvorba ochranných pouzder kolem patogenů (Gliński a Buczek, 2003; Eleftherianos *et al.*, 2009). Proces zapouzdření může být z ultrastrukturálního pohledu zaměněn za proces nodulace. Procesy se liší v závislosti na druhu patogenu, proti kterému působí. Při nodulaci se hemocyty vážou na bakteriální shluky, zatímco při zapouzdření se poutají na větší cizorodá tělesa, jako jsou parazitoidy nebo hlístice (Lavine a Strand, 2002). Úkolem hemocytů je oddělit a neutralizovat patogeny (Dubovskiy *et al.*, 2016). Součástí těchto procesů je částečné narušení povrchu membrány hemocytů po přilnutí na patogen, který se snaží eliminovat (Gliński a Buczek, 2003). Přilnavost hemocytů k povrchům patogenů nebo k sobě navzájem zajišťují adhezní molekuly. Po adhezi na patogen dojde v hemocytech k reakcím spojených s melanizací, čímž dojde k uvolnění reaktivních forem kyslíku (dále jen ROS),

reaktivních forem dusíku (dále jen RNS) a látek působících jako antioxidanty (Negri *et al.*, 2013; Marringa *et al.*, 2014). V některých případech hemocyty přímo zneškodňují bakterie, spory hub a jiné malé patogenní molekuly fagocytózou (Gliński a Buczek, 2003). Fagocytóza je proces pohlcení patogenu o malém rozměru hemocytem (Dubovskiy *et al.*, 2016).

Hemocyty se rozlišují na prohemyty, granulární buňky, plazmocyty, buňky sféroidů a oenocytoidy (Obr. 3) (Lavine a Strand, 2002). Wilson-Rich *et al.* (2008) uvádějí, že počet hemocytů se mění v průběhu života včely. Včelí larvy a kukly mají nejvyšší počet hemocytů. Bylo pozorováno, že na proces zapouzďení nemá počet hemocytů vliv, jelikož zapouzďení probíhá ve všech životních stádiích včely (larva, kukla, krmička a létavka) stejnou rychlostí.



Obr. 3 Snímky pěti druhů hemocytů nalezených u *Pseudoplusia includens* pod mikroskopem. A – prohemyty, B – buňky sféroidů, C – oenocytoidy, D – granulární buňky, E – plazmocyty (převzato z Lavine a Strand, 2002).

2.1.3 Humorální imunita

Složky humorální imunity jsou produkovány tukovým tělískem a hemocyty (Laughton *et al.*, 2011). Wilson-Rich *et al.* (2008) vážili hmotnost tukových tělísek u krmiček a létavek a zjistili, že krmičky obsahují více tukové hmoty než létavky. S věkem tedy klesá hmotnost tukového tělíska (Wilson-Rich *et al.*, 2008). AmP se však tvoří i v jiných tkáních jako je např. epitel (Hoffmann, 2003). Zatímco některé humorální složky jsou přítomny v hemolymfě stále, tvorba dalších složek může být ovlivněna pohlavím či životní fází včely, nebo jsou složky vytvořeny až v reakci na imunitní stimul, například na patogenní infekci (Laughton *et al.*, 2011).

Včelí genom kóduje jeden gen profenoloxidasý (dále jen proPO), tři lysozomy (dva typu c a jeden typu i), lektin 5 C-typu a čtyři proteiny obsahující thiolester. Imunitní systém včel je v mnoha ohledech velmi podobný imunitnímu systému *Drosophila*. Včelí genom obsahuje přibližně jednu třetinu imunitních genů oproti genomu *Drosophila*, které jsou rozděleny do 17 genových rodin (Evans *et al.*, 2006). Menší počet imunitních genů včel částečně vynahrazuje sociální imunita a omezené množství druhů patogenů, kterým jsou včely vystaveny (Cremer *et al.*, 2007).

2.1.3.1 Lektiny

Hmyz na rozdíl od obratlovců postrádá adaptivní imunitu a disponuje pouze imunitou vrozenou. Rozpoznávací funkci u hmyzu zastávají lektiny, které jsou důležitou součástí vrozené imunity nejen hmyzu, ale i savců (Wilson *et al.*, 1999). Fungují jako PRR, reagující na PAMPs.

Molekuly lektinů obsahují různé funkční domény jako např. vazebná místa pro rozpoznávání sacharidů nebo vazebná místa, která jsou závislá na přítomnosti vápníku v molekule ligandu. Účastní se tvorby uzlů, aglutinace, enkapsulace a aktivace proPO. Mimo imunitní odpovědi mají vliv i na udržování homeostázy střevního mikrobiomu (Xia *et al.*, 2018).

2.1.3.2 Lysozomy

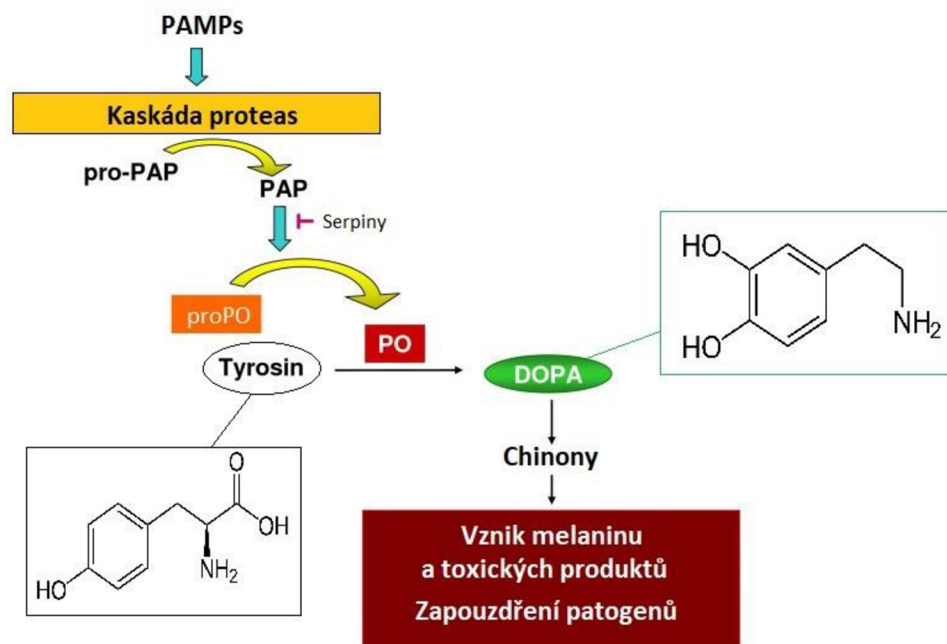
Lysozomy (EC 3.2.1.17) působí jako katalytické glykosidhydrolasy s Glu a Asp zbytky v aktivním místě (Casteels *et al.*, 1990). Štěpí β -(1,4)-glykosidické vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v peptidoglykanech bakteriální buněčné stěny (Callewaert a Michiels, 2010).

2.1.3.3 Fenoloxidasová kaskáda

PRR v reakci na PAMPs nebo DAMPs způsobí aktivaci podněcujících proteas, které iniciují proteasovou kaskádu, čímž dojde k přeměně neaktivní proteinasy (dále jen pro-PAP), běžně obsažené v hemolymfě, na její aktivní formu PAP. PAP rozkládá proPO, čímž dochází k její aktivaci. proPO je přítomna v hemolymfě a kutikule (Dubovskiy *et al.*, 2016). Aktivací zymogenu proPO je spuštěna tvorba fenoloxidasy (dále jen PO, EC 1.14.18.1), která oxiduje deriváty tyrosinu na toxické chinony. Polymerací chinonů vznikají melaniny (Obr. 4) (Wilson-Rich *et al.*, 2008). Melaniny se kromě imunitních reakcí podílí na sklerotizaci kutikuly, zbarvení křídel a očí, tvorbě sraženin, hojení ran, organogenezi i udržení homeostázi střev (Whitten a Coates, 2017).

Melanizace je konečnou fází fenoloxidasové kaskády. Je to proces propojující humorální a buněčnou imunitu, který se odehrává během zapouzdrění nebo nodulace (Eleftherianos *et al.*, 2009). Během melanizace se uvolňují ROS a RNS, které slouží k likvidaci patogenů. ROS vznikají redukcí kyslíku a RNS vznikají při přeměně L-argininu na L-citrulin enzymem synthasou oxidu dusnatého (EC 1.14.13.39). ROS a RNS jsou lokalizovány v plazmatické membráně, cytosolu, peroxisomech a na membránách mitochondrií a endoplazmatického retikula. Udržování procesu melanizace zajišťují antioxidanty a serpiny, které neutralizují toxické produkty, jejichž hlavní úlohou je ničit patogenní organismy, avšak mohou působit škodlivě i vůči samotnému hostiteli, proto musí být regulovány. Toxickými produkty jsou např. *o*-chinony, peroxid vodíku nebo *o*-semichinonové radikály (Di Meo *et al.*, 2016; Dubovskiy *et al.*, 2016).

Laughton *et al.* (2011) uvádějí, že včely ve stádiu larvy vykazovaly nízkou aktivitu PO. Při reakci na patogenní podnět u dělnic byla pozorována nízká hladina PO, pravděpodobně způsobená okamžitým spotřebováním PO, která nebyla znovu obnovena. Imunitní odpověď byla účinnější a rozsáhlejší u dospělých dělnic oproti trubcům. Podle Wilson-Rich *et al.* (2008) aktivita PO roste se stářím včel, u včelích larev a kukel nebyl pozorován zásadní rozdíl.



Obr. 4 Schématické znázornění procesu fenoloxidásové kaskády. Zkratka DOPA je dopamin (převzato a upraveno dle Garcia *et al.*, 2009).

2.2 Antimikrobiální peptidy

Jednou ze základních složek humorální imunity jsou AmP. U včel lze najít tyto AmP – abaecin, apidaeciny, hymenoptaecin, defensiny a AmP obsažené ve včelím jedu (de Lima a Broschetto-Braga, 2003; Yi *et al.*, 2014).

U včel byly pozorovány procesy imunosenescence při aktivaci exprese AmP (Laughton *et al.*, 2011). Imunitní stárnutí je způsobeno změnou patogenů, které včely ohrožují. Larvy a kukly jsou vystavovány chorobám, které způsobují bakterie (např. *P. larvae* nebo *Streptococcus pluton*), plísňe (např. *Ascophæra apis*) nebo viry (např. virová nákaza včelího plodu). Dospělé včely jsou náchylné na odlišné onemocnění způsobené houbami (např. *Nosema apis*), roztoči (např. *Acarapis woodi* nebo *V. destructor*) nebo viry (virus chronické paralýzy včel) (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

2.2.1 Struktura, vlastnosti a produkce antimikrobiálních peptidů

Společnými vlastnostmi AmP hmyzu je nízká molekulová hmotnost a kladný náboj při fyziologickém pH. Z hlediska struktury mohou být AmP hmyzu klasifikovány do tří skupin. První skupinou jsou peptidy, které obsahují intramolekulární disulfidické vazby vytvářející strukturu podobnou vlásenkám β -skládaného listu, nebo smíšenou strukturu

α -helixu a β -skládaného listu. Do další skupiny patří peptidy, tvořené amfipatickými α -helixy. Třetí skupinu tvoří peptidy bohaté na prolin a glycin (Bulet *et al.*, 1999).

Podle Andreu a Rivas (1998) defensin a royalisin řadíme mezi cyklické peptidy, zatímco abaecin, apidaeciny a hymenoptaecin jsou lineární peptidy. Hymenoptaecin má odlišnou strukturu od všech známých AmP a jeho primární struktura je bohatá na Gly. Abaecin a apidaeciny jsou peptidy bohaté na Pro (Evans *et al.*, 2006). Defensiny patří mezi peptidy bohaté na Cys (Yi *et al.*, 2014).

Produkce apidaecinu je řízena transkripční aktivací, která reaguje již na malé množství patogenů, spolu s unikátním geneticky kódovaným amplifikačním mechanismem. Pro zahájení transkripce genů pro abaecin, hymenoptaecin nebo defensiny je nezbytná velká patogenní infekce. Aktivace transkripce genu pro defensin je pomalá a vyžaduje posttranslační zpracování. Po aktivaci transkriptu je vyprodukováno pouze minimální množství tohoto peptidu. Imunitní systém se přednostně přizpůsobuje na obranu proti gramnegativním rostlinným bakteriím, jelikož jim včely čelí nejčastěji a jsou do úlu zavlečeny z opylovaných rostlin (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

2.2.2 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Kladný náboj a amfipatický charakter molekuly AmP zajišťují interakci se zápornými molekulami lipidů, které jsou součástí bakteriálních membrán (Daníhlík *et al.*, 2015). Amfipatická struktura AmP způsobuje tvorbu iontových kanálků, kterými pronikají protony, čímž dojde ke změně membránového potenciálu, který je nezbytný pro zásadní životní děje v buňce. Narušení membránového potenciálu může vést až k buněčné smrti (Casteels *et al.*, 1994). Kladně nabitě molekuly AmP jsou elektrostaticky přitahovány a vázány k záporně nabitým membránovým povrchům (Daníhlík *et al.*, 2015). Záporný náboj membrány gramnegativních bakterií způsobují LPS, které jsou její součástí, zatímco membrána grampozitivních bakterií obsahuje kyselinu teichoovou a kyselinu teichuronovou, které jsou záporně nabitě (Hancock, 1997; Tossi *et al.*, 2000). Vazba AmP na membránu může způsobit usmrcení bakterie nebo je pouze přechodná a slouží k usnadnění průniku AmP skrz bakteriální membránu (Hancock a Chapple, 1999). Po průniku do bakterie lineární AmP přizpůsobí svou konformaci pro interakci s cytoplazmatickou membránou tak, že hydrofilní povrch peptidu směřuje k hlavám fosfolipidů membrány a hydrofobní povrch zasahuje do středu fosfolipidové dvojvrstvy. Tyto interakce mohou vést k různorodým změnám struktury bakteriální membrány.

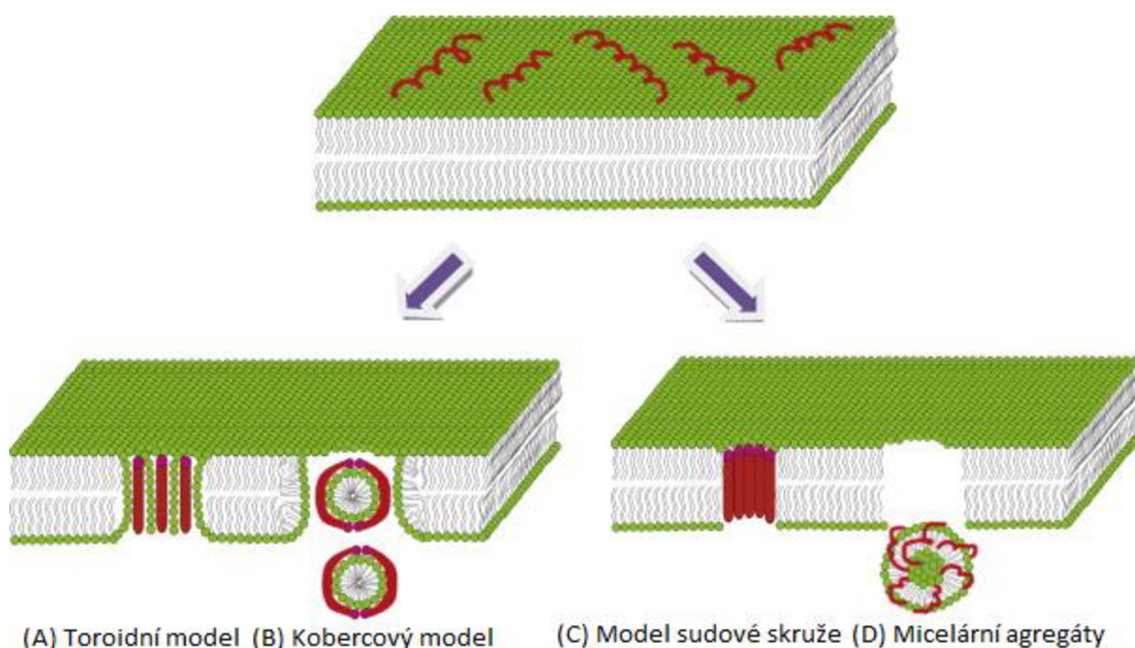
AmP mohou membránu narušovat toroidním způsobem (Obr. 5A). Shlukováním AmP na povrchu membrány dochází ke vzniku záhybů, ze kterých se následně vytvoří póry. Stěny vzniklých pórů jsou tvořeny nejen peptidy, ale i hydrofobními fosfolipidovými hlavami (Mihajlovic a Lazaridis, 2010).

Kobercový model je dalším mechanismem narušení membrány AmP, při němž dochází ke kobercovému pokrytí povrchu membrány peptidy (Obr. 5B), které vede k tvorbě přechodných pórů v membráně, případně až k rozpadu membrány za vzniku micel (Hancock, 1997). Propustnost membrány nastává až ve chvíli, kdy peptid v místě působení dosáhne vysoké koncentrace. Vzniklé přechodné póry v membráně mohou způsobit únik molekul s malou molekulovou hmotností. Při narušení membrány kobercovým mechanismem nezasahují peptidy do hydrofobního středu membrány, ale interagují pouze s hydrofilním povrchem.

Peptidy se strukturou α -helixu mohou vytvářet transmembránové kanálky dle modelu sudové skruže (Obr. 5C). Na rozdíl od peptidů působících kobercovým mechanismem tyto peptidy zasahují svou hydrofilní částí molekuly dovnitř membrány. Při tvorbě kanálku spolupracuje více peptidů za vzniku oligomerů, čímž dochází k rozšíření kanálku (Shai, 1999). K destrukci buňky dochází depolarizací, propouštěním důležitých buněčných součástí a narušením funkčnosti membrány vlivem neuspořádanosti lipidů nebo aktivací hydrolas (Jean-François *et al.*, 2008).

Narušení membrány nemusí vždy zapříčinit buněčnou smrt. Při procesu vzniku agregovaného kanálu (Obr. 5D) nejprve peptidy vytěsní dvojmocné hořečnaté a vápenaté kationty asociované s LPS a nahradí je, čímž získají přístup k vnější i vnitřní membráně (Bond *et al.*, 2008).

AmP se mohou skrz vytvořené póry v membráně dostat dovnitř buňky a vázat se na vnitrobuněčnou DNA, RNA nebo proteiny. Zamezují tvorbě buněčné stěny, syntéze DNA, RNA nebo proteinů (Maróti *et al.*, 2011).



Obr. 5 Schématické znázornění interakce AmP s fosfolipidovou dvojvrstvou cytoplazmatické membrány. Červeně jsou znázorněny AmP, zeleně je znázorněna hydrofilní vrstva a bílé vrstva hydrofobní (převzato a upraveno dle Li *et al.*, 2012).

Při zprostředkování imunitní odpovědi AmP, jednotlivé peptidy doplňují navzájem své antimikrobiální vlastnosti, na rozdíl od jiného hmyzu, kde dochází k jejich úzké součinnosti jako např. u mūr *Hyalophora cecropia*, které ničí bakterie poškozením jednotlivých částí buněčné stěny spoluprací vysoce specializovaných polypeptidů. Všechny AmP způsobují určitou destrukci buněčné membrány, kromě apidaecinů (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

Casteels-Josson *et al.* (1994) provedli analýzu RNA včel pomocí Northern blottingu, čímž zjistili, že hymenoptaecin, abaecin nebo defensin-1, jsou kódovány jedním hlavním genem, zatímco apidaecin je kódován více geny. Hladina transkriptů genů je vyvolána a zvyšována v reakci na patogenní infekci. Koncentrace transkriptů genů pro apidaecin, hymenoptaecin nebo abaecin se pohybovaly na přibližně stejné úrovni, ale hladina koncentrace transkriptů genů pro defensin byla znatelně nižší, což souvisí s koncentrací jednotlivých AmP v hemolymfě. Tyto transkripty v hemolymfě narůstaly po dobu 36 hod od infekce. AmP záměrně nelikvidují všechny patogenní bakterie, protože ponecháním minimálního množství patogenních bakterií zachovávají slabou infekci v organismu a s ní i stále aktivovanou humorální imunitu (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

2.2.3 Apidaecin

Apidaecin je peptid obsahující 18 aminokyselin (dále jen AMK). Včelí genom kóduje geny pro tři isoformy apidaecinu – Ia, Ib a II, které se mírně liší ve své primární struktuře. Apidaecin Ia obsahuje na C-konci řetězce Leu, zatímco C-konec apidaecinu Ib obsahuje Ile. Apidaecin II je svou primární strukturou podobný apidaecinu Ib, pouze se liší AMK v poloze 6, kde je Val nahrazen Ile. Celková koncentrace apidaecinů ve včelí hemolymfě je $50 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Apidaeciny jsou vysoce odolné vůči nízkému stupni pH (až 2) a vysoké teplotě (až $100 \text{ }^\circ\text{C}$). Na stabilitě molekuly se značně podílí obsah šesti prolinů, které zabraňují tvorbě helixů. Jelikož spirálová struktura je typická pro peptidy s lytickým mechanismem působení, apidaeciny nemají schopnost usmrtit bakterie tímto způsobem. Řadí se mezi nejmenší hmyzí AmP s přibližnou molekulovou hmotností 2100 Da. U dospělých včel se nachází aktivní forma peptidu, včelí larvy obsahují velké množství neaktivních prekurzorů (Casteels *et al.*, 1989). Prekurzorová struktura obsahuje opakující se části, které zajišťují rychlé rozšíření imunitní odpovědi (Casteels-Josson *et al.*, 1994). Dominantní prekurzor je 8 pro-apidaecin I (Casteels *et al.*, 1989).

Apidaeciny vykazují antibakteriální účinky proti velké škále druhů gramnegativních rostlinných bakterií. Mezi nejvíce citlivé patogeny patří např. *Erwinia*, *Pseudomonas syringae* a *Rhizobium*. Jsou považovány za hlavní AmP, ostatní AmP doplňují jejich aktivitu působení tím, že jsou účinné proti patogenům, kteří si vytvořili vůči antimikrobiální aktivitě apidaecinů rezistenci (Casteels-Josson *et al.*, 1994). Apidaeciny disponují vysokou účinností při likvidování patogenů. Již velmi malá koncentrace apidaecinů ($0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je účinná proti gramnegativním bakteriím. Tato koncentrace tvoří pouze 0,1 % z celkové koncentrace apidaecinů obsažených v hemolymfě. Působení apidaecinů je rychlé (Casteels *et al.*, 1989). Casteels *et al.* (1989) popisují, že apidaeciny, které byly přidány k bakteriální kultuře *E. coli*, snížily rychlost růstu této kolonie za 1-2 hod.

Apidaeciny nepůsobí na bakterie okamžitým lytickým účinkem, ale ovlivňují jejich šíření. Apidaeciny tedy nenarušují bakteriální fosfolipidovou dvojvrstvu (Casteels *et al.*, 1989). Peptidy bohaté na Pro, jako jsou apidaeciny a abaecin, volně prostupují vnější membránou do periplazmatického prostoru a nevratně se dostávají prostřednictvím absorpce pomocí permeasy nebo přenašeče do cytoplazmy, kde poškozují bakteriální komponenty. Do savčích buněk přirozeně nedifundují a po umělém vniknutí vykazují pouze mírnou toxicitu (Berthold *et al.*, 2013).

Brockmann *et al.* (2009) použili metodu kvantitativní peptidomiky k testování množství peptidů nacházejících se v mozku dělnic v různém životním stádiu. Výsledek ukázal, že apidaecin byl více zastoupen v mozku létavek v porovnání s kojičkami.

Rezistenci bakterií vůči aktivitě apideacinů je možné odstranit substitucemi ve variabilní oblasti apidaecinů. Konstantní oblast je zodpovědná za antibakteriální funkci a změna v této oblasti zapříčiní nefunkčnost ve všech oblastech. Variabilní oblast stanovuje specifičnost působení (Casteels *et al.*, 1994).

2.2.4 Abaecin

Abaecin obsahuje 34 AMK, z toho 10 tvoří Pro. Celkový náboj molekuly je 4+, kladné náboje se nacházejí v pozicích 12, 13, 27 a 29. N-konec řetězce abaecinu je podobný apidaecinu. Ačkoliv mají obdobnou nehelikální strukturu, bylo pozorováno odlišné působení. Přítomnost apidaecinů v místě patogenu byla bezprostřední, zatímco účinek abaecinu byl zpomalený. Apidaeciny účinkují výhradně proti gramnegativním bakteriím, zatímco abaecin je stejně efektivní vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Aktivita apidaecinu vůči kmenům *Agrobacterium*, *Erwinia* a *E. coli* je 200x vyšší než aktivita abaecinu. Mutant *E. coli* NCTC 9001, který je značně odolný vůči apidaecinu, nevykazuje stejnou odolnost vůči abaecinu. Abaecin byl nejvíce aktivní vůči kmenu *Xanthomonas campestris*, který je rezistentní vůči aktivitě apidaecinu (Casteels *et al.*, 1990). Působení abaecinu kompenzuje antibakteriální aktivity apidaecinu vůči bakteriím s rezistencí na apidaecin.

Prekurzor pro abaecin je 53 AMK dlouhý. Zatímco struktura prekurzoru apidaecinu, hymenoptaecinu a defensinu sestává ze signální sekvence, pro-sekvence a sekvence aktivního peptidu v uvedeném pořadí, u prekurzoru abaecinu chybí část pro-sekvence. To znamená, že po proběhnutí translokace do endoplazmatického retikula se abaecin nachází v aktivní formě (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

2.2.5 Defensiny

Peptidy s podobnou strukturou defensinu byly izolovány z několika druhů hmyzu. Včelí defensin byl poprvé izolován z mateří kašičky a byl pojmenován royalisin, téměř identický peptid byl nalezen v hemolymfě. Royalisin a defensin-1, získaný z hemolymfy, mají podobnou primární strukturu peptidového řetězce, který je 51 AMK dlouhý s jednou rozdílnou AMK v poloze 50. U defensinu se nachází Arg, který je u royalisinu substituován Tyr. Celý řetězec defensinu tvoří amfipatickou strukturu (Casteels-Josson *et*

al., 1994). Royalisin má tři disulfidické vazby, které vytváří pevnou globulární strukturu a zajišťují odolnost vůči nízkému pH a vysoké teplotě. Má inhibiční účinek např. na patogenní mikroorganismy *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* a *P. larvae*. Dále má antifungální účinek prokázaný např. proti *Botrytis cinerea*. Zda-li je hladina royalisinu u včelích kojiček vysoká nebo nízká, určují genetické faktory, které regulují transkripční, translační a posttranslační procesy (Bíliková *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2014).

Oba tyto peptidy jsou kódovány polymorfním genem, který byl pojmenován defensin-1. Včelí genom obsahuje dva defensinové geny, již zmíněný defensin-1 a defensin-2, kódující nový peptid defensin-2. Gen pro defensin-2 je strukturně podobný genu pro defensin-1 pouze na 55,8 %. Geny jsou odlišné svou délkou, místem výskytu, strukturou intron-exon a sekvencí pre-pro oblastí. mRNA defensinu-1 je detekovatelná v hypofaryngeálních, mandibulárních a hrudních slinných žlázách včel. Detekovaná transkripce genu pro defensin-1 v hrudních slinných žlázách znamená přítomnost defensinu-1 ve včelích slinách, kde slouží k ochranně epitelu slinných žláz, buněk nervového hřebenu, včelího chlebu, vosku a propolisu. mRNA defensinu-2 nebyla detekována v ani jedné ze tří zmíněných žláz, zato byla detekována v celkové RNA hlavy a hrudi kojiček. Exprese defensinu-2, vzhledem k nízkým transkripčním hladinám jeho genu a regulačním oblastem v promotorových oblastech genu, je indukovatelná nebo up-regulována v případě infekcí (Klaudiny *et al.*, 2005).

Transkripce genu pro defensin-1 ve žlázách hlav včel kojiček se shoduje s expresí royalisinu (Bachanová *et al.*, 2002). Bíliková *et al.* (2001) zjistili, že mateří kašička, získaná z různých zdravých včelstev, má odlišnou antibakteriální aktivitu a různé množství AmP. Důvodem může být genetická variabilita mezi včelami odlišných včelstev.

Prekurzor defensinu 1 obsahuje 129 AMK a na C-konci se nachází Gly, který není přítomný v aktivní formě peptidu. Bylo pozorováno, že Gly prekurzoru je běžně využit k amidaci peptidu, což vede ke stabilizaci helikální struktury potřebné pro lytické působení.

Defensiny eliminují specificky grampozitivní bakterie. Ačkoliv jejich hladiny jsou minimální a pomalé, jsou dostatečně účinné, jelikož po 24 hod ustálené koncentrace defensinů v hemolymfě jsou grampozitivní bakterie trvale eliminovány. Oba geny jsou

indukovatelné nebo up-regulované imunitním stimulem. Up-regulace genu pro defensin-1 probíhá v tukovém těle (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

2.2.6 Hymenoptaecin

Řetězec hymenoptaceinu je 93 AMK dlouhý s vysokým obsahem Gly a s 2-pyrrolidin-5-karboxylovou kyselinou na N-konci. Celkový náboj molekuly při fyziologickém pH je 5. Oproti ostatním AmP aktivity hymenoptaceinu nejsou sníženy při zvýšené iontové síle (Casteels *et al.*, 1993). Hymenoptaecin je komplementární k apidaecinu a eliminuje růst gramnegativních bakterií, které jsou odolné vůči apidaecinu (např. *Xanthomonas*). Je účinný i proti některým typům grampozitivních bakterií. Jeho prekurzor je 95 AMK dlouhý (Casteels-Josson *et al.*, 1994).

2.2.7 Antimikrobiální peptidy obsažené ve včelím jedu

Jedové žlázy včel se stávají funkční po dosažení dospělosti jedince a maximální produkce nastává do dvou až tří týdnů od dovršení dospělosti. Složení jedu i jeho produkce se v průběhu života mění, konkrétně v letních měsících je produkce jedu vyšší, jelikož je včelstvo nejaktivnější a mladí jedinci začínají se svými obrannými strategiemi (de Lima a Broschetto-Braga, 2003). AmP, které jsou obsažené ve včelím jedu, se vyskytují ve včelí kutikule i vosku, který je součástí včelího hnízda, kde AmP slouží jako antiseptikum. Včelí jed má tedy významnou roli jak v ochranně jedince, tak i v sociální obraně (Baracchi *et al.*, 2011).

Ve včelím jedu byly nalezeny tři důležité AmP – neurotoxický apamin, lytický peptid melittin a degranulační peptid mastocytů (dále jen MCD). Apamin je složen z 18 AMK. V sušině včelího jedu tvoří méně než 2 % obsahu. Ovlivňuje sodné a draselné kanálky, avšak nemá lytické účinky jako jiné AmP. MCD peptid, který je chemicky podobný apaminu, obsahuje 22 AMK se dvěma disulfidickými vazbami. Jeho struktura je bohatá na α -helix. Jeho obsah v sušině jedu je méně než 2 %. MCD peptid způsobuje rozpad mastocytů a podobně jako apamin interaguje se specifickými receptory proteinových membrán (de Lima a Broschetto-Braga, 2003).

Melittin je hlavní složka včelího jedu, tvoří přibližně 40-60 % sušiny jedu (Hellgren *et al.*, 2010). Melittin je tvořen 26 AMK a jeho řetězec má amfipatický charakter, který umožňuje jeho interakci s lipidovými membránami. Způsobuje bolest, která provází bodnutí. Příčinou je pravděpodobně jeho tetramerní forma, která má ionoforové vlastnosti, díky kterým dochází ke konstantní depolarizaci kožního nervu. Mezi další jeho

účinky patří lyze buněk jako jsou erytrocyty či lysozomy. Mimo jiné působí fungicidně a antibioticky proti některým mikroorganismům (de Lima a Broschetto-Braga, 2003).

2.3 Signální dráhy

Imunitní odpověď je zahájena rozpoznáváním PAMPs pomocí PRR, čímž se aktivují intracelulární signální cesty iniciující tvorbu faktorů a receptorů buněčné a humorální imunity (Dubovskiy *et al.*, 2016). Imunitní obrany včel se účastní 4 spolupracující signální dráhy, kterými jsou dráhy Toll, IMD, Janus kinase (JAK)/STAT a JNK. Signální dráhy jsou prostudovány prostřednictvím orthologních genů u octomilek *Drosophila melanogaster* a komárů *Anopheles gambiae*. Dráha IMD způsobuje aktivaci složek účastnících se signální dráhy JNK (Evans *et al.*, 2006).

2.3.1 Signální dráha IMD

Aktivita dráhy IMD a Toll naznačuje bakteriální infekci či infekci způsobenou houbami. Dráha IMD reaguje přednostně na kyselinu diaminopimelovou, kterou obsahují peptidoglykany gramnegativních bakterií, anebo na β -1,3-glukan, obsažený v plísniích, zatímco dráha Toll je aktivována lysinovým typem peptidoglykanů grampozitivních bakterií. Peptidoglykany buněčných stěn eubakterií spouštějí aktivitu dráhy Toll i IMD. IMD dráha v reakci na PAMPs aktivuje transkripční faktor Relish, spadající do rodiny NF- κ B. Transkripční faktory rodiny NF- κ B řídí transkripci mnoha imunitních genů včetně genů pro AmP (Kaneko a Silverman, 2005, Ryu *et al.*, 2010). Dráha IMD, na rozdíl od dráhy Toll, se účastní primárně imunitní obrany (Evans *et al.*, 2006). Pokud by včele chyběly dráhy IMD a Toll, její imunita by byla oslabena i vůči běžným nepatogenním mikrobům (Ratiu *et al.*, 2016).

Podle Evans *et al.* (2006) sekvenční analýza genomu dokazuje, že včelí Relish je orthologní k Relish, vyskytujícímu se u *Drosophila*. Podle Schlüns a Crozier (2007) byl imunitní gen Relish podstatně snížen pomocí interference RNA (dále jen RNAi) asi o 70 %. Snížení Relish korelovalo se snížením abaecinu a hymenoptaecinu. Hladina defensinu-1 zůstala nezměněna, jelikož je transkripce genů pro defensinu-1 pravděpodobně řízena zejména Toll signální dráhou.

2.3.2 Signální dráha Toll

Toll signální dráha je vyvolána grampozitivními bakteriemi nebo plísněmi u *Drosophila*. Hmyzí Toll a Toll-like receptory (dále jen TLR) mají důležitou funkci v imunitě i

v embryonálním vývoji. Jsou to transmembránové transdukční proteiny. Signální dráha Toll je spuštěna, když dojde ke specifické vazbě mezi extracelulární oblastí transmembránového receptoru Toll a cytokin-like molekulou Spätzle, která je proteolyticky štěpena. V genomu včel se nacházejí dva orthologní geny pro Spätzle. Vazbou molekuly Spätzle na receptor dochází ke konformačním změnám receptoru, umožňujícím vytvoření komplexu receptoru s několika přijatými proteiny, obsahujícími domény smrti. Aktivní komplex způsobuje degradaci Cactus, inhibitoru molekul rodiny NF- κ B, doprovázenou nukleární translokací NF- κ B dorsalu. Genom včel obsahuje dva dorzální homology – dorsal-1 a dorsal-2. Dorsal-1 má dva transkripty – dorsal-1A a dorsal-1B. Hlavním produktem humorální imunity v rámci signální dráhy Toll je antifungální peptid drosomycin u studované *Drosophila* (Evans *et al.*, 2006, Valanne *et al.*, 2011).

Lourenço *et al.* (2018) zkoumali vliv dorsalu na expresi AmP, vpravením dsRNA prostřednictvím injekce do břišní tkáně kukel včelích dělnic, které byly infikované *P. larvae*. Změny v genové expresi byly vyhodnoceny pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (dále jen qPCR) u každé včelí kukly zvlášť. Bylo zjištěno, že snížením transkripčního faktoru dorsal došlo ke snížení exprese defensinu. Ke snížení defensinu-1 došlo zejména v reakci na snížení isoform dorsala-1A a dorsala-2 pomocí RNAi. Podle Di Prisco *et al.* (2016) umlčení genu dorsal-1A vedlo ke snížení hladin apidaecinu u dospělých včel.

Předpokládá se, že signální dráhy Toll vedou k expresi genů pro AmP, PO a tří typů lysozymů (Evans *et al.*, 2006). Dráha Toll může aktivovat i buněčnou imunitu včetně fagocytózy, zapouzdření a likvidace patogenů. Spoluúčastní se na regulaci proliferace a koncentrování hemocytů. Parazitická vosa *Leptopilina boulardi* způsobuje infekci *Drosophila*, což u ní vyvolá odezvu zprostředkovanou buněčnou imunitou. U *Drosophila* dojde ke zvýšení tvorby cirkulujících plazmocytů, z nichž některé se diferenciují do odlišné třídy hemocytů, kterými jsou lamellocyty. Lamellocyty se poté přímo účastní zapouzdření patogenů a jejich likvidace. Specializace plazmocytů na lamellocyty může být zapříčiněna mutací genu pro Cactus, získá funkční mutace v genu pro Toll receptor nebo konstitutivní exprese dorsala (Schmid *et al.*, 2014).

2.3.3 Signální dráha JAK/STAT

Celým názvem Janus kinasa/signal transducers and activators of transcription (zkráceně JAK/STAT) (Harrison, 2012). Název kinasy Janus je spjat s římskou mytologií, konkrétně s římským bohem, který má dvě tváře, čímž se odkazuje na dvě kinasové domény – tandemové kinasy a pseudokinasy (Imada a Leonard, 2000). Dráha JAK/STAT je spuštěna cytokin-like molekulami v hemocytech. Genom včel v porovnání s genomem octomilek postrádá nepárový ligand Upd, který u octomilek aktivuje dráhu JAK/STAT. U včel byly nalezeny homology všech ostatních molekul octomilek, účastnících se této dráhy, včetně cytokinového receptoru domeless, díky nimž dráha JAK/STAT u včel zůstává funkční, ačkoliv je spuštěna neznámým ligandem (Evans *et al.*, 2006). Neznámý ligand se váže na příslušný cytokinový receptor, čímž dojde k aktivaci Janus kinas konstitutivně propojených s receptorem. Janus kinasy fosforylují tyrosin receptorů, čímž je vytvořeno vazebné místo pro STAT proteiny. Navázané STAT proteiny jsou fosforylovány Janus kinasami, následkem je tvorba dimerů a přesun těchto dimerů do jádra, kde formují genovou expresi (Imada a Leonard, 2000). Dráha JAK/STAT podporuje fagocytózu hemocyty, antivirovou obranu a zvýšení regulace proteinů obsahujících thiolester u octomilek (Evans *et al.*, 2006).

2.4 Přehled publikovaných metod detekce a kvantifikace antimikrobiálních peptidů

Výzkum imunitních mechanismů včel a jejich součástí včetně AmP může pomoci zlepšit odolnost a produktivitu včelstev. AmP jsou zkoumány i z důvodu jejich potenciálního nahrazení běžných antibiotik a antimykotických sloučenin. Většina výzkumů se věnuje změně v úrovni genové exprese AmP, přičemž je využívána metoda qPCR, která slouží ke kvantifikaci exprese genů AmP ve včelích tkáních nebo z celých těl včel (Daníhlík *et al.*, 2014).

Kwong *et al.* (2017) použili metodu qPCR ke zkoumání relativní genové exprese AmP indukovanou bakteriemi střevní mikroflóry. Klaudiny *et al.* (2005) se zabývali otázkou, zda-li jsou royalisin a defensin-1 kódovány stejným polymorfním genem, přičemž tuto hypotézu potvrdili. Nejprve zmnožili fragmenty komplementární DNA získané z hlav včelích kojiček starých 8 dnů pomocí metody qPCR. Transkripce těchto genů byla zkoumána pomocí PCR s reverzní transkripcí (dále jen RT-PCR). Park *et al.* (2014) analyzovali alely genů mellitinu ze dvou včelích druhů *A. mellifera*

a *Apis cerana* metodou qPCR z izolované DNA. Schlüns a Crozier (2007) zkoumali vztahy imunitních genů u dospělých jedinců pomocí RNAi. Genová exprese byla odhadnuta pomocí RT-PCR. Evans *et al.* (2006) zkoumali rozdíly v expresi AmP tak, že vpravili injekcí do těla včel imunitní stimuly (solný pufr, *E. coli* a *P. larvae*).

Mezi další cíle výzkumu kromě transkripčních studií patří analýzy bílkovin a peptidů obsažených ve včelí hemolymfě a mateří kašičce. K detekci a kvantifikaci AmP se využívají metody HPLC, sekvenování proteinů, SDS-PAGE a technika MS s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (dále jen MALDI-TOF) (Daníhlík *et al.*, 2014).

Peptidy se často oddělují pomocí metody HPLC na reverzní fázi (dále jen RP-HPLC). Problém s retencí peptidů nastává u peptidů bohatých na Arg (Foettinger *et al.*, 2006). Park *et al.* (2014) purifikovali melittinové peptidy RP-HPLC na >95% čistoty. Jejich účinnost byla následně testována proti *E. coli*.

Kwong *et al.* (2017) detekovali apidaecin *in vivo* RP-HPLC s tandemovou MS. Daníhlík *et al.* (2015) se věnovali vývoji vysoce citlivé metody kvantifikace apidaecinu 1 ve včelí hemolymfě nebo v různých částech těla. Optimalizovali metodu MS pro kvantifikaci apidaecinu. Apidaecin byl analyzován procesem založeným na separaci prostřednictvím kombinace extrakce na slabém katexu a reverzní fázi, nanokapalivé chromatografie propojené s MS s vysokým rozlišením.

Klaudiny *et al.* (2005) produkty PCR podrobili analýze elektroforézou na agarosovém gelu. Dále provedli analýzu gelu obsahujícího antibakteriální část, která byla detekována sledováním inhibice růstu *P. larvae*. Peptid byl následně z polyakrylamidového gelu izolován elektroelucí. Bachanová *et al.* (2002) popsali postup purifikace royalisinu z mateří kašičky, začínající kyselou extrakcí royalisinu a separací elektroforézou v nativním diskontinuálním polyakrylamidovém gelu. Gättschenberger *et al.* (2013) studovali imunitní obranu v různém životním stádiu včely odlišnými strategiemi včetně detekce indukovaných AmP metodou SDS-PAGE elektroforézy. Po dokončení elektroforézy byly gely přeneseny do fixačního roztoku s následným koloidním barvením Coomassie Brilliant Blue G250 (dále jen CBB G250).

AmP Casteels *et al.* (1989, 1990, 1993) určili primární strukturu AmP metodou Edmanova odbourávání. Edmanovo odbourávání je často používáno k indentifikaci peptidů po polyakrylamidové elektroforéze (Daníhlík *et al.*, 2014).

Baracchi *et al.* (2011) porovnávali dva peptidy mellitin a apamin, kteří jsou obsaženy ve včelím jedu a jejich vliv v sociální imunitě včel pomocí MALDI-TOF MS. MALDI-TOF je vhodná technika pro detekci peptidů v mozkové tkáni včel bez čištění (Boerjan *et al.*, 2010).

Lourenço *et al.* (2018) využili metodu Western blottingu při studiu regulační role genu dorsal na abaecin a defensin-1. Nejprve izolovali proteiny ze vzorku včelí hemolymfy, získané z břicha včelích kukel, vaječnicku a tukových tělísek matek. Vzorky proteinů byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou v 7,5 % polyakrylamidovém gelu a poté blotovány na polyvinylidendifluoridovou (dále jen PVDF) membránu. Následně použili dvě primární protilátky pro dorsal-1B a dorsal-1A pro srovnání jejich množství v tukovém tělísku a vaječnicích včelích matek.

Shen *et al.* (2014) stanovili koncentraci royalisinu v hemolymfě metodou ELISA, kdy byla měřena absorbance při 450 nm čtečkou destiček ELISA. Následně byl vyhodnocena celková koncentrace royalisinu pomocí kalibrační přímky.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid (AA; Acros Organics, USA)

5-Brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP; Sigma-Aldrich, USA)

n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Citronan sodný (Lachema, Česká republika)

Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250; Bio-Rad, USA)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (PENTA s.r.o, Česká republika)

Dodecylsírán sodný (SDS; Applichem, Německo)

Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycin (Sigma-Aldrich, USA)

Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Německo)

Hovězí sérový albumin pro blotování (BSA; ITW reagents, Španělsko)

Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid hořečnatý (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Koží anti-králičí sekundární protilátka IgG enzymaticky konjugovaná s alkalickou fosfátasou (Sigma-Aldrich, USA)

Koží anti-králičí sekundární protilátka IgG (H+L) konjugovaná s fluoresceinisothiokyanátem (dále jen FITC) (Bethyl Laboratories, USA)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

Močovina (Lach-Ner, Česká republika)

Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT; Sigma-Aldrich, USA)

N,N'-methylen-bisakrylamid (bAA; MP Biomedicals, Francie)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Německo)

Peroxodisíran amonný (APS; Sigma-Aldrich, Japonsko)

Polyklonální králičí primární protilátky (Moravian Biotechnology, Česká republika)

Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)

SDS-PAGE marker – S8445 SigmaMarker wide range (standard obsahuje: aprotinin z hovězích plic (6500 Da), α -laktalbumin z kravského mléka (14200 Da), inhibitor trypsinu ze sóji (20000 Da), trypsinogen z hovězího pankreatu (24000 Da), karbonická anhydrasa z hovězích erytrocytů (29000 Da), glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa z králičího svalu (36000 Da), ovalbumin ze slepičího vejce (45000 Da), glutamátdehydrogenasa z hovězích jater (55 000 Da), albumin z hovězího séra (66000 Da), fosforylase B z králičího svalu (97000 Da), β -galaktosidasa z *E.coli* (116000 Da) a myosin z prasečího srdce (200000 Da)) (Sigma-Aldrich, USA)

Síran hlinitý (Lach-Ner, Česká republika)

Tetramethylethylendiamin (TEMED; Carl Roth, Německo)

Tricin (Sigma-Aldrich, USA)

Tricinový vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)

Tris (MP Biomedicals, Francie)

Tween 20 (Carl Roth, Německo)

3.1.2 Biologický materiál

Pro stanovení celkové koncentrace proteinů metodou dle Bradforda a SDS-PAGE elektroforézu byl použit vzorek hemolymfy, dodané školitelem. Hemolymfa byla po odstrižení zadečku odebrána z hrudníku dospělých dělnic, získaných z pokusného včelína Výzkumného ústavu včelařského na Kývalce v září 2019. Odebraná hemolymfa byla uschována v mrazícím boxu.

Včelí střeva, která byla použita pro imunohistochemii, byla vypreparována z mladušek, odebraných na včelnici školitele v květnu 2021.

3.1.3 Instrumentace a pomůcky

Analytická váha Denver Instrument SI-114 (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr XS pH 50+ DHS (Chromservis, Česká republika)

Dry Bath Incubator (Major Science, USA)

Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Magnetická míchačka Big Squid IKAMAG (IKA, Německo)

Mikroskop Olympus BX50 (Olympus, Japonsko)

Power Wave XS (Biotek, USA)

PVDF membrána (Bio-Rad, USA)

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)

Třepačka 3D Blot Mixer (Clever Scientific ltd, Velká Británie)

Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)

Zdroj napětí PowerPac HC (Bio-Rad, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda

3.2.1.1 Zásobní roztoky pro Bradfordovu metodu

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue:

Bylo rozpuštěno 50 mg CBB G250 ve 25 ml ethanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Výsledný objem byl doplněn dH₂O na 100 ml.

Pracovní roztok Bradfordova činidla:

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue byl zředěn dH₂O v poměru 1:4. Bradfordovo činidlo se vždy připravuje čerstvě před vlastním měřením.

Standardy BSA:

Byl připraven zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg·ml⁻¹, rozpuštěním 100 mg BSA v 50 ml dH₂O. Byla připravena kalibrační řada BSA o různých koncentracích: 1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 5 a 1 μg·ml⁻¹ (Tab. 1).

Tab. 1 Objemy zásobního roztoku BSA a dH₂O pro přípravu standardů BSA pro sestavení kalibrační přímky.

Koncentrace BSA [μg·ml ⁻¹]	Objem roztoku BSA o koncentraci 2 mg·ml ⁻¹ [μl]	Objem roztoku BSA o koncentraci 100 μg·ml ⁻¹ [μl]	Objem dH ₂ O [μl]
1000	500	-	500
750	375	-	625
500	250	-	750
250	125	-	875
100	100	-	900
75	-	750	250
50	-	500	500
25	-	250	750
10	-	100	900
5	-	50	950
1	-	10	990

3.2.1.2 Vlastní postup měření

Do jednotlivých jamek na mikrodestičce byly odděleně pipetovány: blank, standardy BSA o jednotlivých koncentracích od $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poté vzorky hemolymfy, která byla zředěna 10x a 20x, vše ve třech opakováních. Do každé jamky bylo tedy postupně pipetováno 45 μl dH₂O, 5 μl standardu BSA o dané koncentraci nebo 5 μl vzorku zředěné hemolymfy a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Do jamek pro blank bylo pipetováno 50 μl dH₂O a 200 μl roztoku Bradfordova činidla. Obsah jamek byl promíchán opatrným protřepáním. Před měřením se ponechalo zbarvení vyvíjet minimálně 5 min. Absorbance byla měřena na mikrodestičkovém readru Power Wave XS při 590 nm a 450 nm. Byla sestavena kalibrační přímka závislosti poměru absorbancí 590/450 nm na koncentraci standardů BSA.

Vzorek hemolymfy zředěné 20x byl připraven rozpuštěním 10 μl hemolymfy ve 190 μl dH₂O, vzorek hemolymfy zředěné 10x rozpuštěním 10 μl hemolymfy v 90 μl dH₂O.

3.2.2 SDS-PAGE elektroforéza

3.2.2.1 Příprava roztoků

AB-6 Separací gel monomer (49,5%T, 6%C):

Pro přípravu separačního gelu AB-6 bylo naváženo 93,0 g AA a 6,0 g bAA. Navážky byly rozpuštěny v 200 ml dH₂O. Roztok byl uschován v lednici při 4 °C.

AB-3 Zaostřovací gel monomer (49,5%T, 3%C):

Pro přípravu zaostřovacího gelu AB-3 bylo naváženo 96,0 g AA a 3,0 g bAA. Navážky byly rozpuštěny v 200 ml dH₂O. Roztok byl uschován v lednici při 4 °C.

Anodový pufr (0,1 mol·l⁻¹ Tris, pH 8,9), 10x:

Pro přípravu anodového pufru bylo naváženo 60,57 g Tris a navážka byla rozpuštěna v 200 ml dH₂O. pH pufru bylo upraveno pomocí 1 mol·l⁻¹ HCl na výslednou hodnotu 8,9. Objem pufru byl doplněn na 500 ml. Pufr byl uschován v lednici při 4 °C. Pufr byl před použitím 10x zředěn.

Katodový pufr (0,1 mol·l⁻¹ Tris, 0,1 mol·l⁻¹ Tricine, 0,1% SDS, pH 8,25), 10x:

Pro přípravu katodového pufru bylo naváženo 60,55 g Tris, 89,6 g Tricinu a 5 g SDS. Navážky byly rozpuštěny v 500 ml dH₂O. Pufr byl uschován v lednici při 4 °C a před jeho použitím byl zředěn 10x.

Gelový pufr (3,0 mol·l⁻¹ Tris, 0,3% SDS, pH 8,45), 3x:

Pro přípravu gelového pufru bylo naváženo 181,65 g Tris a 1,5 g SDS. Navážky byly rozpuštěny v 300 ml dH₂O. pH bylo upraveno na hodnotu 8,45 pomocí koncentrované HCl a objem roztoku byl poté doplněn na 500 ml dH₂O. Pufr byl uchován v lednici při 4 °C. Pufr byl před použitím 3x zředěn.

10% Roztok APS:

Pro přípravu 10% roztoku APS byla rozpuštěna navážka 50 mg APS v 500 µl dH₂O. Roztok byl připraven těsně před jeho použitím.

Barvicí roztok koloidní CBB-G250 (0,02% CBB-G250, 5% síran hlinitý, 10% methanol, 8% kyselina fosforečná)

Odbarvovací roztok (10% methanol, 2% kyselina fosforečná)

3.2.2.2 Příprava gelů

Malá i velká sklička byla odmaštěna 96% ethanolem. Byla sestavena aparatura pro nalévání gelu, připevněním sklíček do nalévacího stojánku. Byl připraven 10% roztok APS. Byly připraveny roztoky pro 4% zaostřovací gel, 16% dělicí gel bez přídavku močoviny a 16% dělicí gel s přídavkem močoviny (Tab. 2) za stálého míchání na elektromagnetické míchačce. Po přidání roztoku APS do roztoků pro přípravu gelů bylo postupováno rychle, jelikož APS zahajuje polymeraci gelu. Po smíchání APS s roztokem pro dělicí gel, byl důkladně promíchaný výsledný roztok přenesen pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi malé a velké skličko přibližně do jejich poloviny. Gel byl převrstven pomocí několika kapek n-butanolu. Po ztuhnutí gelu (cca 30 min) byl odstraněn n-butanol, gel byl promyt vodou a zbytky vody byly poté opatrně odsáty filtračním papírem. K roztoku pro zaostřovací gel byl přidán roztok APS a výsledný roztok byl přenesen pomocí Pasteurovy pipety na ztuhlý dělicí gel do prostoru mezi skla až po jejich okraj. Hřebínek byl opatrně zasunut od jednoho kraje k druhému do zaostřovacího gelu, který se ponechal i s hřebínkem ztuhnout.

Příprava vzorku: 95 µl tricínového vzorkovacího pufru bylo smícháno v mikrozkuhavce s 5 µl β-merkptoethanolu. Ke 100 µl připraveného vzorkovacího pufru s β-merkptoethanolem bylo přidáno 100 µl včelí hemolymfy. Mikrozkuhavka byla inkubována po dobu 10 min při 95 °C ve vyhřívaném stojánku. Poté byla mikrozkuhavka vložena do kádinky s ledem. Před nanesením na gel byl vzorek centrifugován 16000 g po dobu 10 min při laboratorní teplotě centrifugou 5418 R.

Tab. 2 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou pro 2 gely.

Typ gelu	AB-6 [ml]	AB-3 [ml]	Gelový pufr 3x [ml]	Glycerol [g]	dH ₂ O [ml]	TEMED [μl]	APS [μl]	Močovina [g]
16% dělicí	5	-	5	1,5	5	5	50	-
16% dělicí s močovinou	5	-	5	1,5	5	5	50	5,4
4% zaostřovací	-	0,5	1,5	-	4	4,5	45	-

3.2.2.3 Průběh elektroforézy

Skla byla po ztuhnutí gelů uvolněna ze stojánku a pomocí fixy byla na sklíčka vyznačena dna jamek pro usnadnění pipetování vzorků. Hřebínek byl opatrně vyjmut tak, aby nedošlo k porušení jamek. Jamky byly poté promyty dH₂O pomocí stříčky. Vše bylo provedeno rychle, ale se zvýšenou opatrností, aby nedošlo ke zborcení jamek. Byla sestavena elektroforetická komora tak, že malá sklíčka směřovala dovnitř komory a velká sklíčka směrem ven. Do vzniklého prostoru mezi malými skly byl nalit katodový pufr mírně nad úroveň vrcholu jamek, do prostoru za vnějšími skly byl nalit anodový pufr nad úroveň spodního konce gelu. V průběhu elektroforézy byla hladina pufrů kontrolována, případně doplněna. Do boční jamky byly pipetovány 2 μl standardu molekulové hmotnosti, do dalších jamek bylo pipetováno střídavě 5 a 10 μl připraveného vzorku. Elektroforetická komora byla uzavřena víkem, umístěna do lednice a připojena ke zdroji napětí. Na začátku elektroforézy bylo napětí nastaveno na 50 V. Po zaostření vzorků v zaostřovacím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V. Zdroj byl vypnut přibližně po 2 h od začátku elektroforézy. Po vypnutí zdroje byla elektroforetická komora otevřena a pufrы vylity do odpadu. Malé sklo bylo opatrně odejmuto a zaostřovací gel byl opatrně přenesen do speciální nádoby na gely. Dělicí gely byly omyty dH₂O.

3.2.3 Detekce celkových proteinů Coomassie Brilliant Blue

Dělicí gel byl umístěn do fixačního roztoku po dobu 30 min. Poté byl přesunut do roztoku koloidního barviva CBB G-250. Po 1,5 h byly gely 3x propláchnuty odbarvovacím roztokem. Gel byl zdokumentován pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager na destičce White Tray.

3.2.4 Western blotting

3.2.4.1 Příprava roztoků

Blotovací pufr, pH 8,3:

Bylo naváženo 4,54 g Tris a 21,62 g glycinu. Navážky byly rozpuštěny v 350 ml dH₂O s 300 ml methanolu. Hodnota pH byla zkontrolována a objem byl doplněn na 1,5 l dH₂O.

TBS pufr 5x, pH 7,5:

Pro přípravu TBS pufru bylo naváženo 24,2 g Tris a 292,2 g NaCl. Navážky byly rozpuštěny v 1,5 l dH₂O. Hodnota pH pufru byla upravena na 7,5 a objem byl doplněn na 2 l dH₂O. Pufr byl uschován při 4 °C. Zásobní pufr byl před jeho použitím zředěn 5x.

TBS-T (0,1% Tween) pufr:

K již připravenému zředěnému 1x TBS pufru byl přidán Tween 20 (0,1 ml Tween na 100 ml TBS pufru). Pufr byl uchován při 4 °C.

Pufr pro alkalickou fosfatasy (dále jen AP):

Bylo naváženo 12,11 g Tris (0,1 mol·l⁻¹), 1,02 g MgCl₂ (50 mmol·l⁻¹) a 5,84 g NaCl (0,1 mol·l⁻¹). Navážky byly rozpuštěny v 900 ml dH₂O a hodnota pH byla upravena na 9,5. Pufr byl doplněn na objem 1 l. Pufr byl uschován při 4 °C.

Roztoky NBT a BCIP:

Roztok NBT byl připraven rozpuštěním 50 mg NBT v 1 ml 70% dimethylformamidu. Pro přípravu roztoku BCIP bylo naváženo 50 mg BCIP a navážka byla rozpuštěna v 1 ml 100% dimethylformamidu. Roztoky byly uschovány při -30 °C.

3.2.4.2 Semi-dry blotting

PVDF membrána s póry o velikosti 0,2 μm byla před použitím namočená na 5 min do methanolu. Gel, 2 silné filtrační papíry a PVDF membrána byly inkubovány v blotovacím pufru po dobu 10-20 min. Jednotlivé komponenty byly sestaveny do tzv. sendviče v pořadí odspodu filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír. Případné bubliny byly odstraněny válečkem nebo posunutím komponentů. Komponenty byly poté vloženy do elektroforetické transferové komory přístroje Trans-Blot Semi Dry. Proud byl nastaven podle rozměrů (50 cm² x 0,8) na 40 mA.

3.2.5 Detekce proteinů na blotovací membráně barvením Ponceau S

PVDF membrána byla vložena na 10 min do roztoku Ponceau S za stálého míchání pomocí třepačky. Po inkubaci byla membrána promyta přidáváním dH₂O.

3.2.6 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů

Po skončení blotování byla membrána rozdělena na 3 kusy. Každý kus membrány obsahoval část s 5 μ l a 10 μ l vzorku. Kusy membrány byly využity zvláště k detekci defensinu-1, hymenoptaecinu a abaecinu. Kusy membrány byly rozděleny do krabiček obsahující BSA v 1x TBS. Pro defensin-1 a hymenoptaecin byl 1 g BSA rozpuštěn v 20 ml 1x TBS (5% BSA), pro abaecin bylo rozpuštěno 0,2 g BSA v 20 ml 1x TBS (1% BSA). Krabičky s oddělenými membránami v roztoku BSA s 1x TBS byly ponechány po dobu 2 h v lednici na třepačce. Poté byly membrány promyty v 1x TBS-T třikrát 10 min za míchání na třepačce (pro defensin-1 a hymenoptaecin 0,1 % Tween, pro abaecin 0,05 % Tween). Membrány byly inkubovány po dobu 2 h v lednici na třepačce v roztoku polyklonální králičí primární protilátky. Pro defensin-1 byl roztok připraven smícháním 5 μ l primární protilátky pro defensin-1 v 10 ml TBS-T, pro hymenoptaecin bylo smícháno 10 μ l primární protilátky pro hymenoptaecin v 10 ml TBS-T a pro abaecin 20 μ l primární protilátky pro abaecin v 10 ml TBS-T. Membrány byly poté promyty třikrát 10 min v 1x TBS-T na třepačce. Membrány byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě na třepačce v roztoku kozí anti-králičí sekundární protilátce enzymaticky konjugovaná s AP. Pro defensin-1 a hymenoptaecin byly roztoky připraveny smícháním 14 μ l sekundární protilátky v 20 ml TBS-T, pro abaecin bylo smícháno 5 μ l sekundární protilátky v 10 ml TBS-T. Po inkubaci byly membrány promyty třikrát 10 min v roztoku TBS-T.

Následně bylo provedeno barvení membrány. Před použitím byl připraven roztok smícháním 10 ml pufru pro AP, 33 μ l NBT a 33 μ l BCIP. Membrány byly ponořeny do připraveného barvicího roztoku na třepačce. Po vzniku viditelných fialových proužků byla membrána opláchnuta dH₂O. Membrána byla zdokumentována pomocí systému Bio-Rad Gel Doc EZ Imager, případné vzduchové bubliny byly odstraněny.

3.2.7 Imunohistochemická detekce antimikrobiálních peptidů ve střevě včely

3.2.7.1 Příprava roztoků

Fosfátový pufr PBS, pH 7,4:

Na přípravu 200 ml PBS bylo naváženo 0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,14 g Na₂HPO₄ a 0,05 g KH₂PO₄. Navážky byly rozpuštěny v 200 ml dH₂O a po rozpuštění bylo pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 7,4.

Roztok PBS-T (0,05% Tween 20):

Do 200 ml PBS bylo přidáno 100 µl Tween 20. Roztok byl promíchán na elektromagnetické míchačce.

Citrátový pufr, pH 6,0 (0,05% Tween 20):

Bylo naváženo 0,25 g citronanu sodného a rozpuštěno ve 100 ml dH₂O. Do výsledného roztoku bylo pipetováno 50 µl Tween 20.

Blokovací pufr (1% BSA, 0,05% Tween 20):

Byl navážen 1 g BSA. Navážka byla rozpuštěna ve 100 ml PBS-T (0,05% Tween 20).

3.2.7.2 Vlastní postup detekce

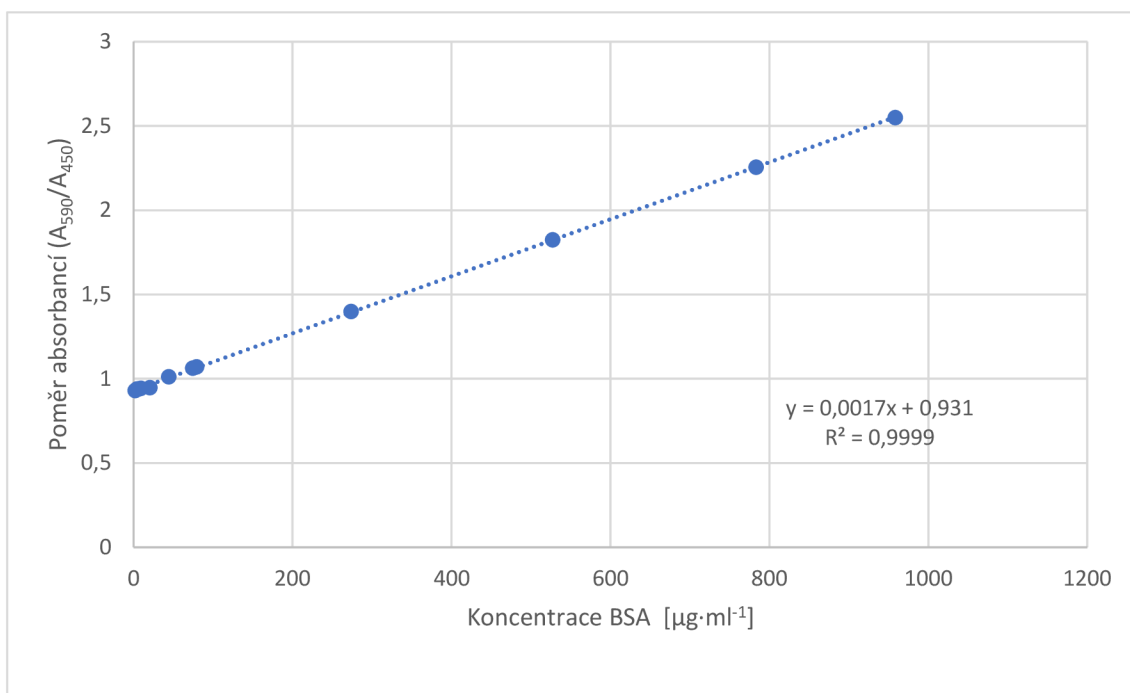
Včely byly uspány pomocí oxidu uhličitého. Včela byla rozdělena v části spojení hrudi a zadečku. Ze zadečku byla vypitvána včelí střeva. Včelí střeva byla zafixována po dobu 1-3 h ve 4% paraformaldehydu v mikrozkuhavce. Střeva byla poté 3x promyta PBS-T po dobu 10 min za stálého míchání. PBS-T bylo opatrně odstraněno a nahrazeno 1 ml citrátového pufru. Mikrozkuhavka byla zahřívána na 95 °C po dobu 1 h v topném bloku. Citrátový pufr byl odstraněn a vzorek střev byl 3x promyt PBS-T po dobu 5 min. PBS-T bylo odstraněno a ke vzorku střev byl přidán blokovací pufr. Vzorek byl blokován po dobu 1 h při laboratorní teplotě, čímž bylo zabráněno nespecifické vazbě protilátky. Tímto způsobem byly připraveny 3 vzorky střev – kontrolní vzorek, vzorek pro detekci defensinu-1 a vzorek pro detekci abaecinu. Po odstranění blokovacího pufru byla přidána specifická primární protilátka pro defensin-1 nebo abaecin ředěná v poměru 1:400 v blokovacím pufru, kontrolní vzorek byl ponechán pouze v blokovacím pufru. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 h za stálého míchání. Po inkubaci byly vzorky promyty PBS-T po dobu 5 min čtyřikrát. Po posledním promytí bylo PBS-T nahrazeno blokovacím pufrem a vzorek byl inkubován po dobu 30 min. Blokovací pufr byl odstraněn a ke vzorku bylo pipetováno 100 µl sekundární protilátky (kozí anti-králičí IgG konjugované

s fluorescenční značkou FITC) ředěné v poměru 1:500 v blokovacím pufru. Vzorky včelích střev byly inkubovány s roztokem sekundární protilátky 1 h při laboratorní teplotě.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda

Byla měřena absorbance 11 roztoků BSA o známé koncentraci společně se vzorky proteinů o neznámé koncentraci, které byly zředěné 10x a 20x. Standardy BSA i vzorky byly měřené v triplikátech vůči blanku. Absorbance byla měřená na mikrodestičkovém readru při 590 nm a 450 nm, z těchto absorbancí byl poté vypočítán poměr. Do grafu (Obr. 6) byl vynesena poměr absorbancí v závislosti na koncentraci standardů BSA a byla určena rovnice kalibrační přímky, z které byla poté vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku (Tab. 3). Rovnice kalibrační přímky byla $y = 0,0017x + 0,931$ se spolehlivostí $R^2 = 0,9999$.



Obr. 6 Graf závislosti poměru absorbancí A_{590}/A_{450} na koncentraci vzorku BSA.

Tab. 3 Stanovení koncentrace celkových proteinů ve vzorcích hemolymfy metodou dle Bradforda.

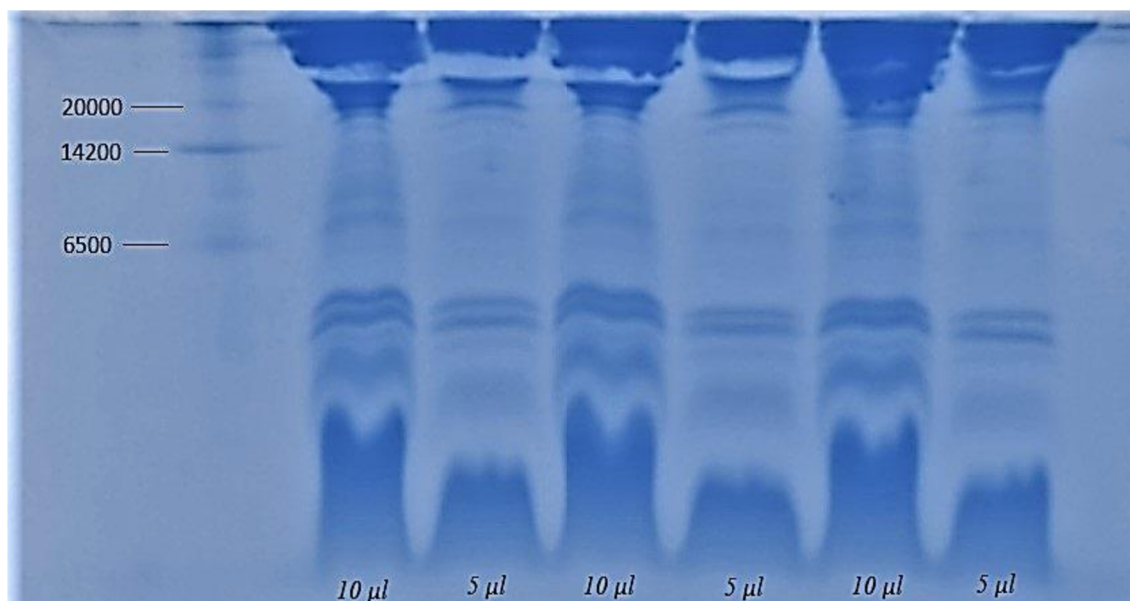
	Průměr poměrů A_{590}/A_{450} se směrodatnou odchylkou	Koncentrace proteinů v zředěném vzorku [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace proteinů v nezředěném vzorku [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
Vzorek ředěný 20x	1,46±0,04	310	6200
Vzorek ředěný 10x	2,06±0,07	665	6650

Podle Zor a Selinger (1996) citlivost a přesnost stanovení proteinů běžně využívanou metodou dle Bradforda při 590 nm může být narušena vnitřní nelinearitou. Bylo prokázáno, že použitím poměru absorbance měřené při 590 nm a 450 nm se zvyšuje linearita závislosti signálu na koncentraci proteinu a citlivost i přesnost metody se přibližně zdesetinásobí.

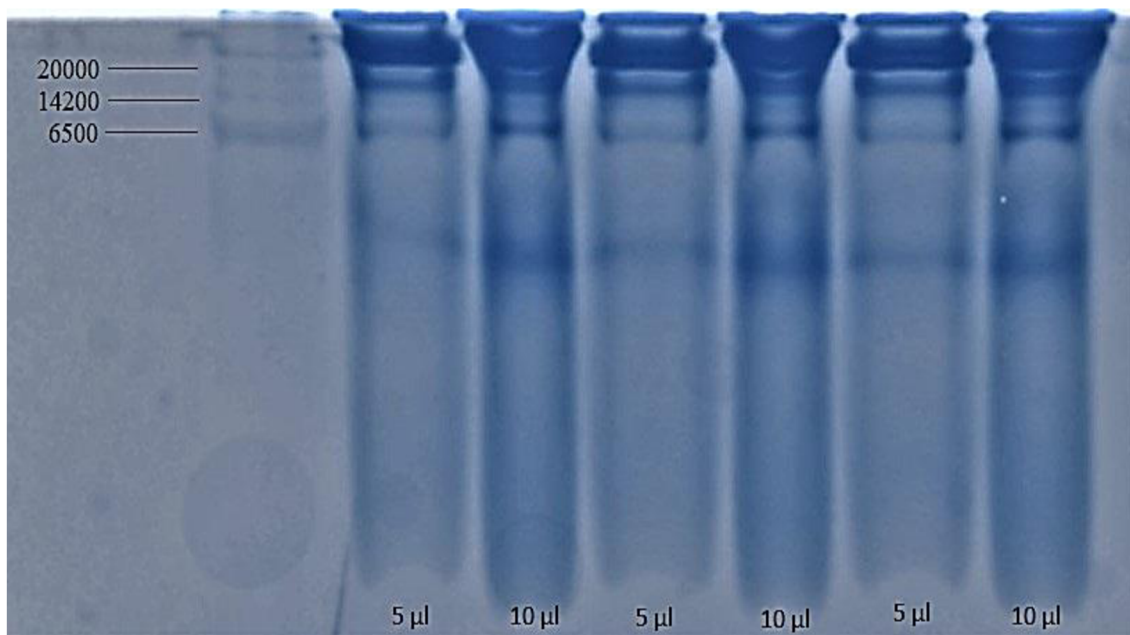
4.2 Detekce celkových proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Celkové proteiny v gelech bez a s přidavkem močoviny byly po proběhnutí tricínové SDS-PAGE elektroforézy detekovány metodou koloidního barvení CBB G250. Předpokládá se, že vhodnější gel pro separaci malých peptidů je gel s přidavkem močoviny, jelikož pohyb proteinů a peptidů v gelu se zpomaluje. Provedená elektroforéza byla v obou případech provedena příliš krátkou dobu nebo při příliš malém napětí, jelikož band markeru s nejnižší molekulovou hmotností (6500 Da) nestihl doputovat v elektrickém poli ke konci gelu a těžší molekuly proteinů zůstaly nerozděleny v horní části gelu. Nebylo možné určit přesnou pozici bandů detekovaných proteinů a peptidů. U gelu bez přidavku močoviny i s přidavkem močoviny byly pozorovány tři bandy markerů molekulové hmotnosti, a to aprotinin (6500 Da), α -laktalbumin (14200 Da) a inhibitor trypsinu ze sóji (20000 Da). Zbylé proteiny markeru nestihly doputovat níže a zůstaly v horní části gelu, proto nelze určit jejich polohu. AmP se nacházejí ve spodní části gelu za bandem aprotininu, jelikož mají nižší molekulovou hmotnost než aprotinin, který je vyznačen (Obr. 7 a Obr. 8). Elektroforetický pohyb bandů v gelu s močovinou je zpomalený oproti bandům gelu bez močoviny, což potvrzuje hypotézu, že gel s močovinou je vhodnější pro malé peptidy, jelikož gel jejich pohyb zpomaluje a jsou lépe detekovatelné.

Schägger a Von Jagow (1987) uvádějí že, SDS-PAGE za použití tricinu v elektrodových pufrech umožňuje separaci malých proteinů při nižších koncentracích AA než v systémech glycin-SDS-PAGE i bez využití močoviny, která může způsobit problémy v případě následujících sekvenování AMK. Dále podle Gätchenberger *et al.* (2013) byla provedena fixace gelu fixačním roztokem, barvení koloidním barvivem CBB G250 a následně bylo provedeno odbarvení roztokem obsahující metanol.



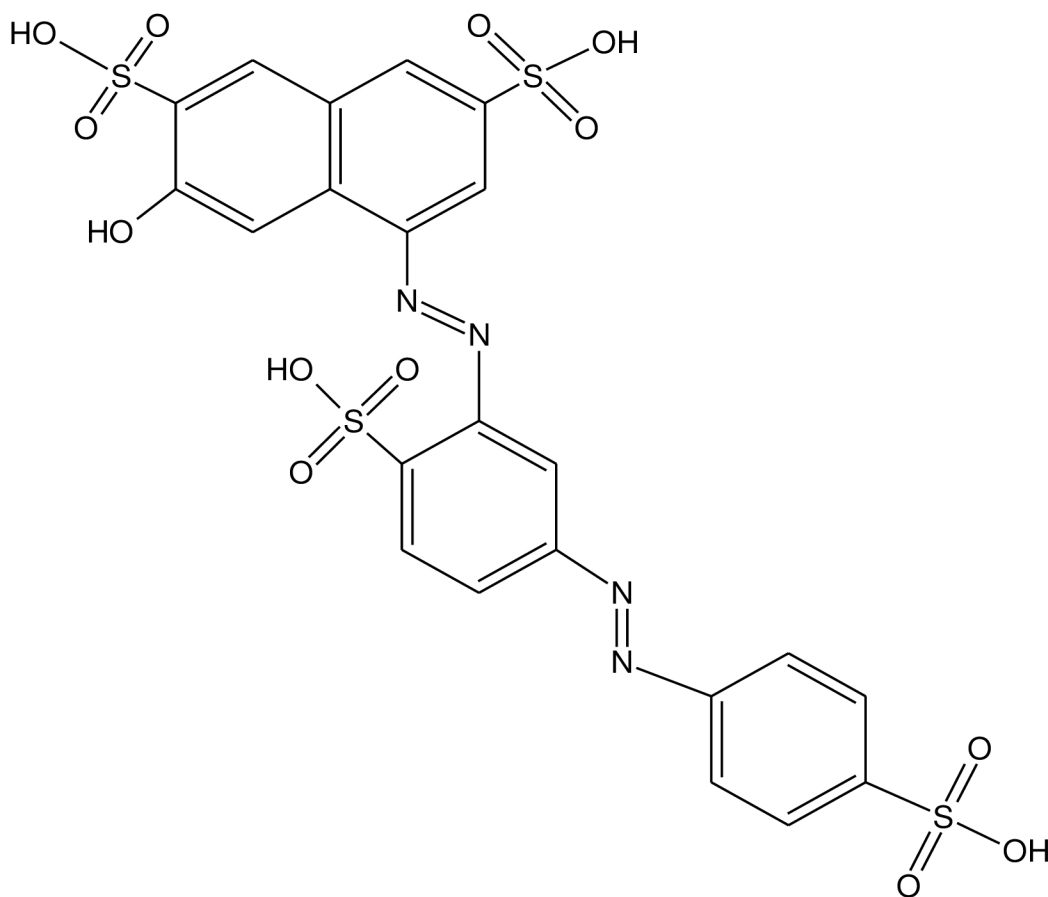
Obr. 7 Detekce proteinů v SDS-PAGE gelu bez přídavku močoviny, po barvení koloidní barvivem CBB G250. Vpravo – bandy markeru molekulové hmotnosti odspodu aprotinin z hovězích plic (6500 Da), α -laktalbumin z kravského mléka (14200 Da), inhibitor trypsinu ze sóji (20000).



Obr. 8 Detekce proteinů v SDS-PAGE gelu s přidavkem močoviny, po barvení koloidní barvivem CBB G250. Vpravo – bandy markeru molekulové hmotnosti odspodu aprotinin z hovězích plic (6500 Da), α -laktalbumin z kravského mléka (14200 Da), inhibitor trypsinu ze sóji (20000).

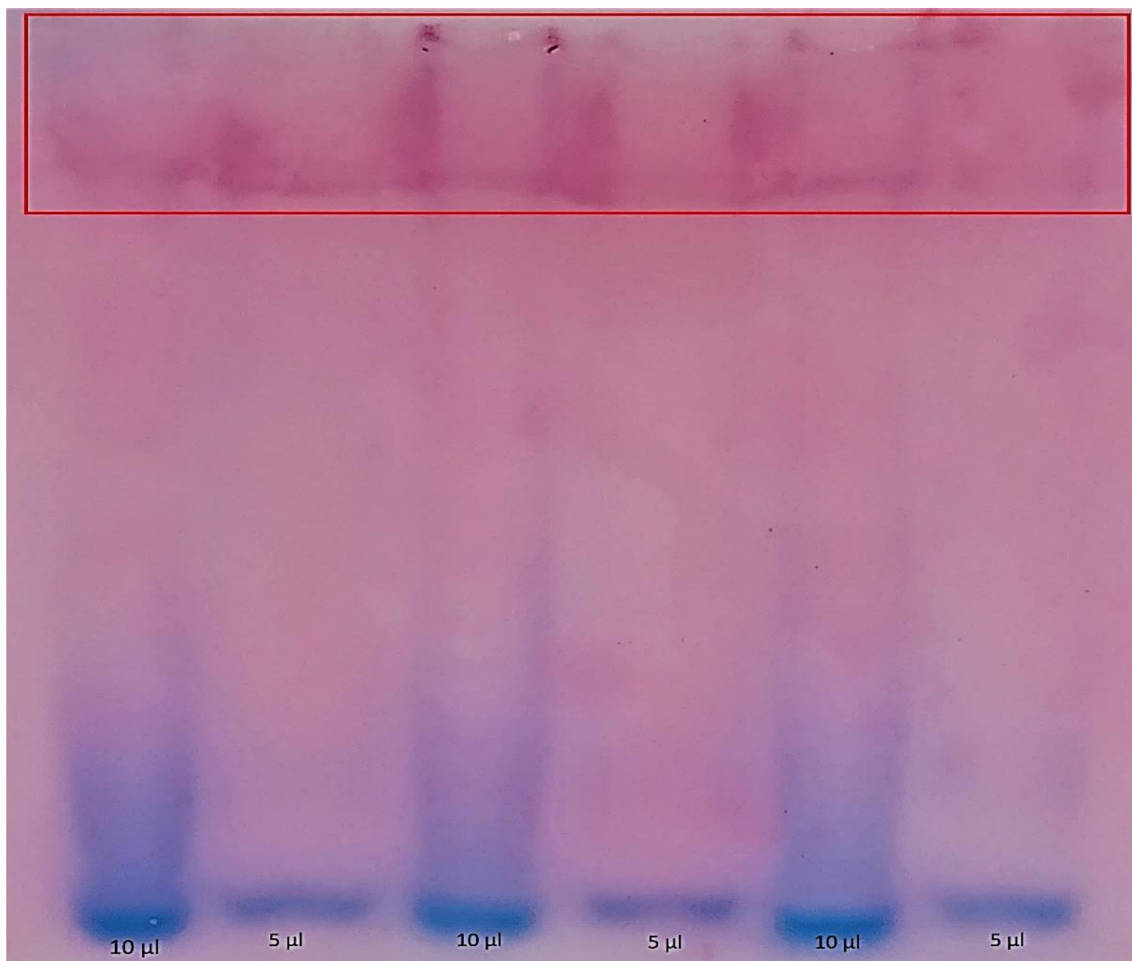
4.3 Detekce proteinů na blotovací membráně barvením Ponceau S

K účinnému určení relativního množství detekovaného proteinu po provedení Western blottingu je nezbytná normalizace. Jednou z mnoha metod normalizace je barvení membrány reverzibilním barvivem Ponceau S. Ponceau S (Obr. 9), nebo-li sodná sůl kyseliny 3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfofenylazo]fenylazo)-2,7-naftalendisulfonové, lze využít po gelové elektroforéze a následném přenosu na membránu k detekci přenesených proteinů jejich červeno-růžovým obarvením. Principem metody je navázání záporně nabitě složky barviva na pozitivně nabitě AMK proteinů. Používá se pouze na neutrální membrány, jako jsou nitrocelulosové a PVDF membrány, aby zůstalo zachované čisté pozadí. Barvivo se pak snadno odstraní z membrány dH₂O nebo TBS pufrem (Sander *et al.*, 2019).

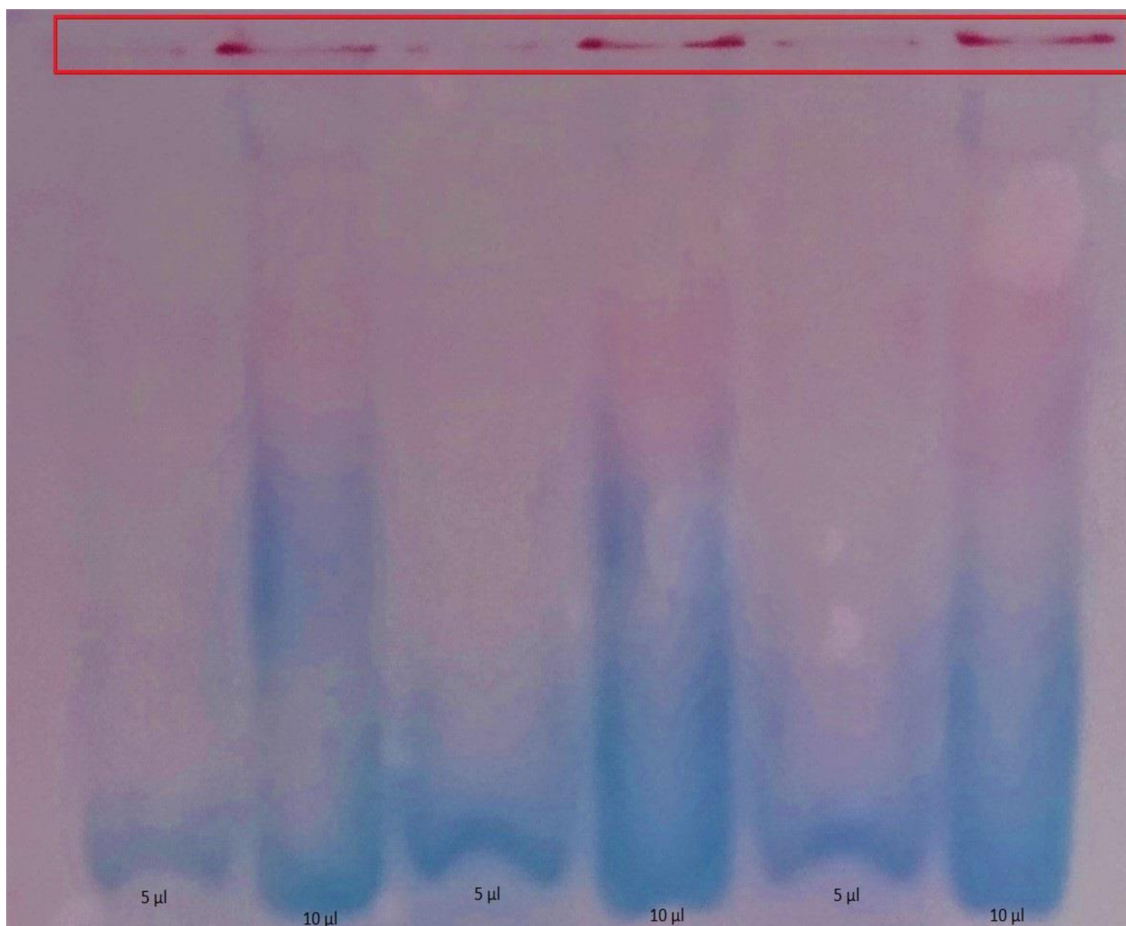


Obr. 9 Strukturí vzorec Ponceau S.

Bylo provedeno barvení PVDF membrán, po jejich blottingu z gelu bez močoviny a z gelu s přídavkem močoviny. Lze vidět červenorůžově obarvené pásy proteinů (Obr. 10 a Obr. 11) v červeně vyznačené oblasti. Obarvením pásů bylo prokázáno, že blotting byl proveden úspěšně a proteiny z gelů byly přeneseny na membránu.



Obr. 10 Detekce proteinů na PVDF membráně po blottingu barvením Ponceau S. Červeně jsou vyznačené obarvené proteinové pásy. Blotting byl proveden z gelu bez přídavku močoviny (Obr. 7).



Obr. 11 Detekce proteinů na PVDF membráně po blottingu barvením Ponceau S. Červeně jsou vyznačené obarvené proteinové pásy. Blotting byl proveden z gelu s přidavkem močoviny (Obr. 8).

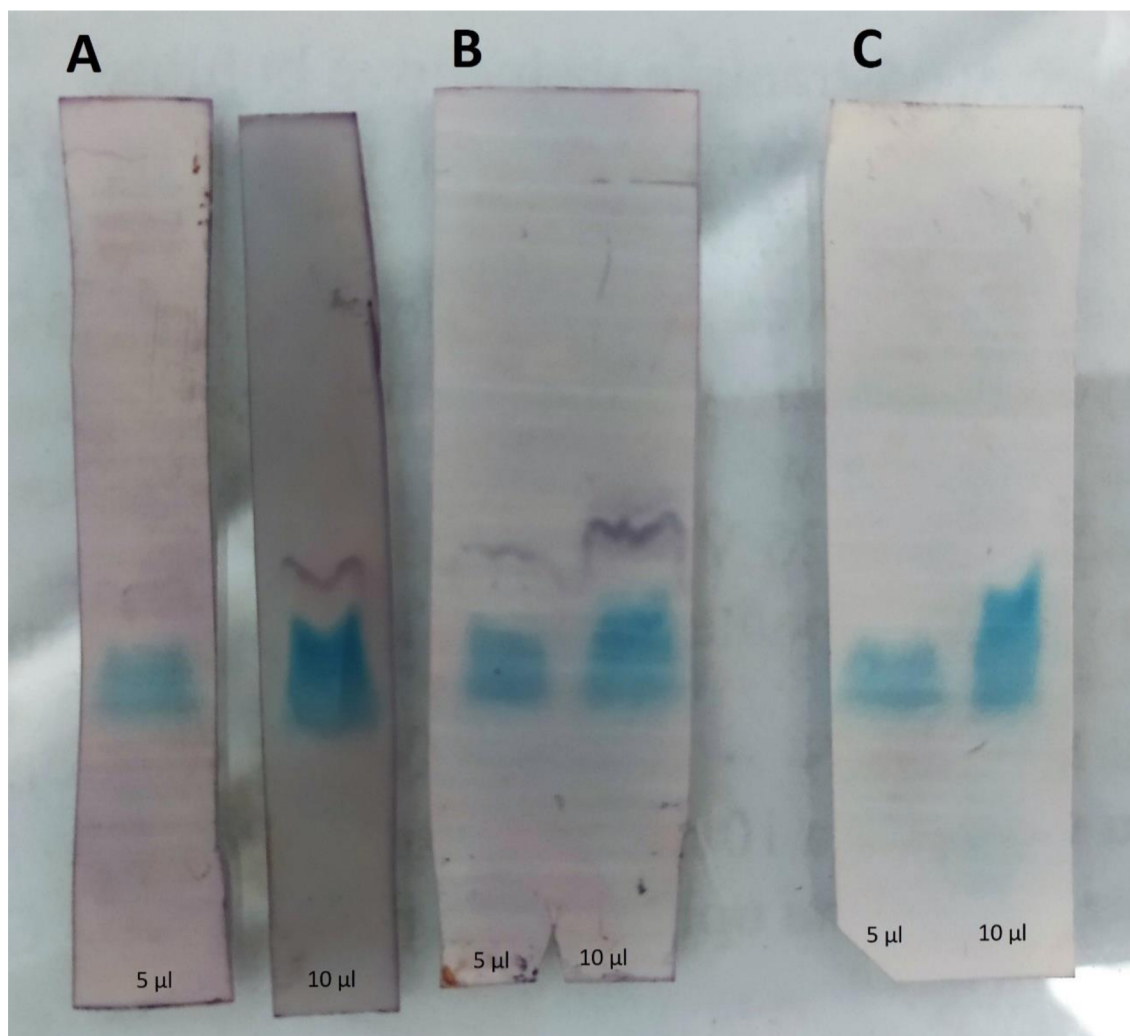
4.4 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů

Byl proveden Western blotting, sloužící k přenosu proteinů a peptidů pomocí elektrického pole na PVDF membránu s následnou imunochemickou detekcí AmP pomocí specifických primárních protilátek – konkrétně pro abaecin, defensin-1 nebo hymenoptaecin. Po navázání sekundární protilátky značené AP (EC 3.1.3.1) byly peptidy na PVDF membránách detekovány roztokem, který obsahoval substráty AP, NBT a BCIP.

Na obou membránách byly detekované defensin-1 a abaecin (Obr.12 a Obr.13). Hymenoptaecin nebyl na membránách detekován, tudíž nebyl v hemolymfě přítomen, nebo byl přítomen v množství nižším, než je limit detekce použité imunochemické metody. Dle literatury abaecin reaguje antimikrobiálními účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie, zatímco defensin je účinný především proti grampozitivním bakteriím (Casteels *et al.*, 1990; Casteels-Josson *et al.*, 1994). Jejich přítomnost v hemolymfě poukazuje na přítomnost patogenní infekce, která mohla být způsobena jak grampozitivními, tak gramnegativními bakteriemi. Jelikož však nebyl detekován hymenoptaecin, který je účinný vůči gramnegativním bakteriím a širší pásy detekce měl defensin-1 (Obr. 12A), což mohlo značit jeho vyšší koncentraci, předpokládá se, že patogenní infekce mohla být způsobena grampozitivními bakteriemi.

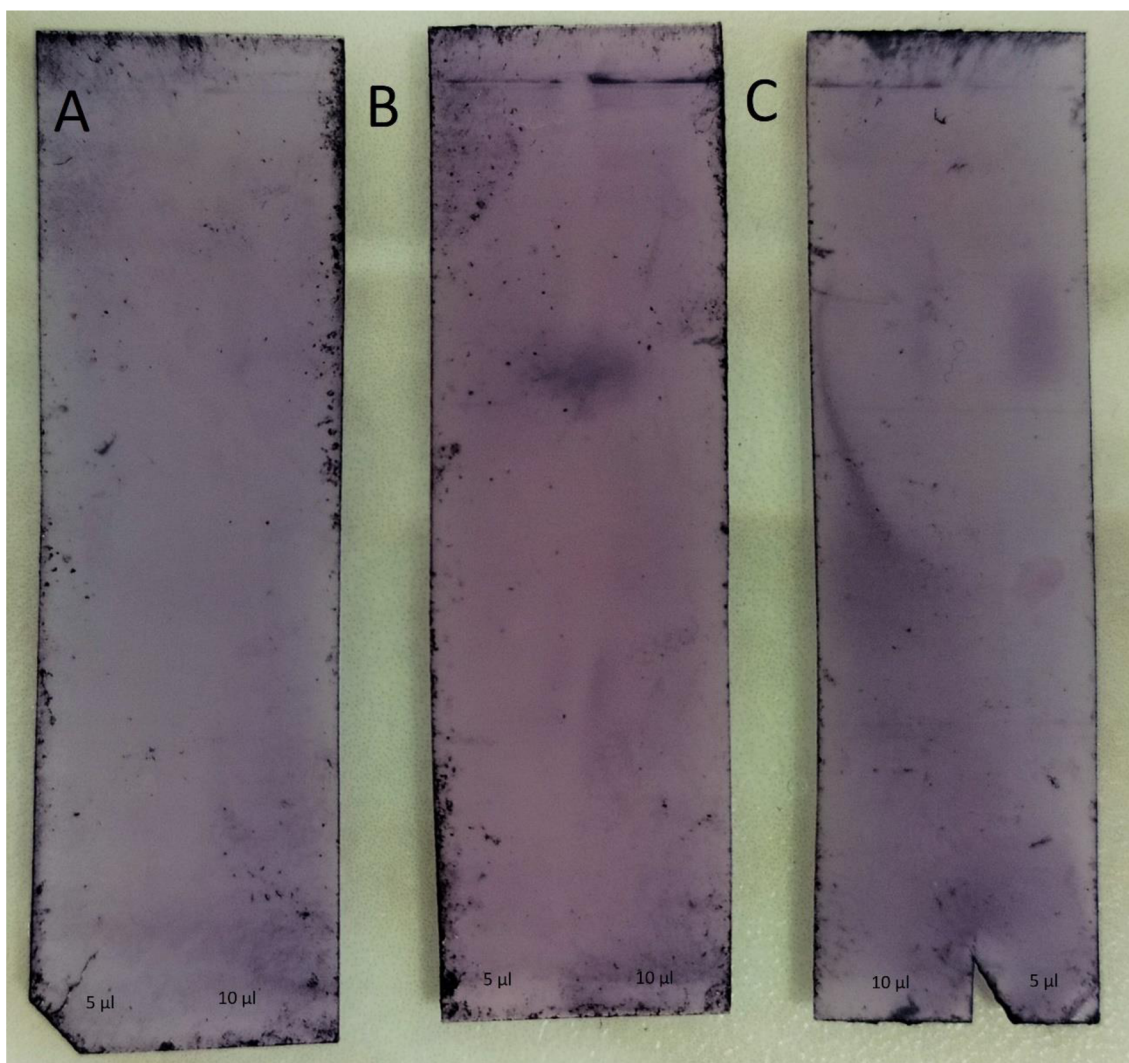
Lépe viditelná detekce AmP byla u membrány, kde proběhl přenos proteinů z gelu bez přídavku močoviny (Obr. 12). Pásy na membráně po blottingu proteinů z gelu s přídavkem močoviny, byly hůře viditelné, jelikož peptidy nestihly doputovat stejně daleko jako u gelu bez močoviny (Obr. 13).

Pásy defensinu-1 jsou lépe viditelné u použité koncentrace 5 μ l vzorku hemolymfy a širší u 10 μ l vzorku hemolymfy (Obr. 12A a Obr. 13B) než u abaecinu, kde není žádný viditelný pás u koncentrace 5 μ l vzorku, pouze u 10 μ l vzorku je pozorovatelný užší pás (Obr. 12C a Obr. 13C). Užší pás naznačuje nižší koncentraci abaecinu oproti koncentraci defensinu-1. U PVDF membrány s proteiny přenesenými z gelu s přídavkem močoviny (Obr. 13) byly pásy hůře viditelné vlivem rušivého obarvení pozadí, které bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečným promytím PVDF membrány. Modré skvrny (Obr. 12) pod detekčními pásy na PVDF membráně jsou způsobeny obtiskem barvy ve vzorku hemolymfy využité při elektroforéze.



Obr. 12 Detekce AmP na PVDF membráně. Obr. 12A – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro abaecin. Obr. 12B – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro defensin-1. Obr. 12C – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro hymenoptaecin. Byla použita PVDF membrána s proteiny přenesenými z gelu bez močoviny.

Podle Mahmood *et al.* (2012) lze využít dvě membrány pro blotting proteinů – nitrocelulosovou a PVDF. Nitrocelulosová membrána má vyšší afinitu k proteinům a lepší retenční schopnosti, avšak je mechanicky méně odolná a nelze ji využít k opakované imunochemické detekci. PVDF membrány jsou odolnější a díky tomu se lépe prověřují a skladují. Detekci na PVDF membránách může rušit pozadí, proto je třeba je velmi pečlivě promývat. Podle Cho *et al.* (2012) je třeba PVDF membránu před použitím navlhčit v methanolu, jelikož je extrémně hydrofobní a nebyla by zvlhčována vodnými roztoky. Pokud je ale PVDF membrána ponořena v methanolu příliš dlouhou dobu, zhoršuje se vazebná kapacita pro proteiny i její mechanická odolnost.



Obr. 13 Detekce AmP na PVDF membráně. Obr. 13A – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro hymenoptaecin. Obr. 12B – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro defensin-1. Obr. 13C – membrána inkubovaná s primární protilátkou pro abaecin. Byla použita PVDF membrána s proteiny přenesenými z gelu s přídavkem močoviny.

4.5 Imunohistochemická detekce antimikrobiálních peptidů

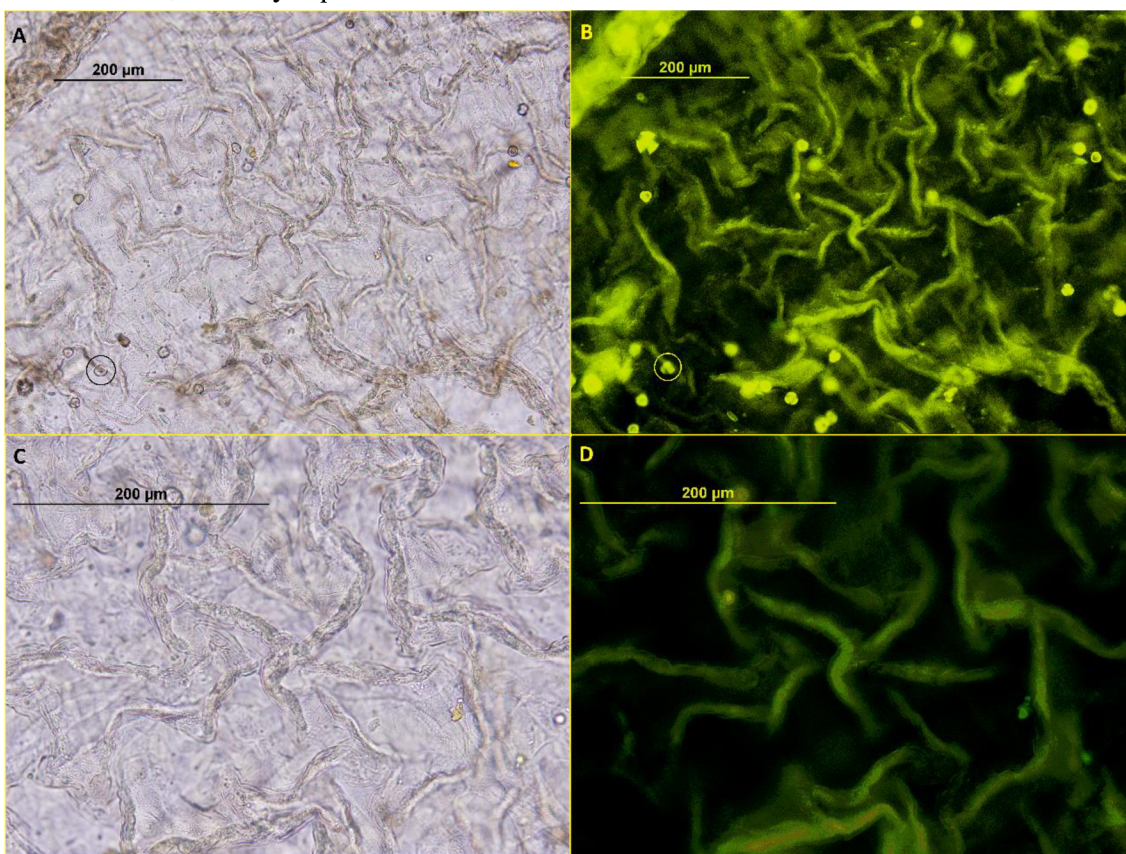
Střeva, která byla využita k imunohistochemické detekci AmP, byla získána z uspaných včel (Obr. 14A), které byly nejprve rozděleny v oblasti mezi hrudí a zadečkem (Obr. 14B). Střeva (Obr. 14C) byla vytažena pomocí pinzety z odděleného zadečku. Vypreparovaná střeva byla fixována v 4% paraformaldehydu v PBS. Blokování střev bylo provedeno podle protokolu Dearden *et al.* (2009), který se věnuje imunohistochemii včelích embryí. Byly připraveny dva vzorky inkubované se specifickými primárními protilátkami pro defensin-1 nebo abaecin. Byl připraven i kontrolní vzorek, který nebyl inkubován s primárními protilátkami. Pod mikroskopem byla pozorována celá střeva při viditelném světle (dále jen VIS) a ve fluorescenčním spektru.



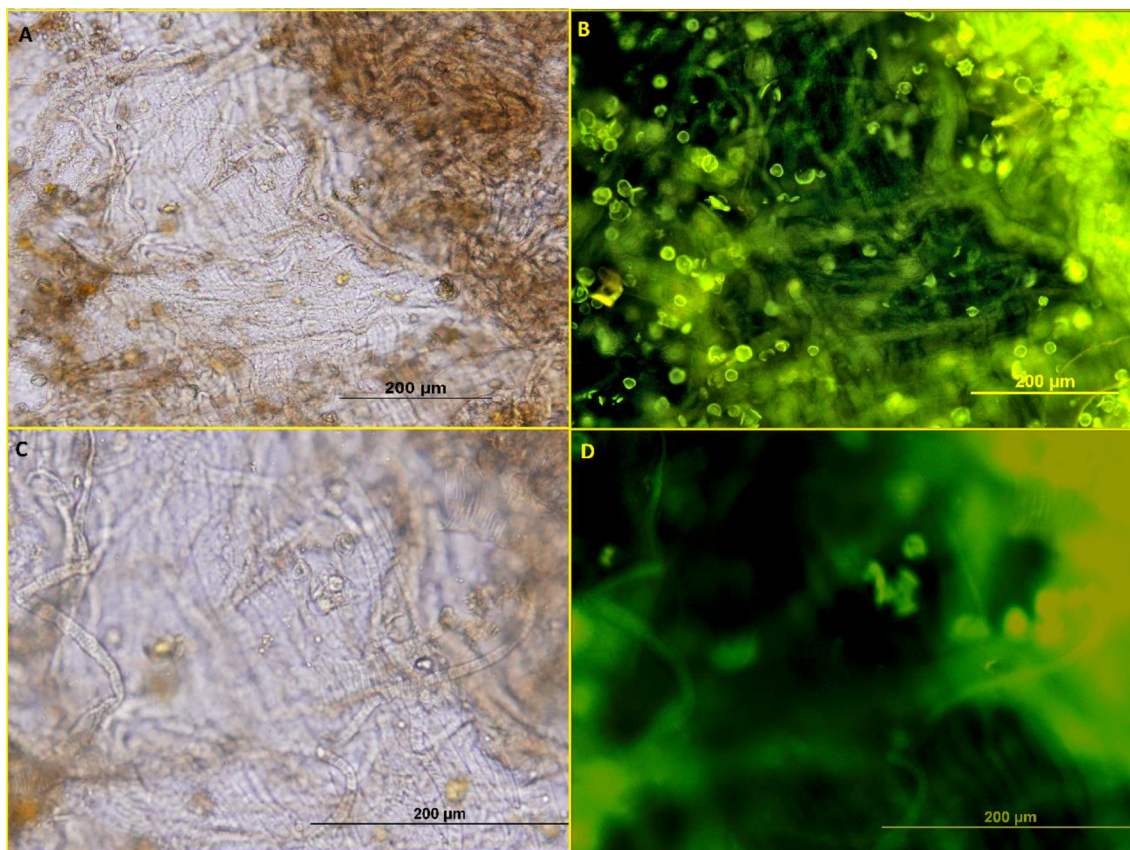
Obr. 14 Preparace střev z včely medonosné. Obr. 14A – uspaná včela. Obr. 14B Rozpůlená včela, připravená k preparaci střev. Obr. 14C – vypreparované střevo.

Defensin-1 fluoreskoval ve vnitřní záhybech střevního epitelu (Obr. 15B a Obr. 15D). Ve střevě lze dále pozorovat fluoreskující pylová zrna (Obr. 15B), které včela zkonsumovala a jejichž složky fluoreskují.

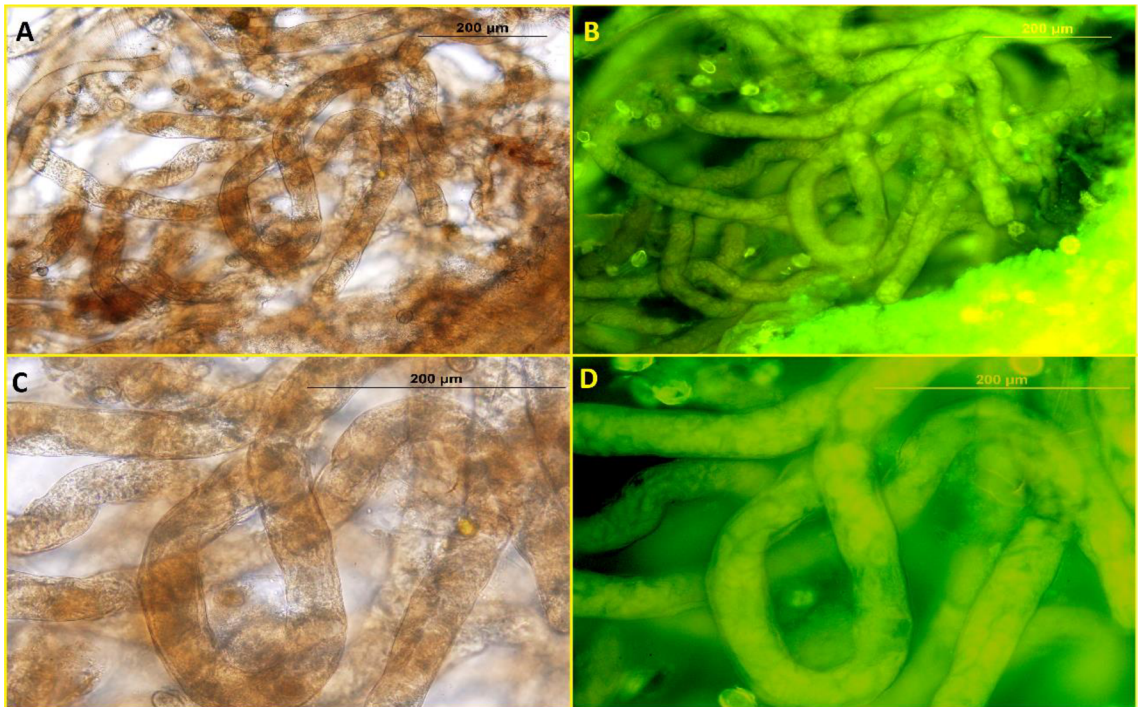
Fluorescenční signál abaecinu (obr. 16) byl znatelně slabší než u defensinu-1, jelikož byla střeva včely, detekované na abaecin, plná pylových zrn a potravy, které také vykazovaly fluorescenci a zhoršovaly tak pozorování fluorescence abaecinu. Dále bylo zhoršeno pozorování vnitřních epitelálních záhybu střeva vlivem fluoreskujících Malpighických tubic (obr. 17), které byly vytrženy spolu se střevem a často překrývaly střevo a znemožnily tak pozorování fluorescence abaecinu. Jelikož byla pozorována celá střeva, a ne jejich tkáňové řezy, byla hůře rozpoznatelná vrstva střeva, která byla pozorována.



Obr. 15 Mikroskopická detekce defensinu-1 ve střevech inkubovaných s primární protilátkou pro defensin-1. Obr.15A Mikroskopická detekce defensinu-1 při VIS při zvětšení 10x10. Obr. 15B Mikroskopická detekce defensinu-1 ve fluorescenčním spektru při zvětšení 10x10. Žlutě zakroužkované je pylové zrno. Obr. 15C Mikroskopická detekce defensinu-1 při VIS při zvětšení 20x10. Obr. 15D Mikroskopická detekce defensinu-1 ve fluorescenčním spektru při zvětšení 20x10.

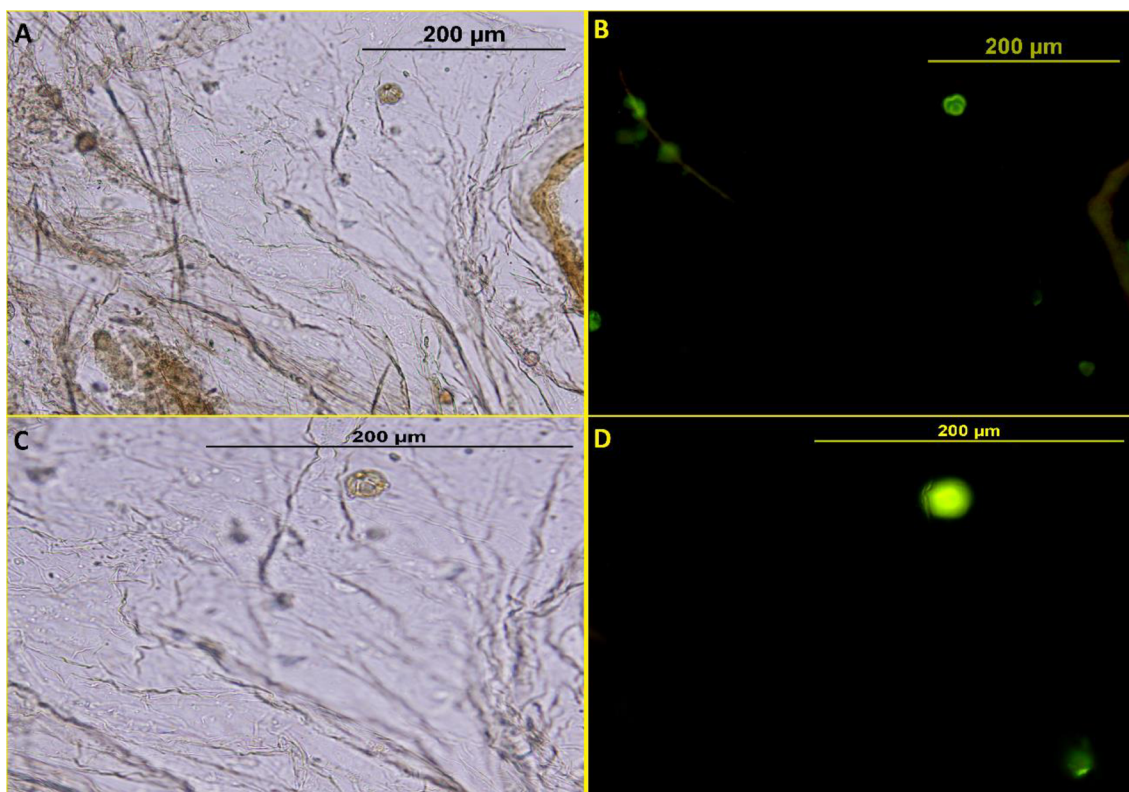


Obr. 16 Mikroskopická detekce abaeicinu ve střevech inkubovaných s primární protilátkou pro abaeicin. Obr.16A Mikroskopická detekce abaeicinu při VIS při zvětšení 10x10. Obr. 16B Mikroskopická detekce abaeicinu ve fluorescenčním spektru při zvětšení 10x10. Obr. 16C Mikroskopická detekce abaeicinu při VIS při zvětšení 20x10. Obr. 16D Mikroskopická detekce abaeicinu ve fluorescenčním spektru při zvětšení 20x10.



Obr. 17 Malpighické trubice pod mikroskopem ve střevě inkubovaném s primární protilátkou pro abaecinu. Obr. 17A Zvětšení 10x10 při VIS. Obr. 17B Zvětšení 10x10 ve fluorescenčním spektru. Obr. 17C Zvětšení 20x10 při VIS. Obr. 17D Zvětšení 20x10 ve fluorescenčním spektru.

Byla provedena kontrola, kdy střeva nebyla inkubována se specifickými primárními protilátkami. U kontroly nebyl pozorován fluorescenční signál epitelu střev, fluoreskovala pouze pylová zrna (obr. 18).



Obr. 18 Střeva pod mikroskopem bez inkubace s primární protilátkou. Obr. 18A Zvětšení 10x10 při VIS. Obr. 18B Zvětšení 10x10 ve fluorescenčním spektru. Obr. 18C Zvětšení 20x10 při VIS. Obr. 18D Zvětšení 20x10 ve fluorescenčním spektru.

5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše shrnující dostupné poznatky o funkci AmP jako složkách humorální imunity hmyzu, se zaměřením na epiteliální imunitu a včelu medonosnou.

V praktické části byla provedena kalibrace Bradfordovy metody k určení celkové koncentrace proteinů ve vzorku hemolymfy. Dále byla provedena tricínová SDS-PAGE elektroforéza, která sloužila k separaci jednotlivých proteinů a peptidů ve vzorku hemolymfy. Byly použity 16% dělicí gely bez přídavku a s přídavkem močoviny. Pozorovaná separace proteinů a peptidů nebyla efektivní z důvodu krátkého provedení elektroforézy. Je třeba tuto metodu dále optimalizovat. Dále byl uskutečněn Western blotting s následným barvením PVDF membrány barvivem Ponceau S, které sloužilo pro kontrolu správného provedení přenosu proteinů a peptidů z gelu na membránu. Následovala detekce abaecinu, defensinu-1 a hymenoptaecinu s využitím specifických primárních protilátek a sekundární protilátky konjugované s AP. V analyzovaném vzorku hemolymfy byly detekovány abaecin a defensin-1, zatímco hymenoptaecin nebyl v hemolymfě detekován.

Byla testována metoda imunohistochemické detekce abaecinu a defensinu-1 ve vzorcích včelích střev. Metoda byla úspěšná, vzorky střev inkubovány se specifickými protilátkami pro abaecin a defensin-1, vykazovaly fluorescenci v místech záhybu střevního epitelu ve fluorescenčním spektru pod mikroskopem. Pro budoucí výzkum je vhodné propláchnout střeva, z důvodu fluoreskujících pylových zrn a potravy ve střevech a dále provést příčné tkáňové řezy střev pro lepší detekci AmP ve střevech včel pomocí fluorescenční nebo konfokální mikroskopie.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Andreu D., Rivas L. (1998): Animal antimicrobial peptides: An overview. *Peptide Science* **47**, 415-433.
- Bachanová K., Klaudivy J., Kopernický J., Šimúth J. (2002): Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* **33**, 259-269.
- Baracchi D., Francese S., Turillazzi S. (2011): Beyond the antipredatory defence: honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon* **58**, 550-557.
- Berthold N., Czihal P., Fritsche S., Sauer U., Schiffer G., Knappe D., Alber G., Hoffmann R. (2013): Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 402-409.
- Bíliková K., Wu G., Šimúth J. (2001): Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* **32**, 275-283.
- Boerjan B., Cardoen D., Bogaerts A., Landuyt B., Schoofs L., Verleyen P. (2010): Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*. *Neuropharmacology* **58**, 248-258.
- Bond P.J., Parton D.L., Clark J.F., Sansom M.S. (2008): Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial peptide maculatin 1.1. *Biophysical Journal* **95**, 3802-3815.
- Brockmann A., Annangudi S.P., Richmond T.A., Ament S.A., Xie F., Southey B.R., Rodriguez-Zas S.R., Robinson G.E., Sweedler J.V. (2009): Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 2383-2388.
- Bulet P., Hetru Ch., Dimarcq J.L., Hoffmann D. (1999): Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 329-344.
- Callewaert L., Michiels C.W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* **35**, 127-160.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins – antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe C., Rivière L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. (1993): Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7044-7054.
- Casteels P., Romagnolo J., Castle M., Casteels-Josson K., Erdjument-Bromage H., Tempst P. (1994): Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics – prospects of manipulating the antibacterial spectrum and combating acquired-resistance. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 26107-26115.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1994): Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 28569-28575.
- Cremer S., Armitage S.A., Schmid-Hempel P. (2007): Social immunity. *Current Biology* **17**, R693-R702.
- Danihlik J., Šebela M., Petřivalský M., Lenobel R. (2014): A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1374**, 134-144.
- Danihlik J., Aronstein K., Petřivalský M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research* **54**, 123-136.
- de Lima P.R., Brochetto-Braga M.R. (2003): Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**, 149-162.

- Dearden P.K., Duncan E.J., Wilson M.J. (2009): Immunohistochemistry on Honeybee (*Apis mellifera*) Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**, pdb-prot5227.
- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. (2016): Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**:1245049. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/1245049/>.
- Di Prisco G., Annoscia D., Margiotta M., Ferrara R., Varricchio P., Zanni V., Caprio E., Nazzi F., Pennacchio F. (2016): A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **113**, 3203-3208.
- Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A. (2016): Encapsulation and nodulation in insect. *Invertebrate Survival Journal* **13**, 229-246.
- Eleftherianos I., Xu M., Yadi H., Ffrench-Constant R.H., Reynolds S.E. (2009): Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *Journal of Experimental Biology* **212**, 1840-1848.
- Emery O., Schmidt K., Engel P. (2017): Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* **26**, 2576-2590.
- Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.
- Foettinger A., Leitner A., Lindner W. (2006): Derivatisation of arginine residues with malondialdehyde for the analysis of peptides and protein digests by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **41**, 623-632.
- Garcia E.S., Castro D.P., Figueiredo M.B., Genta F.A., Azambuja P. (2009): *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors* **2**, 1-10.
- Gätschenberger H., Azzami K., Tautz J., Beier H. (2013): Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. *PLOS One* **8**:e66415. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066415>.
- Gliński Z. a Jarosz J. (2001): Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta* **36**, 12-24.
- Gliński Z. a Buczek K. (2003): Response of the Apoidea to fungal infection. *Apiacta* **38**, 183-189.
- Hancock R.E. (1997): The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology* **5**, 37-42.
- Hancock R.E., Chapple D.S. (1999): Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Harrison, D.A. (2012): The JAK/STAT pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**:a011205. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/4/3/a011205.short>.
- Hellgren O., Sheldon B.C., Buckling A. (2010): In vitro tests of natural allelic variation of innate immune genes (avian β -defensins) reveal functional differences in microbial inhibition. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 2726-2730.
- Hoffmann J.A. (2003): The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**, 33-38.
- Cho E., Kim C., Kook J.K., Jeong Y.I., Kim J.H., Kim Y.A., Endo M., Hwang C.H. (2012): Fabrication of electrospun PVDF nanofiber membrane for Western blot with high sensitivity. *Journal of Membrane Science* **389**, 349-354.
- Imada K., Leonard W.J. (2000): The jak-STAT pathway. *Molecular Immunology* **37**, 1-11.
- Jean-François F., Elezgaray J., Berson P., Vacher P., Dufourc E.J. (2008): Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophysical Journal* **95**, 5748-5756.
- Jefferson J.M., Dolstad H.A., Sivalingam M.D., Snow J.W. (2013): Barrier immune effectors are maintained during transition from nurse to forager in the honey bee. *PLOS One* **8**:e54097. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054097>.
- Kaneko T., Silverman N. (2005): Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular Microbiology* **7**, 461-469.

- Klaudiny J., Albert Š., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J. (2005): Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 11-22.
- Kwong W.K., Mancenido A.L., Moran N.A. (2017): Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science* **4**:170003. <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170003>.
- Laughton A.M., Boots M., Siva-Jothy M.T. (2011): The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* **57**, 1023-1032.
- Lavine M.D., Strand M.R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207-215.
- Lourenço A.P., Florecki M.M., Simões Z.L.P., Evans J. D. (2018): Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. *Insect Molecular Biology* **27**, 577-589.
- Mahmood T., Yang P.C. (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**, 429.
- Maróti G., Kereszt A., Kondorosi E., Mergaert P. (2011): Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology* **162**, 363-374.
- Marringa W.J., Krueger M.J., Burritt N.L., Burritt J.B. (2014): Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *PLOS One* **9**:e108486. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108486>.
- Martinson V.G., Moy J., Moran N.A. (2012): Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 2830-2840.
- Mihajlovic M., Lazaridis T. (2010): Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1798**, 1494-1502.
- Mondet F., Beaurepaire A., McAfee A., Locke B., Alaux C., Blanchard S., Danka B., Le Conte, Y. (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology* **50**, 433-447
- Moran N.A., Hansen A.K., Powell J.E., Sabree Z.L. (2012): Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLOS One* **7**:e36393. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036393>.
- Negri P., Maggi M., Correa-Aragunde N., Brasesco C., Eguaras M., Lamattina L. (2013): Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie* **44**, 575-585.
- Park D., Jung J.W., Lee M.O., Lee S.Y., Kim B., Jin H.J., Kim J., Ahn Y., Lee K.W., Song Y.S., Hong S., Womack J.E., Kwon H.W. (2014): Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Peptides* **53**, 185-193.
- Powell J.E., Martinson V.G., Urban-Mead K., Moran N.A. (2014): Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 7378-7387.
- Ratiu A.C., Neagu A., Mihalache M.R., Lazar V., Evocoiu A. (2016): Molecular and bioinformatics analysis of the relative expression profiles of *dorsal*, *Toll-1*, *Relish* and *Duox* genes in young versus old diutinus workers of *Apis mellifera*. *Romanian Biotechnological Letters* **21**, 11513-11526.
- Raymann K., Moran N. A. (2018): The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 97-104.
- Ryu J.H., Ha E.M., Lee W.J. (2010): Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 369-376.
- Sander H., Wallace S., Plouse R., Tiwari S., Gomes A.V. (2019): Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Analytical Biochemistry* **575**, 44-53.

- Shai Y. (1999): Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* **1462**, 55-70
- Shen L.R., Dilireba S., Zhou W.X., Wang Y.R., Li M.L., Zhai L. (2014): Rapid detection of immunity against bacteria in asian honeybee and western honeybee with quantification of royalisin in the hemolymph by fast ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 9305-9309.
- Schlüns H., Crozier R.H. (2007): Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology* **16**, 753-759.
- Schmid M.R., Anderl I., Vesala L., Vanha-aho L.M., Deng X.J., Rämet M., Hultmark D. (2014): Control of *Drosophila* blood cell activation via Toll signaling in the fat body. *PLOS One* **9**:e102568. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102568>.
- Schägger H., Von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Tian B., Fadhil N.H., Powell E., Kwong W.K., Moran N.A. (2012): Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio* **3**:e00377-12. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.00377-12>.
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000): Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.
- Valanne S., Wang J. H., Rämet M. (2011): The *Drosophila* toll signaling pathway. *The Journal of Immunology* **186**, 649-656.
- Whitten M.M.A. a Coates C.J. (2017): Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side. *Pigment Cell and Melanoma Research* **30**, 386-401.
- Wilson R., Chen C., Ratcliffe N. A. (1999): Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *The Journal of Immunology* **162**, 1590-1596.
- Wilson-Rich N., Dres S.T., Starks P.T. (2008): The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **54**, 1392-1399.
- Xia X., You M., Rao X. J., Yu X. Q. (2018): Insect C-type lectins in innate immunity. *Developmental & Comparative Immunology* **83**, 70-79.
- Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D., Yu X.Q. (2014): Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 5807-5822.
- Zor T., Selinger Z. (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* **236**, 302-308.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	akrylamid
AMK	aminokyselina
AmP	antimikrobiální peptidy
AP	alkalická fosfatasa
APS	peroxodisíran amonný
bAA	N,N'-methylen-bisakrylamid
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CBB G250	Coomassie Brilliant Blue G250
DAMPs	molekulární vzory asociované s poškozením
DOPA	dopamin
LPS	lipopolysacharidy
NBT	nitroblue tetrazolium chlorid
MALDI-TOF	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MCD	degranulační peptid mastocytů
PAMPs	molekulární vzory asociované s patogenem
PAP	aktivní forma proteinasy
PBS	fosfátový pufr
pro-PAP	neaktivní forma proteinasy
proPO	profenoloxidasa
PRR	rozpoznávací receptory molekulárních vzorů
PVDF	polyvinylidenfluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RNAi	RNA interference
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
VIS	viditelné světlo