

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Testování antimikrobiální aktivity peptidů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Silvie Dostálková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák
Rok:	2014

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 6. 5. 2014

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi za věnovaný čas, všestrannou pomoc a trpělivost při psaní této bakalářské práce a cenné připomínky k experimentální části.

Můj dík patří také MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, PhD. za ochotu pomoci při experimentální části a poskytnuté rady z oblasti mikrobiologie.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také celé katedře biochemie za vstřícný přístup během mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Silvie Dostálková
Název práce	Testování antimikrobiální aktivity peptidů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Antimikrobiální peptidy jsou důležitou součástí humorální imunity živočichů. Vyskytují se napříč všemi organismy včetně hmyzu. U této skupiny živočichů bylo také dosud izolováno a popsáno největší množství antimikrobiálních peptidů. Tato práce se zabývá základní charakteristikou antimikrobiálních peptidů, jejich rozdělením a mechanismem působení. Je zaměřena na antimikrobiální peptidy včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>), jejichž zástupci (apidaecin Ia, abaecin, jellein I, jellein II) jsou také testováni v praktické části. Peptidy jsou testovány vůči bakteriálním kmenům <i>Escherichia coli</i>, <i>Micrococcus luteus</i> a také <i>Paenibacillus larvae</i>, který způsobuje onemocnění mor včelího plodu. Pro testování antimikrobiální aktivity peptidů pomocí difúzních testů byl optimalizován způsob kultivace, testování vhodných médií i aplikace peptidů na bakteriální kultury. Byla zjištěna citlivost bakteriálních kmenů <i>E. coli</i> vůči apidaecinu Ia. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace apidaecinu Ia byla použita metoda měření růstových křivek, díky které se podařilo stanovit minimální inhibiční koncentraci 25 µg/ml k testovaným kmenům <i>E. coli</i>. Difúzní testy prokázaly, že některé bakteriální kmeny <i>P. larvae</i> a <i>M. luteus</i> jsou citlivé vůči jelleinu I nebo jelleinu II,</p>

avšak necitlivé k apidaecinu Ia a abaecinu. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace jelleinu I a II vůči kmenům *P. larvae* je potřeba dále zoptimalizovat protokol kultivace v tekutém médiu. Získané výsledky poukazují na rozdílnou citlivost jednotlivých bakteriálních kmenů k antimikrobiálním peptidům, avšak rozdíly mohou být způsobeny i použitým kultivačním médiem nebo způsobem aplikace peptidů.

Klíčová slova	antimikrobiální peptidy, apidaecin, abaecin, jellein I, jellein II, včela medonosná, <i>Paenibacillus larvae</i>
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Silvie Dostálková

Title Testing of antimicrobial activity of peptides

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor Mgr. Jiří Danihlik

The year of presentation 2014

Abstract Antimicrobial peptides are important part of humoral immunity of the animals. They occur across all organisms, including insect. In this group of animals was also isolated and characterized the largest amount of antimicrobial peptides. This thesis deals with the basic characteristic of antimicrobial peptides, their distribution into groups and mechanism of action. The thesis is focused on the antimicrobial peptides from honey bee (*Apis mellifera*), whose representatives (apidaecin Ia, abaecin, jelleine I, jelleine II) are also tested in the practical part of this thesis. The peptides are tested against the bacterial strains of *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and also against *Paenibacillus larvae*, which is causative agent of American foulbrood. Cultivation conditions, use of suitable media and also application of the peptides to the bacterial culture was optimized for the testing by diffusion assay. The sensitivity of the *E. coli* strains against apidaecin Ia was determined. Growth curves measuring method was applied to determine the minimal inhibitory concentration of apidaecin Ia against *E. coli* strains. Due to this method minimal inhibitory concentration of apidaecin Ia against *E. coli* strains was 25 µg/ml. The results of diffusion tests showed that some of the

P. larvae strains and *M. luteus* are sensitive against jellein I or jellein II, but these strains are not sensitive against apidaecin Ia and abaecin. To determinate the minimal inhibitory concentration of jellein I and jellein II against *P. larvae* strains is further optimisation of cultivation in liquid medium required. The gained results point to different sensitivity of the bacterial strains to antimicrobial peptides. Both various composition of cultivation media and application of the peptides onto bacteria culture could cause different sensitivity of bacterial strains to antimicrobial peptides.

Keywords	antimicrobial peptides, apidaecin, abaecin, jelleine I, jelleine II, honey bee, <i>Paenibacillus larvae</i>
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	11
1 Úvod	12
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
2.1 Antimikrobiální peptidy	13
2.1.1 Historie výzkumu antimikrobiálních peptidů.....	13
2.1.2 Dělení antimikrobiálních peptidů.....	14
2.1.3 Kationické antimikrobiální peptidy	14
2.1.4 Anionické peptidy	15
2.1.5 Aromatické dipeptidy.....	15
2.1.6 Deriváty proteinů vážící kyslík	16
2.2 Antimikrobiální peptidy hmyzu	17
2.2.1 Cecropiny	18
2.2.2 Hmyzí defensiny	18
2.2.3 Peptidy bohaté na glycin	18
2.2.4 Peptidy bohaté na prolin.....	19
2.3 Mechanismus účinku kationických antimikrobiálních peptidů	20
2.3.1 Průnik peptidu bakteriální stěnou	20
2.3.2 Přiblížení peptidu k buněčné membráně.....	21
2.3.3 Peptidy s mechanismem účinku narušujícím cytoplazmatickou membránu	21
2.3.3.1 Model sudové skruže (barrel-stave model).....	22
2.3.3.2 Kobercový model (carpet model)	23
2.3.3.3 Model toroidního póru (toroidal pore mode).....	24
2.3.3.4 Model micelárních agregátů (aggregate channel model).....	24
2.3.4 Mechanismus účinku peptidů s intracelulárním působením (intracellular targeting)	25
2.4 Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům	27

2.5	Antimikrobiální peptidy včely medonosné	28
2.5.1	Apidaeciny	28
2.5.2	Abaecin	29
2.5.3	Jelleiny	29
2.6	Bakteriální choroby včel	31
2.6.1	<i>Paenibacillus larvae</i> a mor včelího plodu	31
2.6.2	<i>Melissococcus plutonius</i> a hniloba včelího plodu	32
2.7	Metody testování antimikrobiální aktivity peptidů	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1	Materiál	36
3.1.1	Chemikálie	36
3.1.2	Biologický materiál.....	36
3.1.3	Přístroje a vybavení.....	37
3.1.4	Synteticky připravené antimikrobiální peptidy	37
3.1.5	Použité roztoky a média	37
3.2	Metody	38
3.2.1	Příprava zásobních roztoků peptidů	38
3.2.2	Ověření přítomnosti chemicky nasyntetizovaných peptidů pomocí MALDI-TOF.....	38
3.2.2.1	Detekce peptidů pomocí MALDI-TOF	38
3.2.3	Stanovení závislosti absorpance na McFarlandově stupnici.....	38
3.2.4	Očkování média vyšetřovaným bakteriálním kmenem.....	39
3.2.5	Testování pomocí difuzních testů	39
3.2.5.1	Aplikace AMP v podobě papírových disků	39
3.2.5.2	Aplikace AMP do vykrojených jamek v médiu.....	39
3.2.5.3	Aplikace AMP přímo na misku	39
3.2.6	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	40
3.2.7	Stanovení růstové křivky bakterií	40

4	Výsledky a diskuze	42
4.1.1	Ověření přítomnosti chemicky nasyntetizovaných peptidů pomocí MALDI-TOF.....	42
4.1.2	Kalibrační křivka závislosti absorbance na McFarlandově stupnici.....	43
4.1.3	Růst bakteriálních kmenů na různých médiích	43
4.1.4	Vliv rozpouštědla na antimikrobiální aktivitu peptidů.....	44
4.1.5	Difúzní testy	48
4.1.5.1	Difúzní testy apidaecinu Ia	50
4.1.5.2	Difúzní testy abaecinu	51
4.1.5.3	Difúzní testy jelleinů.....	51
4.1.5.4	Antimikrobiální aktivita peptidů proti kmenům <i>P. larvae</i>	55
4.1.5.5	Kultivace bakterií z inhibičních zón	58
4.1.6	Stanovení růstové křivky <i>E. coli</i> v přítomnosti peptidu.....	59
4.1.6.1	Vliv inkubace apidaecinu Ia s <i>E. coli</i> (CCM 4517).....	60
4.1.7	Stanovení MIC jelleinu II na jednotlivé kmeny <i>P. larvae</i>	60
5	Závěr	65
6	Literatura	66
7	Seznam použitých zkratk	71

Cíle práce

- Provést literární rešerši o významu a funkci antimikrobiálních peptidů se zaměřením na včelí antimikrobiální peptidy.
- Provést literární rešerši o včelích bakteriálních chorobách.
- Optimalizovat protokol kultivace a testování antimikrobiálních peptidů.
- Otestovat antimikrobiální aktivity peptidů apidaecinu Ia, abaecinu, jelleinu I a jelleinu II *in vitro* na bakteriálních kulturách *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* a *Paenibacillus larvae*.
- Zpracovat získané výsledky a zhodnotit citlivosti testovaných bakteriálních kmenů vůči antimikrobiálním peptidům.

1 Úvod

Antimikrobiální peptidy jsou důležitou součástí humorální imunity živočichů. Tyto látky dokáží inhibovat růst patogenních mikroorganismů v těle hostitele, což vede k jejich potencionálnímu využití jako léčiv v lidské i veterinární medicíně. V současnosti používaná antibiotika jsou již k mnoha bakteriálním kmenům rezistentní, zatímco k většině antimikrobiálních peptidů si dokázalo vyvinout rezistenci jen velmi málo bakterií. Toto zjištění vede k dalšímu zkoumání aktivity těchto látek a jejich účinků.

Včely, které patří mezi jeden z hospodářsky nejvýznamějších druhů hmyzu, jsou ohrožovány bakteriálními nemocemi, na něž dosud nebyla objevena účinná léčba. Tyto nemoci, mezi které patří například mor včelího plodu, ohrožují včelstva a mohou zapříčinit i jejich úhyn. Použití antibiotik pro léčbu takovýchto onemocnění je v mnoha zemích zakázáno kvůli pronikání zbytků těchto látek do včelích produktů. Použití antimikrobiálních peptidů, které jsou přirozenou součástí organismu včel, může být pro léčbu těchto chorob daleko výhodnější.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou geneticky kódované a ribosomálně syntetizované peptidy. Lze je charakterizovat na základě několika hlavních rysů: krátký aminokyselinový řetězec (30-60 aminokyselin), převažující pozitivní náboj, tepelná stabilita a žádný účinek vůči eukaryotickým buňkám (Li *et al.*, 2012). Antimikrobiální peptidy produkují prakticky všechny organismy od prokaryot až po eukaryota. Jsou považovány za vysoce konzervované molekuly, které se u savců efektivně zachovaly až do současnosti (Li *et al.*, 2012).

2.1.1 Historie výzkumu antimikrobiálních peptidů

První látku s antimikrobiální aktivitou popsal v roce 1922 Alexander Fleming, který zpozoroval baktericidní a bakteriostatickou aktivitu v nosním sekretu pacienta trpícího rýmou. Tuto aktivitu pojmenoval jako lysozym, díky její schopnosti lyzovat bakteriální kulturu na miskách (Nakasutji a Gallo, 2012). Tento objev a jeho následné pozorování později přivedly Fleminga k objevu prvního antibiotika penicilinu.

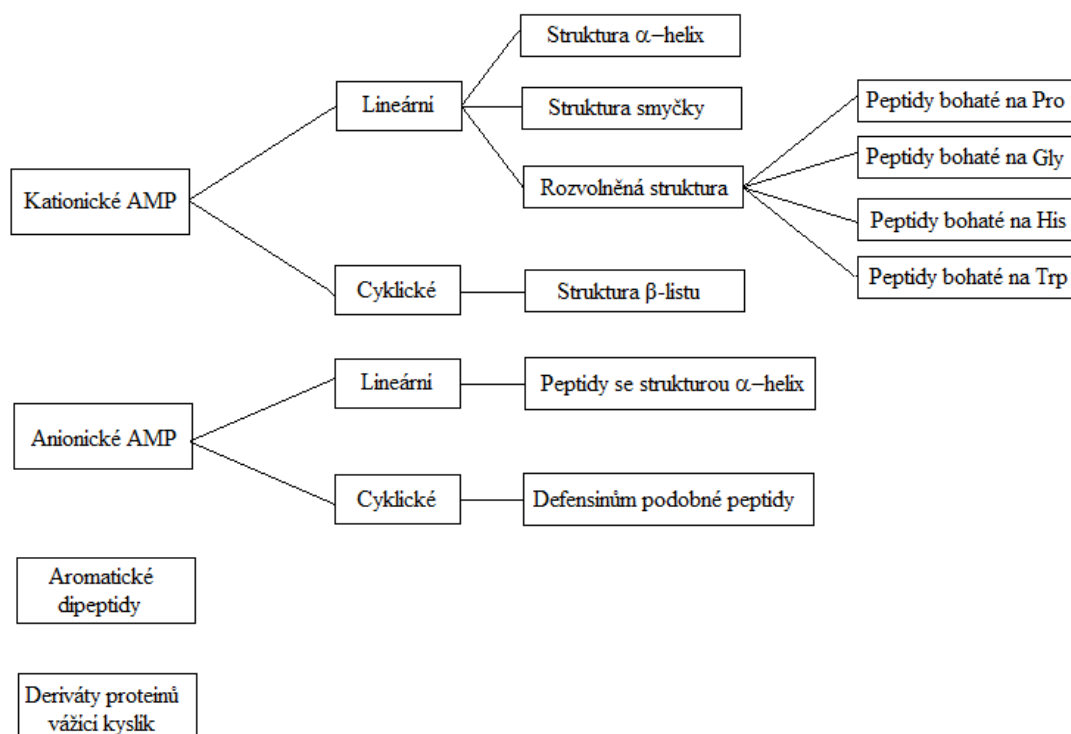
Antimikrobiální peptidy pak byly v roce 1939 izolovány v prokaryotických buňkách. René Dubos tyto antimikrobiální látky, pojmenované gramicidiny, izoloval z půdní bakterie *Bacillus brevis*. Gramicidin vykazoval baktericidní a bakteriostatickou aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím *in vitro* i *in vivo* (Dubos 1939a, 1939b). Gramicidiny byly první AMP, jejichž primární struktura byla charakterizována (Nakasutji a Gallo, 2012).

Do historie výzkumu AMP se však nejvíce zapsal Hans Boman, který společně se svou skupinou v roce 1981 položil základy pro studium vrozené imunity organismů se snahou identifikovat strukturu vnitřních obranných molekul hmyzu (Nakasutji a Gallo, 2012). Na základě jeho poznatků byly v roce 1981 izolovány a charakterizovány dva antimikrobiální peptidy z hemolymfy martináče (*Hyalophora cecropia*). Tyto peptidy byly pojmenovány cecropin A a cecropin B (Steiner *et al.*, 1981).

Od té doby bylo identifikováno velké množství AMP z různých živočišných druhů. Dnes se počet popsáných AMP odhaduje na více jak 1500 zástupců AMP z různých organismů (Li *et al.*, 2012).

2.1.2 Dělení antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy lze na základě primární nebo sekundární struktury rozdělit do skupin (Obr. 1).



Obr. 1 Schéma rozdělení antimikrobiálních peptidů (upraveno dle Andreu a Rivas, 1998; Powers a Hancock, 2003).

2.1.3 Kationické antimikrobiální peptidy

Kationické AMP patří mezi nejpočetnější skupinu. Tyto peptidy také vykazují mnohonásobně vyšší antimikrobiální aktivitu než ostatní druhy (Vizioli a Salzet, 2002). Peptidy patřící do této skupiny jsou definovány jako peptidy s aminokyselinovým řetězcem pod 50 aminokyselin a převažujícím kladným nábojem daným přítomností lysinu a argininu v primární struktuře peptidů. Antimikrobiální aktivita těchto druhů byla prokázána vůči Gram-pozitivním (G+) i Gram-negativním (G-) bakteriím, houbám a prvokům (Powers a Hancock, 2003). Více než polovina peptidů z této skupiny byla izolována z hmyzu (Vizioli a Salzet, 2002).

Z hlediska prostorového uspořádání jejich molekul tyto AMP tvoří: α-helix, β-skládaný list, smyčku a rozvolněné peptidy. Nejčastěji se peptidy vyskytují ve struktuře α-helix, β-skládaný list (Hancock a Lehrer, 1998).

Peptidy s α -helikální strukturou mohou v centru molekuly obsahovat patrný ohyb, v němž jsou přítomny aminokyseliny prolin a glycin. Peptid tedy netvoří jednodušou α -helix, ale spíše strukturu α -helix-smyčka- α -helix. Počet prolinů může ovlivnit hemolytickou i antimikrobiální aktivitu peptidu (Zhang *et al.*, 1999). Pro strukturu β -listu jsou typické disulfidové můstky, které stabilizují molekulu. Stabilita peptidu je důležitá pro jeho interakci s membránou, při níž dochází k ohybu molekuly (Powers a Hancock, 2003). Charakteristická smyčková struktura je u peptidů se strukturou smyčky dána přítomností jednoduché vazby (disulfidová, amidová, isopeptidová). Peptidy, jež se řadí mezi ty s rozvolněnou strukturou, zpravidla postrádají sekundární strukturu v důsledku vysokého zastoupení glycinu či prolinu (peptidy izolované z hmyzu) nebo tryptofanu a histidinu (peptidy izolované ze savců). Jejich finální struktura je tvořena pomocí vodíkových vazeb a van der Waalsových interakcí s membránovými lipidy, namísto intramolekulárních vodíkových vazeb (Powers a Hancock, 2003; Vizioli a Salzet, 2002).

2.1.4 Anionické peptidy

Anionické peptidy představují další skupinu antimikrobiálních peptidů. Tyto AMP tvoří poměrně malou skupinu. Prvními charakterizovanými anionickými AMP byly povrchově aktivní peptidy izolované z plicní tkáně ovcí (Brodgen, 1992). Tyto peptidy mají záporný náboj díky přítomnosti asparagové nebo glutamové kyseliny ve struktuře peptidu (Lavery *et al.*, 2011). Vykazují antimikrobiální aktivitu vůči G+ bakteriím, ale i vůči G- bakteriím a houbám.

Do této skupiny patří peptidy enkelytin, dermicidin a maximin 5, mající α -helikální strukturu (Stefano *et al.*, 1998; Schitteck *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002). Izolovány také byly anionické defensinům podobné peptidy z bource morušového (*Bombyx mori*) (Wen *et al.*, 2009) a z lesknice bavlníkové (*Spodoptera littoralis*) (Seufi *et al.*, 2011).

2.1.5 Aromatické dipeptidy

Aromatické dipeptidy jsou antibakteriální sloučeniny o malé molekulové hmotnosti izolované z larev řádu dvoukřídlých (*Diptera*). Nejznámějším zástupcem této skupiny je N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin (5-S-GAD), který je zkoumán především pro svou protinádorovou aktivitu a schopnost potlačení angiogeneze. Mechanismus účinku těchto peptidů není ještě znám (Akiyama *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2006).

2.1.6 Deriváty proteinů vážící kyslík

Jako první zástupci této skupiny byly izolovány hemocyaninové deriváty z hemolymfy členovců a kroužkovců. V hemolymfě klíšťat byla také pozorována podobná molekula, v podobě rozštípané formy hemoglobinu obratlovců, která byla produkována parazitem po požití krevní moučky. Tyto proteiny byly popsány jako baktericidní složky a mohly by být považovány za rezervní obranné molekuly v boji s patogeny (Fogaça *et al.*, 1999; Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001).

Baktericidní aktivita anionických AMP, aromatických dipeptidů a kyslík vážících proteinových derivátů je v porovnání s kationickými peptidy slabá. Mechanismus účinku těchto molekul může být odlišný od kationických peptidů a ostatních antibiotik. Tyto molekuly mohou doplňovat aktivitu jiných sloučenin a představovat tak užitečný základ pro vývoj nových syntetických derivátů (Vizioli a Salzet, 2002).

2.2 Antimikrobiální peptidy hmyzu

Bezobratlí nemají na rozdíl od obratlovců vyvinutou adaptivní (získanou) imunitu, která se vyznačuje tvorbou specifických protilátek a imunologickou pamětí. Jejich imunitní systém je založen na vnější fyzikální bariéře (např. kutikula, slizová vrstva, stěna střeva) a rychlých a nespecifických reakcích vrozené imunity.

Efektivně vyvinutý systém vrozené imunity je složen z několika hlavních složek, mezi něž patří aglutininy, lysiny, fenoloxidasová kaskáda a antimikrobiální peptidy (AMP). AMP hmyzu jsou syntetizovány především v tukovém tělísku (ekvivalent lidských jater), ale i v hemocytech, kutikulárních buňkách, ve střevech, slinných žlázách a reprodukčním ústrojí jako systematická odpověď proti patogenům (Vilmos a Kurucz, 1998). Exprimované peptidy jsou poté sekretovány do hemolymfy (Li *et al.*, 2012).

Některé z hmyzích peptidů mohou být exprimovány ve formě proteinových prekurzorů, které obsahují jak sekvenci pro daný peptid, tak i další AK na N-konci a C-konci peptidové sekvence. Tyto „přebývající“ aminokyselinové sekvence jsou poté odstraněny pomocí proteas (Casteels-Josson *et al.*, 1993). Nejdůležitějším enzymem v tomto procesu je dipeptidyl aminopeptidasa, která postupně odštěpuje daný peptid z prekurzorové sekvence. Funkce dipeptidyl aminopeptidasy byla v tomto kontextu popsána u melittinu, který je odvozen z prekurzoru promelittinu (Kreil *et al.*, 1980). Exprese aktivních peptidů z proteinových prekurzorů je obvykle zahájena až po napadení organismu bakteriálním patogenem. Exprese peptidů ve formě neaktivních prekurzorů je typická např. pro apidaeciny, cecropin, či již výše zmiňovaný melittin (Casteels-Josson *et al.*, 1993; Dickinson *et al.*, 1988; Kreil *et al.*, 1980). Existují však i případy, kdy je peptid syntetizován přímo bez prekurzoru. Příkladem takového peptidu je diphtericin, izolovaný z masačky rodu *Phormia* (Reichhart *et al.*, 1992).

Do dnešní doby bylo u hmyzu identifikováno více než 200 AMP, které jsou rozděleny do pěti skupin dle jejich aminokyselinové sekvence a antibakteriální aktivity: cecropiny, hmyzí defensiny, peptidy bohaté na glycin a peptidy bohaté na prolin (Li *et al.*, 2012).

2.2.1 Cecropiny

Cecropiny (cecropin A a cecropin B) patří mezi první AMP, které byly úspěšně izolovány a charakterizovány (Brey a Hultmark, 1998). Následně byly identifikovány další cecropiny z rozličných hmyzích druhů, patřících zejména do řádu motýlů (*Lepidoptera*) a dvoukřídlých (*Diptera*) (Brey a Hultmark, 1998). Cecropiny jsou si strukturně velmi podobné. Tyto peptidy neobsahují ve své struktuře cystein a celkově jsou složeny ze sekvence 35-39 aminokyselin (AK) (Li *et al.*, 2012). Hmyzí cecropiny vytvářejí dva lineární řetězce α -helix, které jsou vzájemně propojeny Ala-Gly-Pro pantem (Steiner, 1982; Holak *et al.*, 1988). Vyznačují se silně bazickou N-terminální sekvencí a silně hydrofobním úsekem v C-terminální části (Steiner *et al.*, 1981).

2.2.2 Hmyzí defensiny

Antimikrobiální látky zvané defensiny byly nalezeny u savců, hmyzu i rostlin. Pro všechny defensiny je typický zvýšený obsah AK cysteinu ve struktuře peptidu a tvorba 3-4 disulfidových můstků (Li *et al.*, 2012). První hmyzí defensin byl sapecin izolovaný z larvy masačky rodu *Sarcophaga* (*Sarcophaga peregrina*) (Matsuyama a Natori, 1988). Ve stejné době dochází také k objevu dipterinů, izolovaných skupinou vědců v čele s Jeanem Lambertem, kteří také zároveň navrhli název hmyzí defensiny díky podobné antimikrobiální aktivitě a strukturním podobnostem dipterinů se savčími defensiny (Lambert *et al.*, 1988). Hmyzí defensiny jsou tvořeny sekvencí 36-51 AK a obsahují šest konzervovaných cysteinových reziduí, podílejících se na tvorbě tří disulfidových můstků ve struktuře peptidů. Struktura je tvořena α -helix smyčkou a dvěma antiparalelními β -skládanými listy, které jsou stabilizovány již výše zmíněnými disulfidovými můstky (Otvos, 2000a; Klaudiny *et al.*, 2005). Ve struktuře těchto peptidů se hojně vyskytují arginin a lysin, což vede k silnému kladnému náboji těchto peptidů (Otvos, 2000a). Hmyzí defensiny vykazují antimikrobiální aktivitu především vůči G+ bakteriím, silná antimikrobiální aktivita se také objevuje vůči některým G- bakteriím, kvasinkám, houbám a prvokům (Li *et al.*, 2012). Do skupiny defensinů patří i royalisin izolovaný z mateří kašičky včely medonosné (*Apis mellifera*) (Fujiwara *et al.*, 1990).

2.2.3 Peptidy bohaté na glycin

Skupina těchto peptidů se vyznačuje nápadně zvýšeným obsahem glycinových reziduí v jejich struktuře. Zvýšený obsah glycinových reziduí má velký vliv na terciární

strukturu těchto peptidů a na jejich mechanismus účinku (Li *et al.*, 2012). Antimikrobiální aktivita těchto peptidů je vysoká především vůči G- bakteriím (Otvos, 2000a). Nejznámějšími zástupci jsou attaciny (Hultmark *et al.*, 1983), sacrotoxiny (Natori, 1977), dipetriciny (Dimarcq *et al.*, 1988) objevené u zástupců řádů motýlů a dvoukřídlých a peptid hymenoptaecin izolovaný z včely medonosné (Casteels *et al.*, 1993).

2.2.4 Peptidy bohaté na prolin

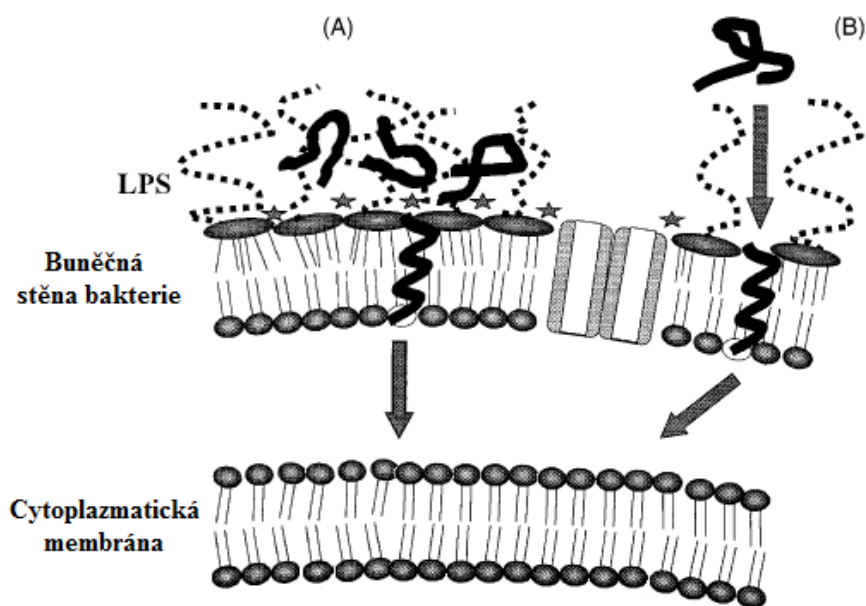
Tyto kationické peptidy obsahují ve své struktuře zvýšený obsah prolinových residuí. Jsou si nápadně podobné strukturně i ve složení aminokyselinové sekvence (Otvos, 2002). Vytvářejí rozvolněné molekuly složené z 14-59 AK. V jejich struktuře se často objevují triplety a dublety prolinu s bazickými aminokyselinami argininem a histidinem (Pro-Arg-Pro; Pro-His-Pro) (Bulet a Stöcklin, 2005). Jejich antimikrobiální aktivita je nejvyšší vůči G- bakteriálním kmenům a je nápadně vyšší u O-glykosylovaných peptidů (Brey a Hultmark, 1998). Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny patří apidaeciny (Casteels *et al.*, 1993) a abaeciny (Casteels *et al.*, 1990, Yoshiyama a Kimura, 2010) izolované z včely medonosné, drosocin izolovaný z octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) (Bulet *et al.*, 1993) a pyrrococin (Cociancich *et al.*, 1994) a metalnikowin (Chernysh *et al.*, 1995) izolované z řádu brouků (*Coleoptera*).

2.3 Mechanismus účinku kationických antimikrobiálních peptidů

Mechanismus působení AMP je založen na průniku peptidů buněčnou stěnou bakterií a jejich následnou interakcí s cytoplazmatickou membránou (CM). Po interakci peptidů s cytoplazmatickou membránou dochází k buněčné smrti, která je způsobena buď narušením CM a ztrátou buněčného obsahu, nebo interakcí peptidů uvnitř buňky s vnitrobuněčnými cíli.

2.3.1 Průnik peptidu bakteriální stěnou

Průnik bakteriální stěnou je nejlépe prostudován u G- bakterií. Tyto bakterie obsahují ve své buněčné stěně vrstvu lipopolysacharidů (LPS), která vytváří vnější bakteriální membránu. Vrstva LPS udává vnější membráně záporný náboj. Kladný náboj peptidu pak interaguje se záporně nabitou vrstvou LPS, což vede buď k neutralizaci náboje a vytvoření trhliny, prostřednictvím které peptid proniká buněčnou stěnou, nebo k navázání do vazebného místa dvojmocných kationtů na LPS a narušení buněčné stěny (Obr. 2) (Hancock a Chapple, 1999).



Obr. 2: Průnik peptidů stěnou G- bakterií. Interakce peptidu s buněčnou stěnou vedoucí k neutralizaci a průniku peptidu vytvořenou trhlinou (A), nebo navázání peptidu do vazebného místa dvojmocných kationtů na LPS a narušení buněčné stěny (B) (upraveno dle Hancock a Chapple, 1999).

Kationické peptidy se mohou navázat do vazebného místa dvojmocných běžně přítomných kationtů (Mg^{2+} , Ca^{2+}) díky vyšší afinitě k LPS. Tyto kationty jsou peptidy vytlačeny směrem ven od negativně nabitě vrstvy LPS, což vede k lokálnímu narušení buněčné stěny (Hancock a Chapple, 1999). Celý proces pronikání peptidu bakteriální stěnou je označováno jako self-promoted uptake (vnesení do buňky podporované samotným peptidem) (Hancock, 1997).

2.3.2 Přiblížení peptidu k buněčné membráně

Vzhledem k tomu, že působení peptidu má ochránit hostitele před bakteriálními infekcemi, je důležité selektivní působení peptidu na membránu patogenů (bakteriální cytoplazmatickou membránu). Rozlišení mezi eukaryotní a bakteriální membránou umožňují rozdíly v jejich struktuře, složení a transmembránovém potenciálu (Neubauerová *et al.*, 2009).

Všechny buněčné biologické membrány jsou tvořeny fosfolipidovou dvojrůstvou, která se vyznačuje amfipatickým charakterem, jež je způsoben hydrofobními a hydrofilními vrstvami membrány. V membránách vyšších živočichů se vyskytují kromě fosfolipidové dvojrůstvy také amfoterní ionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu, které udávají této membráně neutrální náboj. U bakteriálních membrán se však vyskytují hydroxylované fosfolipidy fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin, které společně se sloučeninami z buněčné stěny bakterií (např. glykolipidy, glykoproteiny) udržují záporný náboj bakteriální CM (Yeaman a Yount, 2003). Záporný náboj bakteriální CM vyvolává elektrostatickou interakci s kladně nabitým peptidem a dochází tak k přiblížování peptidu k membráně. Tento efekt je ještě zesílen působením membránového potenciálu, který vzniká nábojovou asymetrií, způsobenou rozdílnou distribucí jednotlivých molekul na obou stranách membrány (Neubauerová *et al.*, 2009).

2.3.3 Peptidy s mechanismem účinku narušujícím cytoplazmatickou membránu

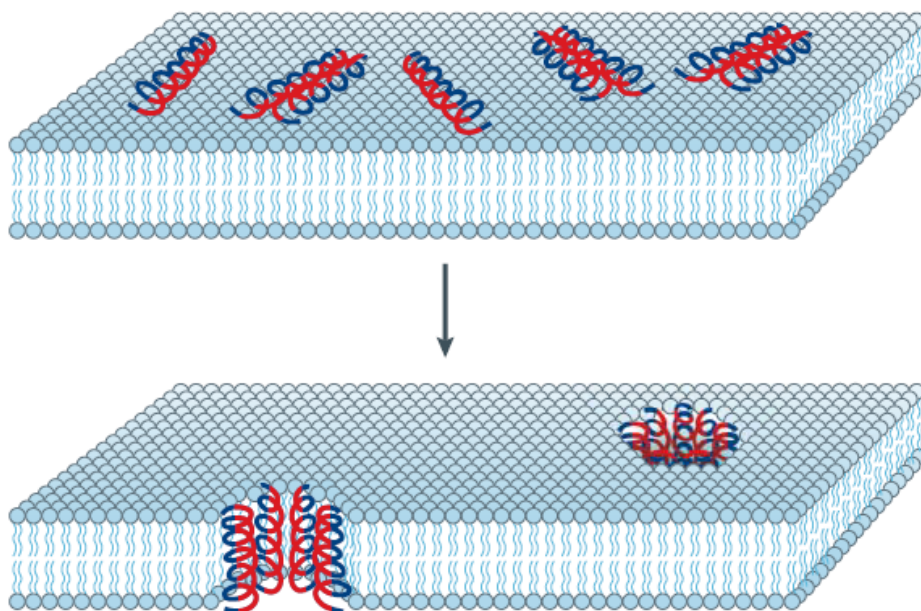
Interakce peptidu s CM ve většině případů způsobuje narušení či rozklad membrány. Narušení celistvosti membrány vytvořením nových iontově selektivních kanálů způsobuje změny v transmembránovém potenciálu, což vede až ke ztrátě energetické funkce biomembrány. Větší rozsah poškození membrány pak vede k úniku životně důležitých látek z vnitřního prostoru buňky a způsobuje tak buněčnou smrt (Neubauerová *et al.*, 2009).

Mezi nejznámější modely s tímto mechanismem účinku patří: model sudové skruže, koberecový model, model toroidního póru a model micelárních agregátů (Li *et al.*, 2012).

2.3.3.1 Model sudové skruže (barrel-stave model)

Nejprve dochází k hromadění peptidů na bakteriálním povrchu, kde peptidy ve formě monomerů vytvářejí kruhové útvary. Po navázání na buněčnou stěnu se peptidy orientují paralelně k lipidové dvojvrstvě. Poté dochází ke změně jejich orientace a vsunutí peptidů kolmo mezi hydrofobní a hydrofilní část membrány, kde utvoří pór podobající se sudu (barrel) (Oren a Shai, 1998; Brodgen, 2005). Okraj póru je tvořen α -helikálními peptidy. Během vsunování peptidů do membrány se hydrofobní konce peptidů orientují směrem k lipidové vrstvě a hydrofilní konce vytvářejí vnitřní prostor póru (Obr. 3) (Cézard *et al.*, 2011).

Postupným začleňováním dalších peptidů do membrány dochází k rozšiřování vytvořeného póru. Při tomto mechanismu účinku nedochází k deformaci ani ohnutí buněčné membrány, ale peptidy se začleňují přímo do membrány (Cézard *et al.*, 2011; Brodgen, 2005).

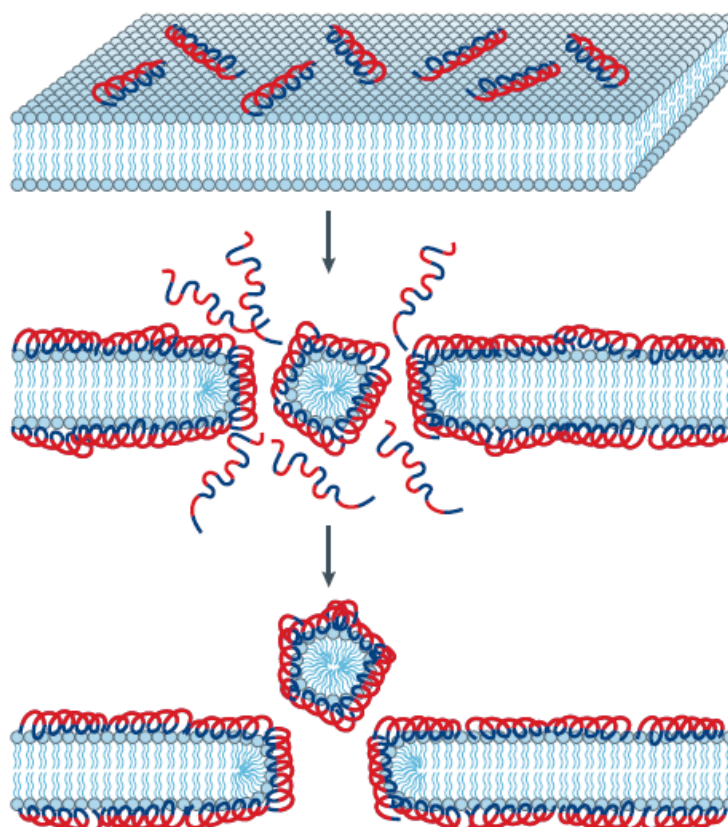


Obr. 3: Mechanismus účinku AMP pomocí modelu sudové skruže. Červeně jsou vyznačeny hydrofilní konce peptidu, modře konce hydrofobní (převzato z Brodgen, 2005).

2.3.3.2 Kobercový model (carpet model)

U kobercového modelu dochází, na rozdíl od mechanismu sudové skruže, ke shlukování peptidů (tvorbě agregátů) na povrchu membrány. V případě tohoto modelu si peptidy zachovávají i paralelní orientaci vůči povrchu membrány. Hydrofobní strana peptidu je vázána k povrchu membrány, zatímco hydrofilní část je orientována na vnější stranu. Klastry peptidů vytvářejí kobercovou vrstvu na povrchu membrány a po dosažení kritické koncentrace peptidů dochází k oslabení membrány. Na takto oslabenou membránu působí peptidy stejným způsobem jako detergenty, což vede k rozvolnění membrány na micely a usnadnění jejího rozpuštění (Obr. 4) (Oren a Shai, 1998; Brodgen, 2005).

V případě tohoto mechanismu nedochází k včlenění peptidů do membrány ani k tvorbě pórů. Aby byl tento mechanismus účinný, je zapotřebí vysoká koncentrace peptidů, která zahrne celý povrch membrány (Cézard *et al.*, 2011)



Obr. 4: Kobercový model mechanismu účinku. Červeně jsou vyznačeny hydrofilní konce peptidu, modře konce hydrofobní (převzato z Brodgen, 2005).

2.3.3.3 Model toroidního póru (toroidal pore mode)

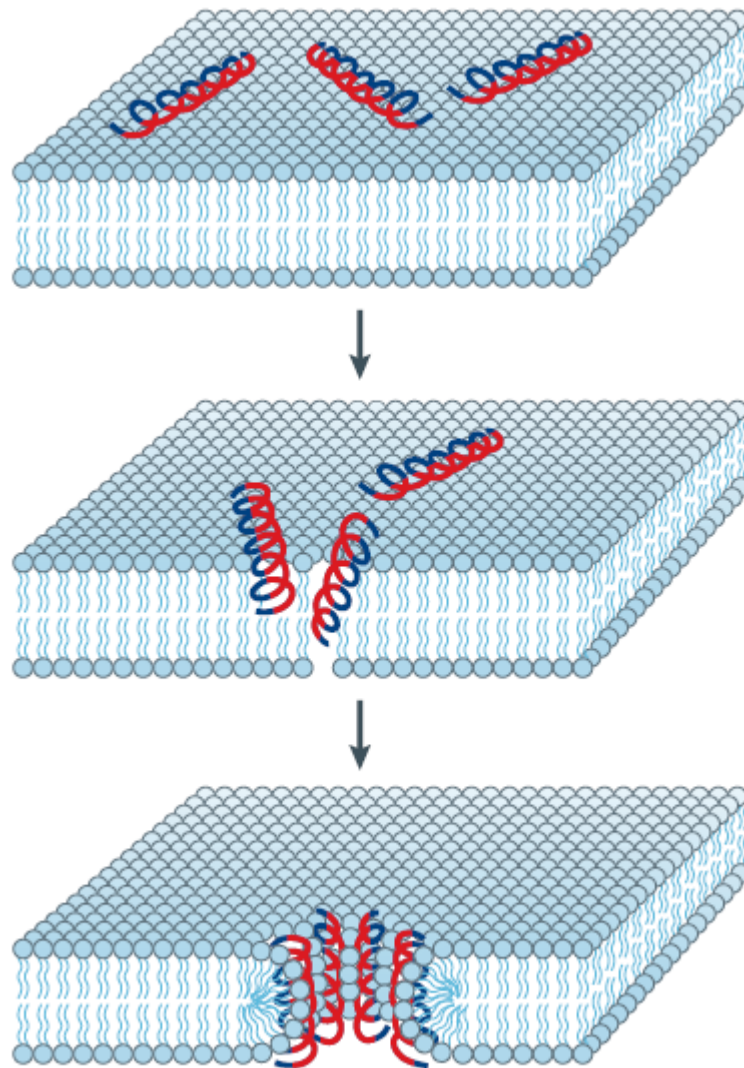
Peptidy se shlukují na povrchu membrány a začleňují se do ní. Toto postupné začleňování peptidů do membrány vede k jejímu ohýbání a deformaci. Při interakci s membránou peptidy zaujímají α -helikální konformaci a orientují se paralelně s membránou tak, že hydrofobní část peptidů interaguje s lipidovou vrstvou a hydrofilní část peptidů tvoří vnitřní prostor póru. Při formování toroidního póru se polární část peptidu spojuje s polární skupinou lipidů. Lipidy se odklánějí od rovnoběžné vrstvy a spojují se s vedlejšími fosfolipidy. To vede k permanentnímu ohybu membrány (Obr. 5) (Brodgen, 2005). Hlavním rozdílem mezi mechanismem sudové skruže a toroidním modelem je, že vznikající pór je tvořen peptidy i membránovými lipidy (Yang *et al.*, 2001). Nedávno bylo také prokázáno, že vzájemné působení lipidů a peptidu je důležité pro tvorbu póru. Peptid totiž způsobuje zakřivení membrány a lipidová část reguluje konformaci peptidu (Bozelli Jr *et al.*, 2012).

Existuje také neuspořádaný model toroidního póru (disordered toroidal pore model), kdy je utváření póru více náhodné a k samotné tvorbě póru je zapotřebí méně peptidů, jeden či dva peptidy jsou zanořené uvnitř póru a zbytek peptidů je situován kolem ústí póru (Nguyen *et al.*, 2011).

2.3.3.4 Model micelárních agregátů (aggregate channel model)

Model micelárních agregátů nemusí být nutně řazen do skupiny peptidů, které narušují buněčnou membránu. Principem tohoto modelu je shlukování peptidů s fosfolipidovými ionty do speciálních nestrukturovatelných micelárních agregátů, které poskytují kanály pro únik iontů i větších molekul skrze membránu (Hancock a Chapple, 1999; Teixeira, *et al.*, 2012). Destabilizaci membrány a usnadnění přístupu peptidu k membráně zajišťuje posun dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+}) směrem od LPS. Toto zvýšení propustnosti membrány nemusí být tak velké, aby vedlo k jejímu narušení a buněčné smrti (Li *et al.*, 2012).

Tento model se od ostatních odlišuje krátkou životností transmembránových klastrů, které umožňují peptidům přechodně proniknout přes membránu, aniž by způsobily její depolarizaci a narušení. Jakmile se peptid dostane dovnitř buňky, může proniknout k intracelulárním cílům, jakými jsou např. DNA, RNA (Hancock a Chapple, 1999).



Obr. 5: Model toroidního póru. Červeně jsou vyznačeny hydrofilní konce peptidu, modře konce hydrofobní (převzato z Brodgen, 2005).

2.3.4 Mechanismus účinku peptidů s intracelulárním působením (intracellular targeting)

Existují i mechanismy účinku peptidů, kdy nedochází k narušení povrchu membrány, ale peptid proniká membránou dovnitř buňky. Pro peptidy působící tímto mechanismem je po překonání buněčné membrány důležité nahromadit se v cytoplazmě. Poté dochází k jejich působení na vnitrobuněčné cíle. Mezi tyto cíle patří narušení klíčových buněčných procesů, jakými jsou syntéza DNA a proteosyntéza, skládání proteinů, syntéza buněčné stěny a inhibice enzymové aktivity. Mohou zasáhnout i do procesů buněčného dělení nebo energetických dějů v eukaryotních organelách (Brodgen, 2005; Teixeira *et al.*, 2012).

Kationické peptidy mají po překonání membrány tendence interagovat s DNA, RNA nebo s intracelulárními proteiny. Mohou způsobovat i inhibici syntézy těchto látek (Powers a Hancock, 2003). Na nukleové kyseliny se váže například α -helikální peptid buforin II nebo peptid s β -strukturou tachypleisin (Park *et al.*, 1998; Yonezawa *et al.*, 1992). Peptidy pleurocidin a dermaseptin (α -helikální peptidy), indolicidin (peptidy bohaté na Pro) inhibují syntézu DNA, RNA a proteinů (Patrzykat *et al.*, 2002; Subbalakshmi a Sitaram, 1998).

Krátké peptidy ze skupiny peptidů bohatých na Pro – pyrrolicorin, drosocin a abaecin se specificky vážou na bakteriální chaperon DnaK (analog eukaryotního Hsp70) a nespecificky na chaperonin GroEL (analog eukaryotního Hsp60). DnaK a GroEL se uplatňují při posttranslačních modifikacích proteinů (Otvos, 2000b).

2.4 Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům

Vyvinout rezistenci vůči AMP není pro patogeny snadné, především kvůli nespecifickým mechanismům účinku a také díky tendenci AMP reagovat se záporně nabitými membránami bakterií. Přesto se u bakterií vyvinuly mechanismy rezistence, které cílí na klíčové kroky účinku AMP (Teixera *et al.*, 2012, Cézard *et al.*, 2011).

Nejefektivnějším obranným systémem vůči AMP a jiným patogenům je přítomnost kapsulárních polysacharidů či glykokalyxu. Tento vnější ochranný obal některých bakterií je záporně nabitý a váže tak kladně nabité peptidy ještě před jejich interakcí s membránou (Yount *et al.*, 2006).

Upevnění peptidu na membránu může být znemožněno snížením negativního náboje membrány. Membrány bakterií, které vykazují rezistenci vůči AMP (rody *Morganella*, *Serratia*), mají nízký anionický charakter. To se ukázalo jako nejjednodušší způsob, jak zabránit upevnění peptidu na membránu. Některé bakterie si tedy vyvinuly mechanismy pro rychlou redukci záporného náboje membrány (Peschel a Sahl, 2006). Tyto mechanismy spočívají v modifikaci kyseliny teichoové (součást peptidoglykanu) nebo lipidu A (část LPS) a jsou kódovány množstvím různých genů.

Další ochranou může být produkce proteas, které ničí peptidy s vysokým kladným nábojem. Tyto enzymy jsou méně účinné vůči peptidům se strukturou β -listu, jejichž disulfidové můstky tvoří pravděpodobně stérickou zábranu pro tyto enzymy (Devine *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2012). Příkladem může být štěpení a následná inaktivace cathelicidinu LL-37 pomocí metaloproteinasy aureolysinu, kterou produkuje bakterie *Staphylococcus aureus* (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004).

Také změna v propustnosti membrány je jedním z důležitých faktorů při zvyšování bakteriální rezistence. G- bakterie mohou zvýšit hydrofobní interakce v jejich vnější membráně. To vede ke snižování propustnosti membrány a následnému poklesu účinnosti peptidů (Pozo Navas *et al.*, 2005).

Z mikroorganismů si dosud dokázaly vyvinout rezistenci vůči AMP jenom některé bakterie a to i přesto, že jako součást vnitřní imunity živočichů existují AMP již dlouhou dobu. Tento fakt svědčí o tom, že vyvinout účinný mechanismus vůči AMP není vůbec jednoduché ani pro takto adaptabilní a odolné mikroorganismy (Cézard *et al.*, 2011).

2.5 Antimikrobiální peptidy včely medonosné

U včely medonosné bylo dosud popsáno několik skupin AMP. Mezi tyto skupiny patří apidaeciny, abaecin, defensiny, hymenoptaecin a dále skupina jelleinů (Casteels-Josson *et al.*, 1993, Fontana *et al.*, 2004). Pro testování antimikrobiální aktivity v této bakalářské práci byly vybrány peptidy apidaecin Ia (API Ia), abaecin (ABA), jellein I (JEL I) a jellein II (JEL II).

2.5.1 Apidaeciny

Casteels *et al.* (1989) poprvé popsali tuto skupinu peptidů a izolovali apidaeciny z hemolymfy imunizovaných včel. Tyto peptidy patří do skupiny peptidů bohatých na prolin a tvoří největší podskupinu na prolin bohatých peptidů. Izolováno bylo 16 přirozeně se vyskytujících isoform u čmeláků (*Bombus*), vos (*Vespula*) (Casteels a Tempst, 1994) a dalších zástupců řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Tyto isoformy jsou složeny z 16-20 AK. Na C-konci obsahují vysoce konzervovanou část osmi AK - PRPPHPR(I/L). N-koncová část peptidu je volná a může zde docházet ke změnám. Změny v konzervované části na C-konci vedou ke ztrátě antimikrobiální aktivity. Změny v N-koncové části peptidu způsobují rozdíly v aktivitě těchto peptidů, ale nedochází k úplné ztrátě antimikrobiální aktivity (Casteels *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2006).

Apidaecin izolovaný ze včely medonosné (*Apis mellifera*) je složen ze sekvence 18 AK. Aminokyselinová sekvence tohoto peptidu je GNNRP(V/I)YIPQPRPPHPR(I/L). Apidaeciny se u včel vyskytují ve 4 isoformách Ia, Ib, II a III (Tab. 1). Složení jednotlivých isoform se liší záměnou 6. AK na N-konci valinu za isoleucin (isoformy II, a III), nebo záměnou koncové AK isoleucinu za leucin (isoforma Ia) (Casteels *et al.*, 1989). Isoforma III má nahrazenou 9. AK prolin za serin. Tato isoforma dosud nebyla jako jediná detekována, její existence je zatím pouze předpokládána na základě analýzy cDNA (Li *et al.*, 2006).

Apidaeciny jsou v organismu syntetizovány jako odpověď na bakteriální infekci. Jejich syntéza probíhá z jedné prekurzorové molekuly. Byly vyizolovány a sekvencovány 3 isoformy mRNA apidaecinů: Apidaecin typ 73 (Q06602, UniprotKB), typ 22 (P35581, UniprotKB) a typ 14 (Q06601, UniprotKB). Každá mRNA molekula kóduje v různém zastoupení a v různých kopiích isoformy aktivních peptidů. (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

Tab. 1: Jednotlivé isoformy apidaecinu vyskytující se u včely medonosné (upraveno dle Li *et al.*, 2006). Tučně vyznačeny odlišnosti v aminokyselinové sekvenci.

Isoforma	Peptidová sekvence
Ia	GNNRPFVYIPQPRPPHPRI
Ib	GNNRPFVYIPQPRPPHPRL
II	GNNRPIIYIPQPRPPHPRL
III	GNNRPFVYISQPRPPHPRL

Aktivita těchto peptidů je vysoká vůči G- bakteriím. Tyto peptidy nepůsobí antimikrobiálně vůči kvasinkám a houbám. Apidaeciny nenarušují cytoplasmatickou membránu G- bakterií, ale působí intracelulárně navázáním na bakteriální chaperon DnaK a chaperonin GroEL (Casteels a Tempst, 1994; Otvos, 2000b). Chemicky syntetizované apidaeciny mají stejnou aktivitu jako jejich přírodní analoga (Casteels *et al.*, 1989).

2.5.2 Abaecin

Abaecin, antimikrobiální peptid patřící do skupiny peptidů bohatých na prolin, byl poprvé izolován a charakterizován v roce 1990 (Casteels *et al.*). Aminokyselinová sekvence tohoto peptidu je YVPLPNVPQGRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY. Celkový počet AK v této sekvenci je 34. Některé části sekvence nacházející se u abaecinu jsou podobné apidaecinům a diptericinům, ale díky fyziologickým rozdílům je tento peptid klasifikován zvlášť, mimo tyto dvě skupiny peptidů (Casteels *et al.*, 1990). Syntéza abaecinu probíhá z jedné prekurzorové molekuly. Pro získání aktivního peptidu musí dojít k odstranění sekvence 19 AK, která se nachází před aktivním peptidem (Casteels-Josson *et al.*, 1994). Abaecin je aktivní vůči G- i G+ bakteriím. Jeho aktivita vůči G- bakteriím je však nižší než u apidaecinu.

2.5.3 Jelleiny

Tato skupina peptidů byla poprvé izolována z mateří kašičky afrikanizovaných včel (*Apis mellifera scutelata*). Izolovány byly 4 druhy jelleinů, které se nazývají jellein I-IV (Tab. 2). Tyto peptidy se skládají ze sekvence 8-9 AK. Odlišují se od sebe změnami v AK sekvenci. Jellein I neobsahuje na rozdíl od jelleinu II na N-konci threonin, jellein III obsahuje jako poslední AK na N-konci kyselinu glutamovou. Jellein IV nemá na rozdíl od ostatních jelleinů na C-konci leucin.

Tab. 2: Formy jelleinů vyskytující se v mateří kašičce včel. Tučně vyznačeny odlišnosti v aminokyselinové sekvenci (upraveno dle Fontana *et al.*, 2004).

Peptid	Peptidová sekvence
Jellein I	PFKISIH L
Jellein II	T PFKISIH L
Jellein III	E PKISIH L
Jellein IV	TPFKISIH

Tyto změny ve struktuře mají velký podíl na antimikrobiální aktivitu těchto peptidů. Největší antimikrobiální aktivitu má jellein I, který vykazuje antimikrobiální aktivitu jak vůči G⁺ a G⁻ bakteriím, tak i kvasinkám. Aktivitu vůči G⁺, G⁻ bakteriím i kvasinkám má i jellein II, jeho minimální inhibiční koncentrace jsou však vyšší než u jelleinu I. Jellein III nevykazuje antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám a jeho aktivita vůči bakteriálním kmenům je výrazně nižší. U jelleinu IV nebyla dosud prokázána žádná antimikrobiální aktivita (Tab. 3). Žádná antimikrobiální aktivita jelleinu IV je pravděpodobně způsobena právě chybějícím leucinem na C-konci peptidu (Fontana *et al.*, 2004).

Syntéza těchto peptidů probíhá pravděpodobně také z jednoho velkého prekurzorového proteinu MRJP-1. Jellein-II může být proteolyticky odstřižen z prekurzorového proteinu MRJP-1 trypsinem, protože arginin na pozici 373 předchází sekvenci jelleinu-II. Trypsin je produkován hltanovými žlázami včel. Další exoproteinasy štěpí jellein-II na jellein-I nebo jellein-IV (Fontana *et al.*, 2004). Tvorba těchto peptidů na rozdíl od ostatních včelích peptidů není podmíněna propuknutím bakteriální infekce. Tyto peptidy jsou syntetizovány průběžně ve žlázách dělnic a sekretovány do mateří kašičky, kde zastávají ochrannou funkci vůči patogenům (Fontana *et al.*, 2004).

Tab. 3: Různá antimikrobiální aktivita isoform jelleinů, R - rezistentní kmen (upraveno dle Fontana *et al.*, 2004)

Mikroorganismus	Minimální inhibiční koncentrace (µg/ml)			
	jellein I	jellein II	jellein III	jellein IV
<i>Staphylococcus aureus</i> (G ⁺)	10	15	30	R
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (G ⁺)	15	10	30	R
<i>Bacillus subtilis</i> (G ⁺)	10	30	R	R
<i>E. coli</i> (G ⁻)	2,5	15	15	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G ⁻)	10	15	30	R
<i>Candida albicans</i> (kvasinka)	2,5	2,5	R	R

2.6 Bakteriální choroby včel

Mezi nejčastější patogeny vyskytující se u včel patří bakterie *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius*. Tyto bakterie způsobují onemocnění mor včelího plodu, resp. hnilobu včelího plodu.

2.6.1 *Paenibacillus larvae* a mor včelího plodu

P. larvae je G+ sporulující bakterie, která způsobuje onemocnění mor včelího plodu. První zmínky o tomto onemocnění pocházejí už z 18. století, kdy Shirach (1769) popsal včelí chorobu, která se vyznačovala zvláštním zápachem, jenž pocházel z nemocných včelstev. Původce tohoto onemocnění byl však poprvé popsán až v roce 1906, kdy byla z nemocných včelích larev izolována bakterie *Bacillus larvae* (starší název pro *P. larvae*), způsobující právě toto onemocnění (White, 1906).

Spory, které tato bakterie tvoří, jsou vysoce odolné a snadno se šíří po okolí. Tyto spory napadají larvy včel, dospělé včely slouží pouze jako přenašeči (Hitchcock *et al.*, 1979; Wilson 1971). Po propuknutí infekce dochází k masivnímu množení bakterie ve střevech larvy (spora vyklíčí už do 24 h od nákazy), bez viditelného poškození epitelárních tkání. V pozdější fázi infekce se střevo larvy zcela zaplní namnoženými bakteriemi a dochází k proniknutí bakterií skrze střevní epitel a jejich šíření do tělní dutiny (*haemocoel*) (Yue *et al.*, 2008). Poté následuje postupný a úplný rozklad celé larvy pomocí proteas produkovaných bakterií. Tento rozklad se projevuje tvorbou hnědé, mazlavé tekutiny (příškvár) na dně buňky (Obr. 6). Příškvár obsahuje obrovské množství spor *P. larvae*. Odstraněním víčka buňky dochází k zachycení spor na dospělé včely a opětovnému šíření těchto spor k dalším larvám (Genersch, 2010).

Jediným způsobem, jak se zbavit takové nákazy bývá mnohdy pouze spálení celého včelstva, aby došlo k zabránění šíření spor do okolních včelstev, což z této choroby činí velkou hrozbu pro všechny chovatele včel.



Obr. 6: Buňky napadené morem včelího plodu. Buňka je zaplněna hnědým příškvarem (fotografie použita se svolením autora J. Danihlíka)

2.6.2 *Melissococcus plutonius* a hniloba včelího plodu

Historie objevu tohoto onemocnění je úzce spjatá s morem včelího plodu. Tato dvě onemocnění byla nejprve popisována společně jako onemocnění, které se vyskytuje ve dvou formách: mírná, léčitelná forma a zhoubná, neléčitelná forma (Dzierzon, 1882). Chesire a Cheyne (1885) uvádějí jako původce tohoto onemocnění bakterii *Bacillus alvei*. Toto tvrzení bylo však vyvráceno Whitem (1906), který ve snaze izolovat tuto bakterii objevil skutečného původce zhoubné a neléčitelné formy (mor včelího plodu) *P. larvae*. White (1912) také předpokládal, že původcem mírnější formy onemocnění (hniloba včelího plodu) je bakterie *Bacillus plutonius* (starší název pro *M. plutonius*), tuto bakterii však nebyl schopen izolovat. Izolovat a charakterizovat tuto bakterii se podařilo až mnohem později. Ukázalo se také, že *Paenibacillus alvei* (dříve *Bacillus alvei*) sice není přímý původce ani jednoho z těchto onemocnění, ale často se však vyskytuje jako sekundární patogen v případě hniloby včelího plodu (Bailey 1957, 1983).



Obr. 7: Buňky napadené hnilobou včelího plodu. U napadených larev lze vidět změnu polohy v buňce (převzato z Forsgren, 2010)

M. plautoni napadá nezavíčkované včelí larvy. Tato bakterie se živí potravou ve střevech larvy, což vede k jejímu vyhladovění. Napadená larva v buňce se poté v důsledku bolesti pohybuje, což vede ke změně její obvyklé polohy (Obr. 7). Uhynulá larva se tedy namísto normální stočené polohy nachází v neobvyklých pozicích (stočená kolem stěny buňky, nebo natažená podélně). Dochází také k postupné změně barvy larvy od bílé přes krémovou, žlutou až hnědou. Při napadnutí většího počtu buněk se u tohoto onemocnění může projevit také nepříjemný hnilobný zápach, typický i pro mor včelího plodu (Forsgren, 2010).

Pro toto onemocnění, stejně jako pro mor včelího plodu, dosud nebyla nalezena vhodná léčba. V některých zemích se používají k léčbě takto nemocných včel antibiotika, která se ale mohou ve zbytkových množstvích dostávat do medu. V České republice je léčba pomocí antibiotik zakázána. Nakažená včelstva tedy musí být zlikvidována.

Včely mohou být také oslabeny různými viry i houbami (např. houba *Ascophatera apis* nebo virus deformovaných křídel, virus pytlíčkovitého plodu a další). U včel se také může vyskytovat roztoč kleštík včelí (*Varroa destructor*), který je nebezpečný tím, že nabodává kutikulu dospělých včel a odsává jejich hemolymfu. Snížený obsah

hemolymfy vede k oslabení imunitního systému včely a ta je tak náchylnější na ostatní již výše popsaná onemocnění (Daníhlík, 2008b).

2.7 Metody testování antimikrobiální aktivity peptidů

Pro stanovení antimikrobiální aktivity peptidů se využívá difúzních testů (kvalitativní stanovení) a stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC, kvantitativní stanovení) (Dutta *et al.*, 2008; Berthold *et al.*, 2013).

Metoda difúzních testů je založena na aplikaci papírových disků na povrch kultivačního média. Při kultivaci dochází k uvolnění antibiotika (antimikrobiální látky) z disku. Působením uvolněné látky dochází k inhibici bakteriálního růstu a vytvoření zóny (inhibiční zóna) kolem disku. Utvoří-li se kolem disku inhibiční zóna, je bakterie k antimikrobiální látce citlivá. Nedojde-li k utvoření inhibiční zóny, pak je testovaná bakterie vůči látce uvolněné diskem rezistentní (Votava *et al.*, 2010). Dutta *et al.* (2008) při používání této metody pro testování apidaecinu s bakterií *E. coli*, využívají pro aplikaci peptidů uměle vytvořené jamky (velikost 3,5 mm), do kterých je pipetováno 5 μ l peptidu.

Stanovení MIC probíhá v 96 jamkové mikrotitrační destičce, kdy se destička zaplní růstovým médiem a antibiotikem v různých koncentracích (obvykle geometrická koncentrační řada). Po kultivaci se zjišťuje stupeň zakalení média. Zakalené médium značí bakteriální růst, čiré médium značí inhibici bakteriálního růstu. Za MIC se považuje nejnižší hodnota antimikrobiální látky, která je schopna potlačit bakteriální růst (Votava *et al.*, 2010). Berthold *et al.* (2013) používají při testování antimikrobiální aktivity apidaecinu peptid naředěný s médiem v geometrické koncentrační řadě o koncentraci 128 μ g/ml – 0,5 μ g/ml. Výsledný objem testovaný v jedné jamce je 100 μ l (50 μ l peptid + 50 μ l bakteriální suspenze). Hustota bakteriální suspenze je $1,5 \times 10^7$ bakteriálních buněk/ml.

Bíliková *et al.* (2009) testují antimikrobiální aktivitu peptidů měřením růstových křivek bakterií. Testovány byly kmeny *P. larvae* v tekutém MYPGP médiu s přidavkem testovaných AMP, nebo antibiotika tetracyklinu, který byl použit jako kontrola inhibice růstu. Bakteriální růst byl měřen při absorbanci 595 nm.

De Graaf *et al.* (2013) uvádějí jako média vhodná pro testování bakteriálních kmenů *P. larvae* MYPGP agar, J-agar. Bang *et al.* (2010) testují aktivitu peptidů apidaecinu na Luria-Bertani médiu (LB médium).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- Carl Roth: kvasničný extrakt, agar
- Fluka: Mueller Hinton broth, tetracyklin hydrochlorid, trypton
- Penta: hydrogenfosforečnan draselný
- Sigma-Aldrich: glukosa, pyruvát sodný, chlorid sodný, uhličitan sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, trifluoroctová kyselina, acetonitril – MS kvalita

3.1.2 Biologický materiál

Bakteriální kmeny použité pro testování byly součástí sbírky referenčních kmenů Státního veterinárního ústavu Olomouc a byly použity s laskavým svolením MVDr. Jaroslava Bzdila, Ph.D. Veškeré testy s použitím *P. larvae* byly z nálezových důvodů provedeny pod dohledem výše zmíněné osoby v laboratořích SVÚ Olomouc za přísných bezpečnostních opatření.

Testované bakteriální kmeny:

Enterococcus faecium CCM 2308

Escherichia coli NCTC 10538

Escherichia coli CCM 4517

Micrococcus luteus CCM 732

Paenibacillus larvae CCM 4487

Paenibacillus larvae CCM 38

Paenibacillus larvae CCM 39

Paenibacillus larvae CCM 4485

Paenibacillus larvae CCM 4488

Paenibacillus larvae CCM 4486

Paenibacillus larvae CCM 5680

Paenibacillus larvae CCM 4483

Paenibacillus larvae CCM 4484

Pseudomonas aeruginosa CCM 1961

Staphylococcus aureus CCM 4516

3.1.3 **Přístroje a vybavení**

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Densitometr DEN-1 (Biosan, Lotyšsko)

Digitální fotoaparát (SONY, Japonsko)

Digitální pH metr MV-87 (Practitronic, Německo)

Digitální předvážky (Radwag®, ČR)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, ČR)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Inkubátor EN 120 (Nüve, Turecko)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)

Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonics, Německo)

Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)

Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR)

Vortex (Stuart, UK)

3.1.4 **Synteticky připravené antimikrobiální peptidy**

Peptidy apidaecin Ia, abaecin, jellein I a jellein II byly připraveny chemickou syntézou firmou CloneStar Peptide Services (Brno).

3.1.5 **Použité roztoky a média**

- Fyziologický roztok: 0,9% NaCl s 1% glukosou
- K-fosfátový pufr pH 7,2: 26 g/l KH_2PO_4 , 7,2 g/l Na_2CO_3
- J-agar: 5 g/l trypton, 15 g/l kvasničný extrakt, 3 g/l K_2HPO_4 , 20 g/l agar (pevné médium)
- Columbia krevní agar (komerční médium): 23 g/l pepton, 1 g/l škrob, 5 g/l NaCl, 15g /l agar (pevné médium)
- LB médium: 10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl
- MYPGP agar: 10 g/l Mueller Hinton broth, 15 g/l kvasničný extrakt, 3 g/l K_2HPO_4 , 1g/l pyruvát sodný, 20 g/l agar (pevné médium)

Do každého připravovaného média bylo po autoklávování přidáno 20 ml/l 10% glukosy.

Pevná média byla nalévána do Petriho misek s průměrem 9 mm do výšky 4 mm.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava zásobních roztoků peptidů

Chemicky nasyntetizované peptidy byly rozpuštěny v 0,1% trifluoroctové kyselině (TFA) na výslednou koncentraci 10 mM. Každý z peptidů byl rozpuštěn v příslušném objemu TFA (3,9 mg apidaecinu IA v 185,10 μ l 0,1% TFA; 2,2 mg abaecinu v 56,76 μ l 0,1% TFA; 2,1 mg jelleinu I v 220,23 μ l 0,1% TFA; 3,7 mg jelleinu II v 350,84 μ l 0,1% TFA). Zásobní roztoky peptidů byly skladovány při -80°C.

3.2.2 Ověření přítomnosti chemicky nasyntetizovaných peptidů pomocí MALDI-TOF

Pro ověření chemicky nasyntetizovaných peptidů byl připraven 10 μ M roztok každého testovaného peptidu (zásobní roztok naředěn s 0,1% TFA). Vzorky byly nanесeny na MALDI destičku a podrobeny analýze na přístroji Microflex LRF20 MALDI-TOF.

3.2.2.1 Detekce peptidů pomocí MALDI-TOF

Analýza vzorků byla provedena na přístroji Microflex LRF20 MALDI-TOF (iontový zdroj microScout, dusíkový laser 337 nm). Na hmotnostním spektrometru Microflex byla na reflektroновém módu naměřena pozitivní hmotnostní spektra peptidů. Bylo použito akcelerační napětí 19 kV a extrakční napětí 16,1 kV. Napětí čočky bylo 9,1 kV, napětí reflektronu 20 kV. Prodloužená extrakce trvala 250 ns (Daníhlík, 2008a).

Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová byla použita jako matrice. Pro rozpuštění 2 mg kyseliny bylo použito 0,33 ml 2,5 % TFA a 0,66 ml acetonitrilu (AcN). Při správném uchování (laboratorní teplota, uzavřená nádoba) je matrice stabilní po dobu několika měsíců (Thomas, 2004).

Pro samotnou aplikaci na destičku bylo použito 0,5 μ l vzorku s 0,5 μ l roztoku matrice. Krystalizace proběhla spontánním vysušením na vzduchu („metoda vysušené kapky“) (Thomas, 2004). Pro analýzu naměřených spekter byl použit program flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics). Naměřená spektra byla porovnána s molekulovou hmotností peptidů.

3.2.3 Stanovení závislosti absorbance na McFarlandově stupnici

Murray a Arronstein (2008) uvádějí, že hodnota absorbance 0,3 měřena při vlnové délce 600 nm odpovídá množství bakteriálních buněk 2×10^7 CFU/ml. Votava *et al.* (2010) při popisu mikrobiologických metod používají stupnici McFarland a uvádějí, že hodnota

0,5 McFarland odpovídá 1×10^6 CFU/ml. Pro vzájemnou převoditelnost stupnic byla vytvořena kalibrační křivka závislosti absorbance na McFarlandově stupnici.

Bakteriální suspenze o určité optické hustotě, byla vždy proměřena na spektrofotometru pro zjištění přesné hodnoty absorbance (OD_{600}) a na densitometru pro zjištění přesné hodnoty McFarland. Tyto hodnoty byly poté vneseny do grafu a byla vytvořena kalibrační křivka závislosti absorbance na McFarlandově stupnici.

3.2.4 Očkování média vyšetřovaným bakteriálním kmenem

Z bakteriálního kmene byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku s hustotou 0,5 McFarland (Votava *et al.*, 2010). Tato suspenze byla pomocí vatové tyčinky naočkována ve třech různých směrech (pod úhlem asi 60°) na pevné médium. Po zaschnutí bakteriální suspenze byly na médium aplikovány antimikrobiální peptidy.

3.2.5 Testování pomocí difuzních testů

Na pevné kultivační médium v Petriho misce, které bylo naočkováno bakteriálním kmenem, byly aplikovány AMP. Peptidy byly rozpouštěny v 0,1% TFA; 0,01 M K-fosfátovém pufru pH 7,2; nebo tekutém kultivačním médiu. Peptidy byly aplikovány v koncentracích 4000 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, či 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pro aplikaci peptidů na kultivační médium byly použity tři způsoby. Po aplikaci peptidů byly misky vloženy dnem vzůru do inkubátoru (37°C). Inkubace probíhala po dobu 48 hodin (bakteriální kmeny *P. larvae*), nebo po dobu 24 hodin (ostatní bakterie).

3.2.5.1 Aplikace AMP v podobě papírových disků

Na papírové disky (průměr 5 mm) bylo naneseo 10 μl , 5 μl , 2 μl a 1 μl peptidu (koncentrace peptidu 1000 $\mu\text{g/ml}$). Tyto disky byly pomocí očkovačí jehly aplikovány na povrch naočkované půdy (Votava *et al.*, 2010).

3.2.5.2 Aplikace AMP do vykrojených jamek v médiu

Do pevného kultivačního média byly vykrojeny jamky (průměr 3 mm). Na médium byl poté naočkován bakteriální kmen. 5 μl roztoku peptidu bylo pipetováno do vykrojené jamky (Dutta *et al.*, 2008).

3.2.5.3 Aplikace AMP přímo na misku

Na vyznačená místa bylo nanášeno 5 μl peptidu přímo na povrch naočkovaného pevného média. Po vstřebání peptidů do média (zaschnutí povrchu média) (10 min) byly misky vloženy do inkubátoru.

Po ukončení kultivace byly u pozitivních výsledků změřeny průměry inhibičních zón. Z každé inhibiční zóny byl proveden stěr. Tento stěr byl rozkultivován na miskou s pevným kultivačním médiem pro zjištění baktericidního či bakteriostatického účinku peptidu.

3.2.6 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byla použita 96 jamková mikrotitrační destička. Do jedné jamky z destičky bylo vždy napipetováno 50 μ l peptidu a 50 μ l suspenze bakteriální kultury (optická hustota 0,5 McFarland). Peptidy byly naředěny s tekutým kultivačním médiem (MYPGP agar, J-agar, LB médium). Byla vytvořena geometrická koncentrační řada peptidů s koncentracemi 50 μ g/ml – 0,359 g/ml. Pozitivní kontrola byla připravena z 50 μ l čistého tekutého média bez přídavku peptidů nebo antibiotik a 50 μ l suspenze bakteriální kultury. Slepý vzorek obsahoval 50 μ l tekutého média a 50 μ l fyziologického roztoku. Takto připravená mikrotitrační destička byla aerobně kultivována po dobu 48 hodin (bakteriální kmeny *P. larvae*), nebo po dobu 24 hodin (ostatní bakterie) při teplotě 37°C. Po kultivaci byla odečítána MIC, dle stupně zakalení média.

3.2.7 Stanovení růstové křivky bakterií

Růstová křivka bakterií se stanovuje měřením optické hustoty bakteriální suspenze v průběhu kultivace. Měření růstových křivek proběhlo u peptidů, které prokázaly antimikrobiální aktivitu při difúzních testech. Toto měření probíhalo v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Příprava destičky byla stejná jako u stanovení MIC (kapitola 3.2.6). Byla vytvořena geometrická koncentrační řada peptidů o koncentracích 100 μ g/ml – 1,562 μ g/ml. Pozitivní kontrola byla připravena z 50 μ l čistého tekutého média a 50 μ l suspenze bakteriální kultury. 50 μ l kultivačního média společně s 50 μ l fyziologického roztoku bylo použito jako blank. Byla také zjišťována rezistence bakterií na antibiotikum tetracyklin (TTC), které bylo testováno v koncentraci 100 μ M a bylo použito jako negativní kontrola. Tuto kontrolu tvořilo 50 μ l roztoku TTC v kultivačním médiu a 50 μ l bakteriální suspenze. Antimikrobiální aktivita peptidů byla testována v MYPGP, J-agaru a LB médiu.

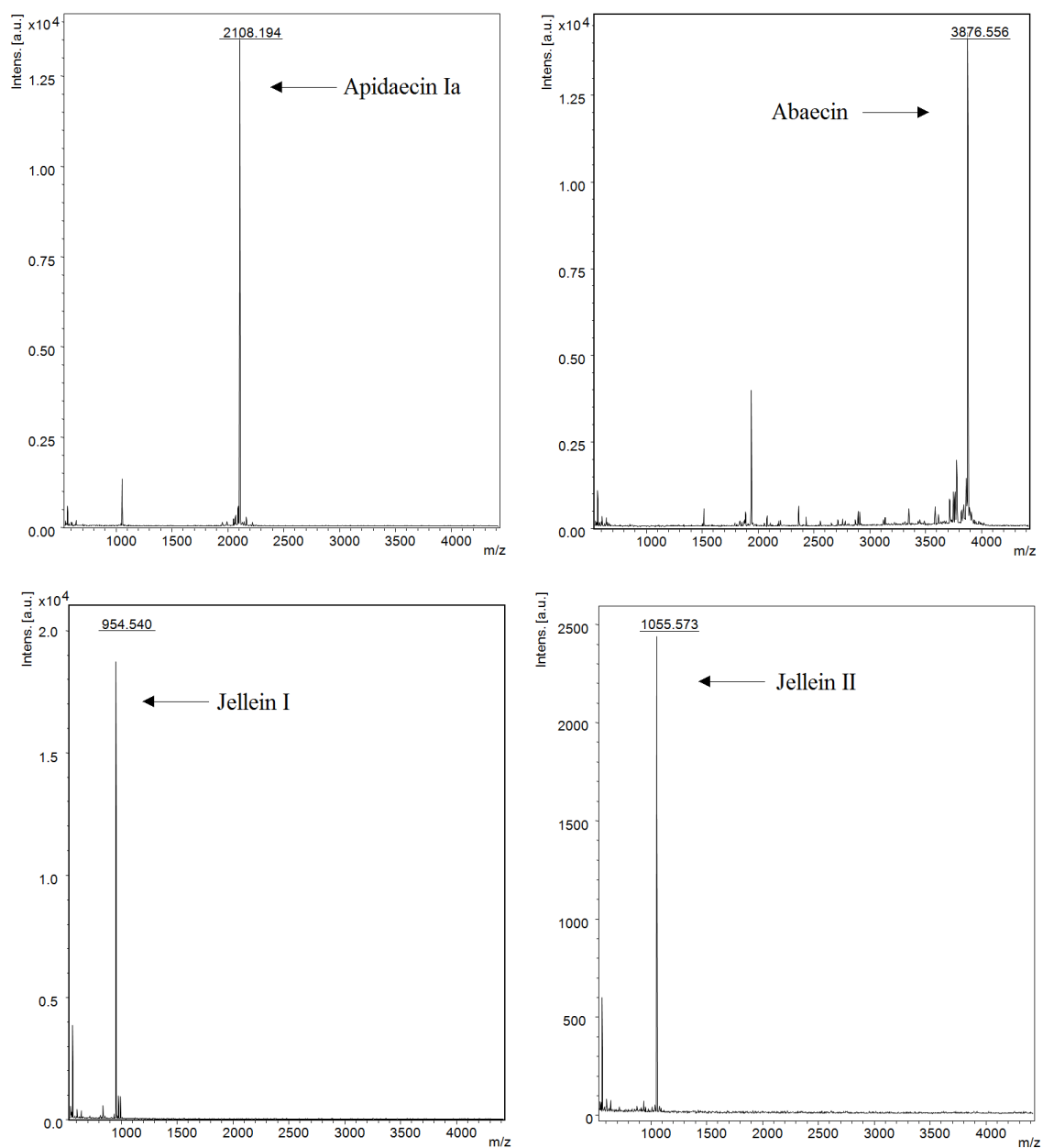
Optická hustota (optical density, OD) byla měřena po dobu 6-8 hodin při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Aerobní kultivace probíhala při teplotě 37 °C. Naměřené hodnoty byly graficky vyhodnoceny v programu Microsoft Office Excel 2007.

Byla testována také několikahodinová inkubace peptidů s bakterií za změněných růstových podmínek. Peptidy byly inkubovány s bakterií přes noc (16-18 hodin) při teplotě 4°C. Následně byla opět stanovována růstová křivka bakterií po dobu 6-8 hodin při OD₆₀₀ a teplotě 37 °C.

4 Výsledky a diskuze

4.1.1 Ověření přítomnosti chemicky nasyntetizovaných peptidů pomocí MALDI-TOF

Naměřené hodnoty molekulové hmotnosti odpovídaly teoretickým molekulovým hmotnostem testovaných peptidů. Chemicky syntetizované peptidy tedy odpovídají přírodním analogům (Obr. 8).



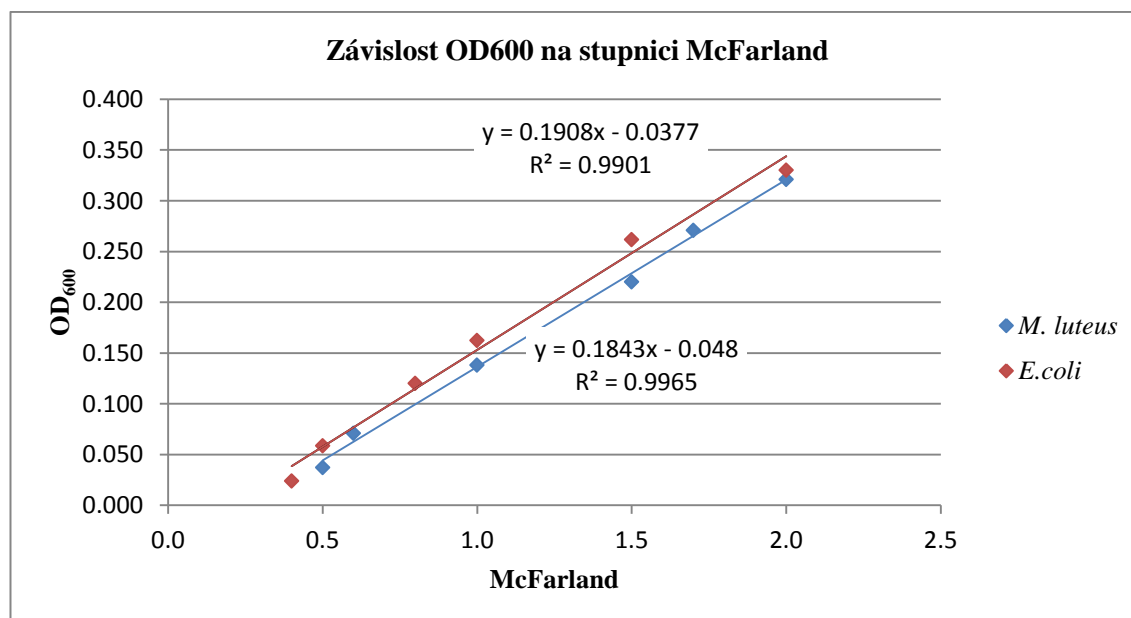
Obr. 8: Hmotnostní spektra apidaecinu Ia, abaecinu, jelleinu I a jelleinu II.

4.1.2 Kalibrační křivka závislosti absorpance na McFarlandově stupnici

Byla vytvořena kalibrační křivka pro bakterii *E. coli* NCTC 10538 a *M. luteus* CCM 732 pro zjištění závislosti OD₆₀₀ na McFarlandově stupnici (Obr. 9). Z kalibrační křivky je patrné, že stupnice McFarland a absorpance jsou na sobě lineárně závislé. Měření růstu mikroorganismů v tekutém médiu lze tedy provádět jak na spektrofotometru (měření OD₆₀₀), tak i na densitometru (McFarlandova stupnice) a naměřené hodnoty převádět mezi jednotlivými stupnicemi.

4.1.3 Růst bakteriálních kmenů na různých médiích

V průběhu testování byla vyzkoušena různá média pro kultivaci bakterií. Bakteriální kmeny *E. coli* vykazují dobrý růst na každém z testovaných médií (MYPGP agar, J-agar, LB médium), stejně tak jako bakterie *M. luteus*. De Graaf *et al.* (2013) uvádějí jako vhodná média pro růst *P. larvae* MYPGP agar a J-agar. Při testování se však ukázalo, že na J-agaru kmeny *P. larvae* vykazují příliš pomalý růst, a navíc, kmeny *P. larvae* CCM 38 a CCM 39 nerostou na J-agaru vůbec. Dobrý růst vykazují všechny testované kmeny *P. larvae* na MYPGP agaru a pevném i tekutém LB médiu.



Obr. č. 9: Kalibrační křivka závislosti OD₆₀₀ na stupnici McFarland.

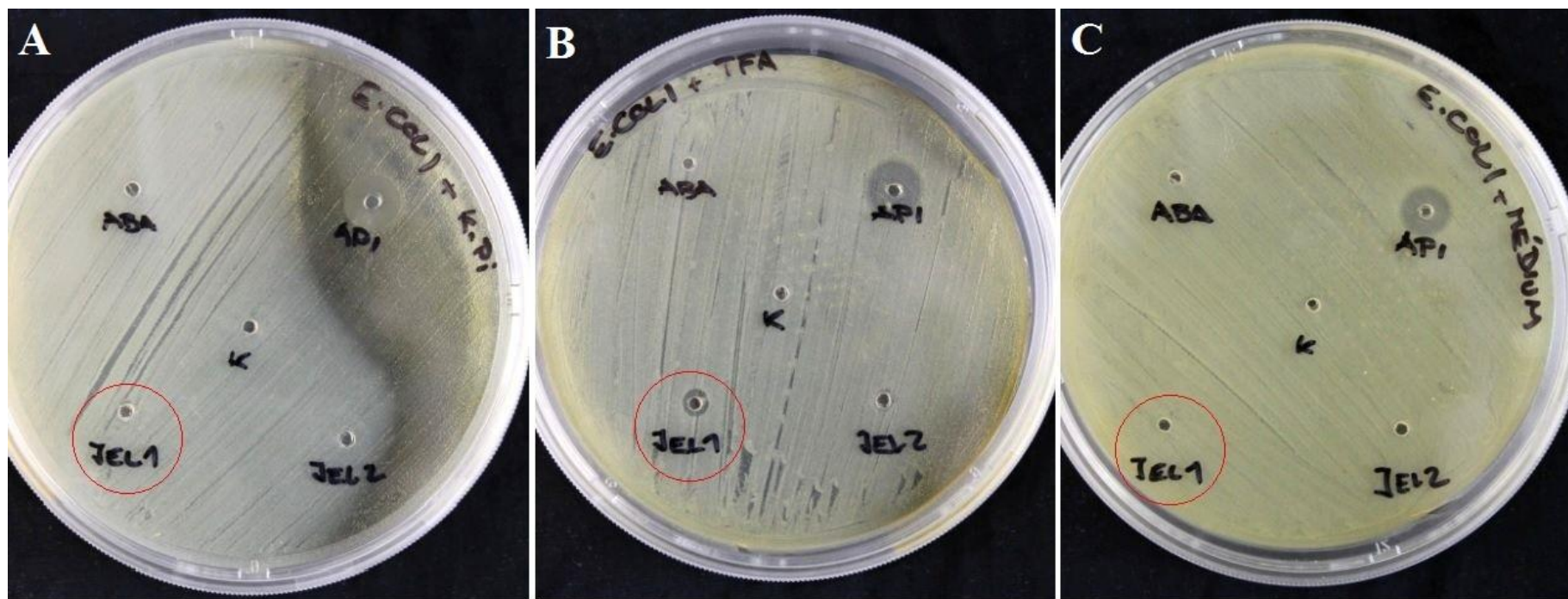
4.1.4 Vliv rozpouštědla na antimikrobiální aktivitu peptidů

Některé kationické peptidy (např. apidaeciny), které obsahují ve své primární sekvenci arginin, mají silnou afinitu k povrchům – sklo, plast (Foettinger *et al.*, 2006), a proto bylo nutné najít vhodné rozpouštědlo k rozpouštění peptidů a zabránění ztrátám peptidů během práce. Lele *et al.* (2013) používá milliQ vodu, Bang *et al.* (2010) rozpouští peptidy 1% baktepeptonovém médiu, Casteels *et al.* (1994) používají 0,15 M K-fosfátový pufr pH 7,2.

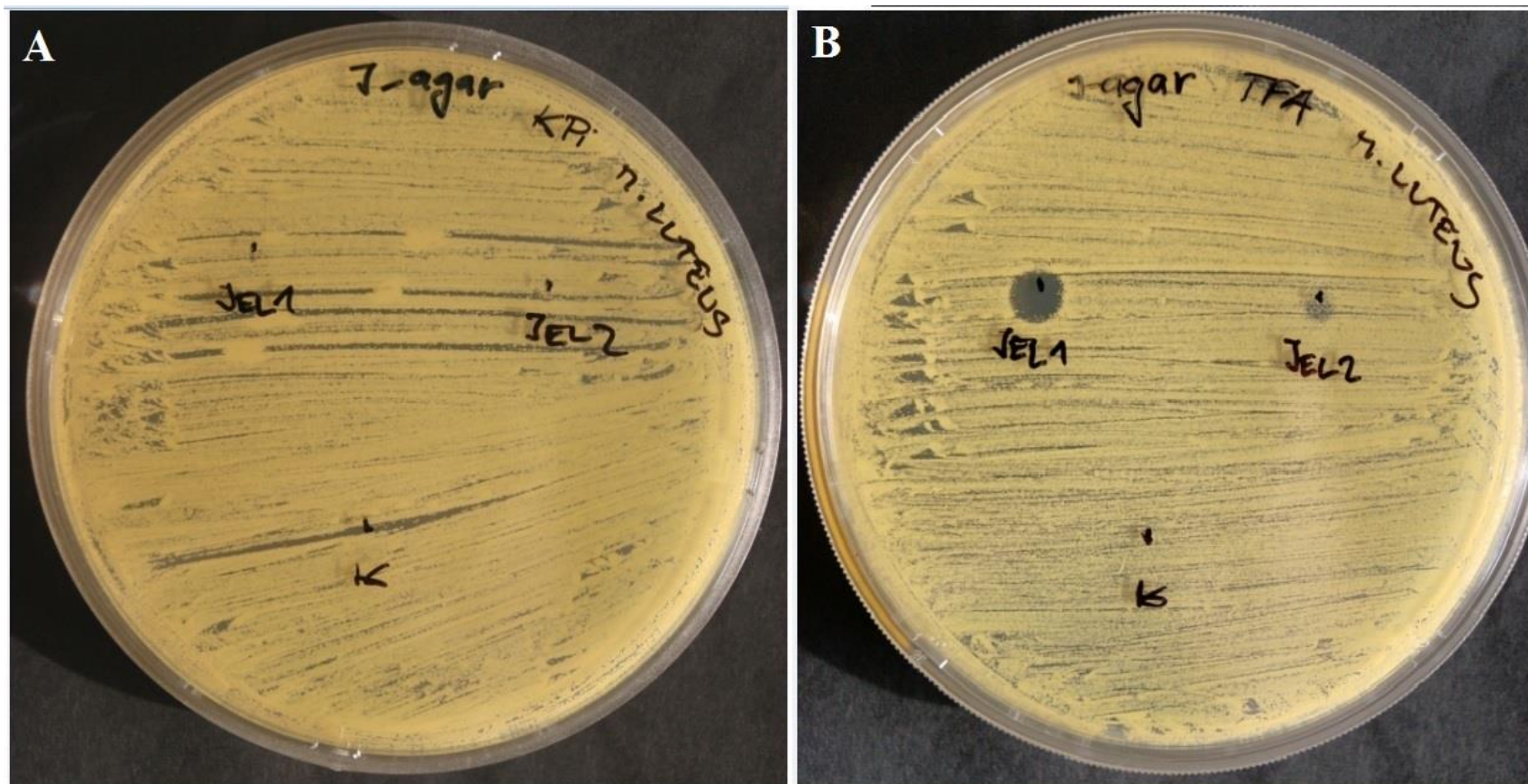
Po otestování rozpouštění peptidu v 0,1% TFA, 0,01M K-fosfátového pufru pH 7,2 a přímo v médiu bylo zjištěno, že jelleiny I a II se v tekutém MYPGP agaru srážejí, což vede k nereprodukovatelným výsledkům. U apidaecinu 1a a abaecinu nebyla tvorba precipitátu pozorována. Pro testování těchto peptidů v tekutém médiu bylo použito pouze LB médium a J-agar. Rozpouštění jelleinů v 0,01M K-fosfátovém pufru pH 7,2 mělo také vliv na jejich antimikrobiální aktivitu. U jelleinů rozpouštěných v K-fosfátovém pufru pH 7,2 nedošlo k vytvoření inhibičních zón, na rozdíl od jelleinů, které byly rozpouštěny v 0,1% TFA (Obr. 10). Velikost vytvořené zóny u apidaecinu Ia se nelišila v závislosti na použitém médiu (12 mm zóna) (Obr. 11). Rozpouštění peptidů v tekutém médiu nemělo u apidaecinu Ia žádný vliv na antimikrobiální aktivitu na rozdíl od jelleinu I, který vytvořil 1 mm zóny při rozpouštění v 0,1% TFA. Jelikož ale dochází ke srážení jelleinu I s tekutým MYPGP médiem, je možné, že i v pevném MYPGP médiu bude vytvářet nespecifické agregáty, které povedou k problematicky reprodukovatelným výsledkům.

Nejvhodnějším rozpouštědlem pro testování formou difúzních testů je 0,1% TFA. Samotná rozpouštědla (0,1% TFA, 0,01M K-fosfátovém pufru pH 7,2), použitá jako kontrola, nevykazují žádný vliv na růst bakterií na médiu.

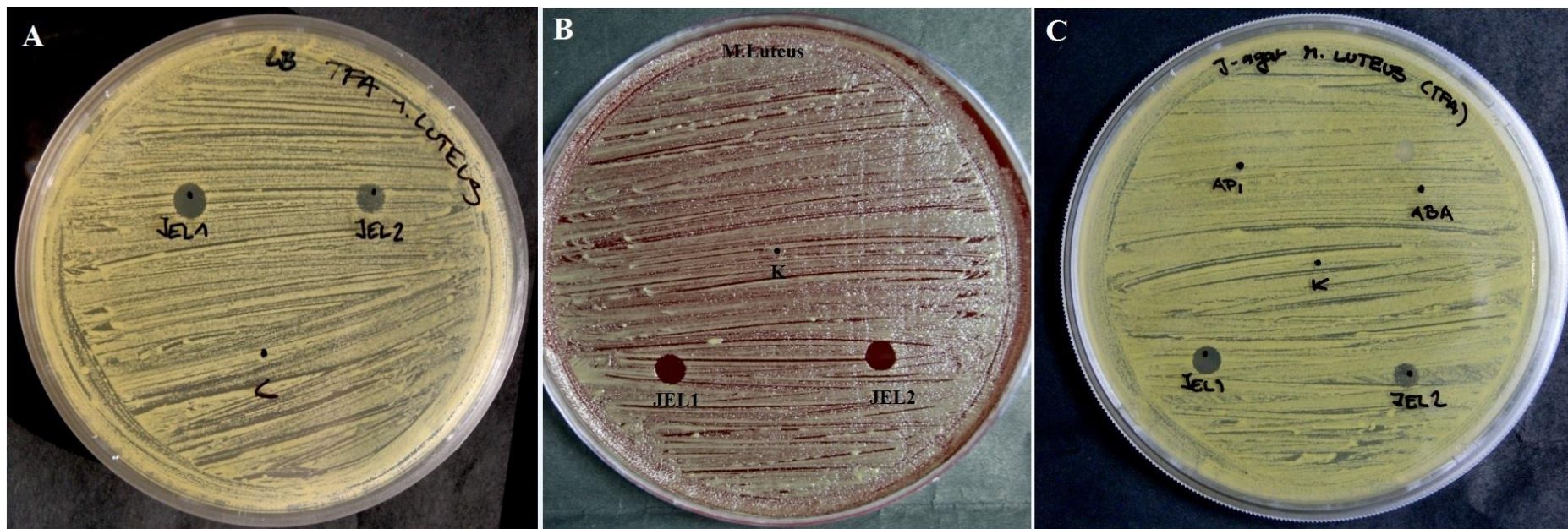
Peptidy jellein I a jellein II rozpouštěné v 0,1% TFA byly testovány proti bakterii *M. luteus* na LB médiu, krevním agaru a J-agaru. Na všech třech médiích byla vytvořena stejná velikost inhibiční zóny (5 mm) (Obr. 12), takže jelleiny I a II je možno testovat na těchto třech médiích s podobným nebo stejným výsledkem antimikrobiální aktivity, což lze následně využít pro kultivace *P. larvae*, který problematicky roste na J-agaru. Lze jej tedy kultivovat i na LB médiu nebo krevním agaru.



Obr. 11: Rozdíly při použití různých rozpouštědel peptidů na kultuře *E. coli* NCTC 10538 pěstované na MYPGP médiu. A - peptidy rozpuštěny v 0,01M K-fosfátovém pufru pH 7,2. B - peptidy rozpuštěny v 0,1% TFA. C - peptidy rozpuštěny v tekutém MYPGP médiu. Testované peptidy byly pipetovány do vykrojených jamek. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 5 μ l peptidu o koncentraci 2000 μ g/ml, což odpovídá množství 10 μ g.



Obr. 10: Rozdíly v antimikrobiální aktivitě jelleinu I a II při použití různých rozpouštědel peptidů na kultuře *M. luteus* CCM 732 pěstované na J-agaru. Koncentrace peptidů byla 2000 $\mu\text{g/ml}$. A – peptidy rozpuštěny 0,01M K-fosfátovým pufru pH 7,2. B – peptidy rozpuštěny v 0,1% TFA. Peptidy byly napipetovány přímo na povrch naočkované plotny. Na jednotlivé pozice bylo pipetováno 5 μl peptidu, což odpovídá množství 10 μg .

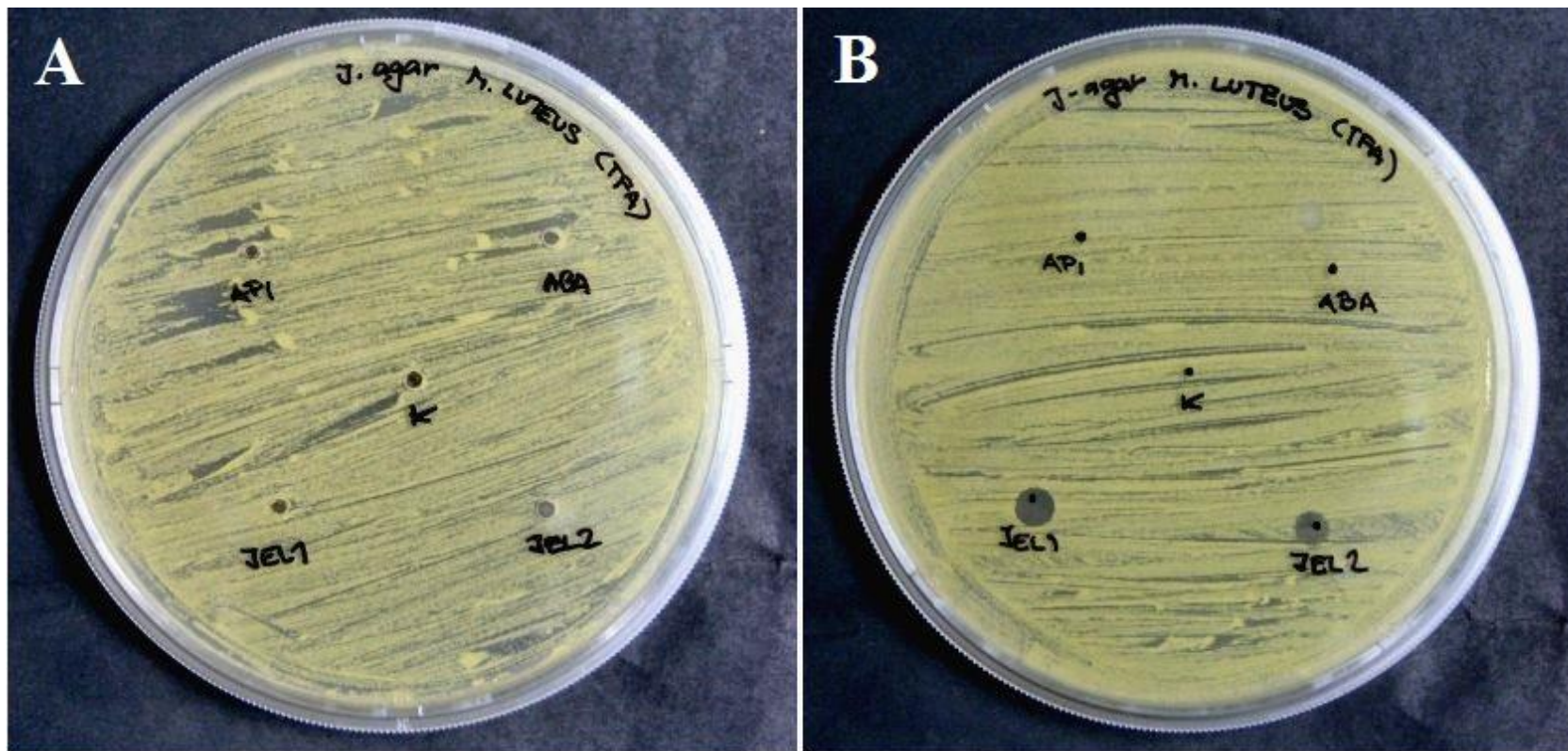


Obr. 12: Stejná velikost inhibičních zón při testování peptidů jelleinu I a jelleinu II na různých typech médií. Peptidy testovány s kulturou *M. luteus* CCM 732. Jako rozpouštědlo peptidů použita 0,1% TFA. Koncentrace peptidů byla 4000 $\mu\text{g/ml}$ (B, C) a 2000 $\mu\text{g/ml}$ (A). A – testování na LB médiu. B – testování na krevním agaru. C – testování na J-agaru. Testované peptidy byly pipetovány přímo na povrch naočkované plotny. Na jednotlivé pozice bylo pipetováno 5 μl peptidu, což odpovídá množství 20 μg (4000 $\mu\text{g/ml}$) a 10 μg (2000 $\mu\text{g/ml}$).

4.1.5 Difúzní testy

Aplikace peptidů na plotny pomocí papírových disků (viz kapitola 3.2.5.1) se ukázala být pro testování pomocí difúzních testů nevhodná. Apidaecin Ia, jelleiny I a II ani abaecin nevykazovaly antimikrobiální aktivitu na rozdíl od aplikace peptidů přímo na plotnu (viz kapitola 3.2.5.3), kde apidaecin Ia působil antimikrobiálně vůči kmenům *E. coli* a jelleiny I a II proti *M. luteus* a některým kmenům *P. larvae*. Při aplikaci peptidů do vykrojených jamek (viz kapitola 3.2.5.2) byly pozorovány inhibiční zóny u peptidů apidaecinu Ia, jelleinu I a jelleinu II. Tyto zóny byly méně zřetelné a u některých peptidů menší, než při aplikaci peptidů přímo na plotnu (Obr. 13). Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny podtékáním peptidů aplikovaných do jamek pod vrstvu kultivačního média, takže peptid nepůsobí na povrchu média, kde rostou bakterie. Po aplikaci peptidů nejspíše nedochází k uvolnění peptidů do média, a tak se nemůže projevit jejich antimikrobiální účinek. Difúze peptidu v objemu média a na jeho povrchu je důležitá pro vytvoření zóny kolem naneseného peptidu (Votava *et al.*, 2010).

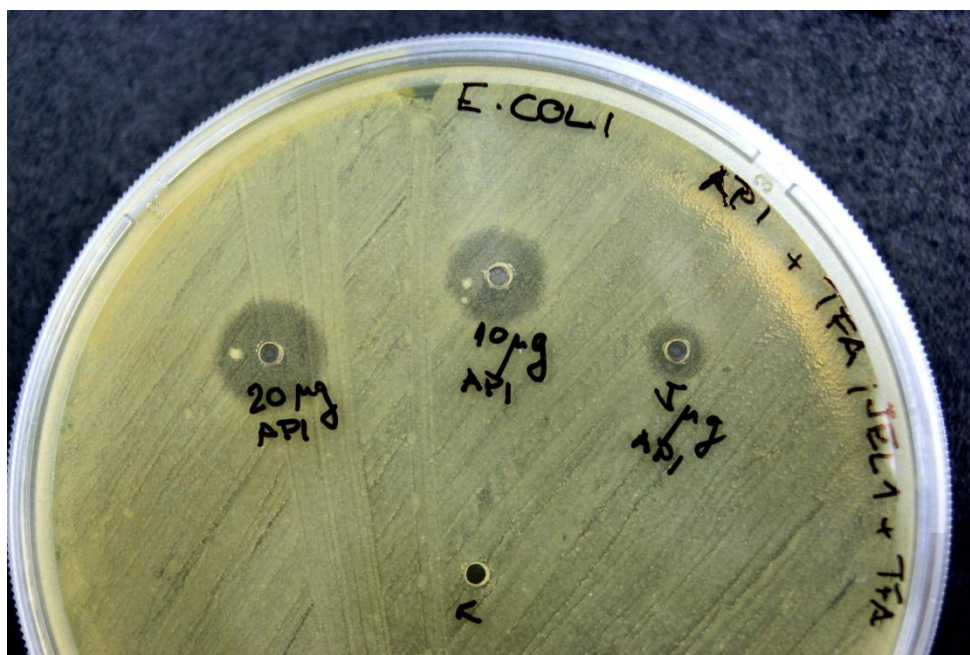
Difúzní testy provedené aplikací rozpuštěných peptidů v 0,1% TFA přímo na plotnu zaočkovanou testovaným mikroorganismem byly následně použity u všech antimikrobiálních peptidů.



Obr. 13: Rozdíly v aktivitě peptidů proti *M. luteus* při použití různých způsobů aplikace peptidů na misku s J-agarem. Všechny testované peptidy měly stejnou koncentraci (4000 $\mu\text{g/ml}$) a byly rozpuštěny v 0,1% TFA. Na jednotlivé pozice bylo pipetováno 5 μl peptidu, což odpovídá množství 20 μg . A - peptidy pipetovány do vykrojených jamek. B - peptidy aplikovány přímo na povrch média.

4.1.5.1 Difúzní testy apidaecinu Ia

Tabulka č. 4 uvádí velikosti inhibičních zón apidaecinu Ia na testované bakterie. Z výsledků je patrné, že k apidaecinu Ia jsou citlivé pouze kmeny *E. coli* NCTC 10538 a CCM 4517. Obdobné výsledky uvádí i Casteels *et al.* (1989), který uvádí, že G- bakterie jsou k apidaecinům citlivější než G+ bakterie. U kmene *E. coli* NCTC 10538 lze také pozorovat změnu velikosti inhibiční zóny v závislosti na koncentraci apidaecinu Ia. Velikost zóny se zvyšuje úměrně s koncentrací peptidu (Obr. 14). Při nejvyšší koncentraci peptidu (4000 $\mu\text{g/ml}$) lze pozorovat 12 mm zónu, při koncentraci peptidu 2000 $\mu\text{g/ml}$ je viditelná zóna 9 mm a při nejnižší koncentraci peptidu (1000 $\mu\text{g/ml}$) lze pozorovat také nejmenší zónu (6 mm). Další testovaná bakterie *P. aeruginosa* je sice také G-, avšak je považována za velmi rezistentní bakterii vůči velkému spektru antimikrobiálních látek (Youenou *et al.*, 2014). Kmeny *P. larvae* i *M. luteus* jsou k apidaecinu Ia rezistentní.



Obr. 14: Změna velikosti inhibiční zóny v závislosti na koncentraci peptidu. Peptidy byly rozpuštěny v 0,1% TFA a aplikovány v objemu 5 μl do vykrojených jamek. A – koncentrace apidaecinu Ia 4000 $\mu\text{g/ml}$ (20 μg na spotu). B – koncentrace apidaecinu Ia 2000 $\mu\text{g/ml}$ (10 μg na spotu). C – koncentrace apidaecinu Ia 1000 $\mu\text{g/ml}$ (5 μg na spotu).

4.1.5.2 Difúzní testy abaecinu

Na rozdíl od výsledků Casteelse *et al.*, (1990) nebyla u peptidu abaecinu pozorována žádná antimikrobiální aktivita k žádným z testovaných mikroorganismů. Avšak Casteels *et al.* (1990) použil k testování odlišné médium (masopeptonový bujón) na rozdíl od námi používaných médií. Citlivost bakterií k abaecinu byla testována na MYPGP médiu i na J- agaru. Citlivost kmenů *P. larvae* k abaecinu byla navíc testována na LB médiu, avšak ani v tomto kultivačním médiu se neprokázal antimikrobiální účinek peptidu.

4.1.5.3 Difúzní testy jelleinů

Fontana *et al.* (2004) uvádějí, že jelleiny jsou aktivní vůči G+ i G- bakteriím. To potvrzují také výsledky difúzních testů. Jellein I vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči G+ bakteriím *E. faecium*, *M. luteus* a *P. larvae* a G- bakteriím *E. coli* a *P. aeruginosa* (Tab. 5). Jellein II je aktivní vůči G+ bakteriím *M. luteus* a *P. larvae*. Slabou aktivitu vykazuje také vůči G- bakterii *E. coli*, se kterou tento peptid vytváří málo zřetelné zóny s menším bakteriálním růstem (Tab. 6). Tyto výsledky také potvrzují rozdílnou aktivitu různých isoform jelleinů (Fontana *et al.*, 2004). Aktivita jelleinů je také velmi ovlivněna používaným rozpouštědlem. Jsou patrné rozdíly v antimikrobiálním účinku jelleinu I proti *M. luteus* v závislosti na použitém rozpouštědle peptidu a také médiu. Jellein I rozpuštěný v 0,1% TFA vytvořil 7 mm zónu v LB médiu, naopak na MYPGP médiu nevytvořil žádnou zónu, ačkoliv byl rozpuštěn v tomtéž rozpouštědle. Jellein I neudělal žádnou inhibiční zónu na LB médiu při rozpuštění v 0,01M K-fosfátovém pufru pH 7,2. Podobně se měnil i antimikrobiální účinek jelleinu II (tab. 7), který na LB médiu vytvořil jen 5 mm zónu proti *M. luteus*.

Tab. 4: Inhibiční zóny apidaecinu Ia s testovanými bakteriálními kmeny (pro K-fosfátový pufr pH 7,2 je z důvodu přehlednosti zavedena zkratka K-Pi).

Bakterie	Číslo kmene	Rozpouštědlo	Médium	Koncentrace peptidu	Výsledné množství peptidu na spotu	Délka inhibiční zóny
<i>S. aureus</i>	CCM 4516	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E. faecium</i>	CCM 2308	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>P. aeruginosa</i>	CCM 1961	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	6 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	9 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	4000 µg/ml	20 µg	12 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	13 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	12 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	LB médium	2000 µg/ml	10 µg	12 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E. coli</i>	CCM 4517	0,1% TFA	LB médium	2000 µg/ml	10 µg	10 mm

Tab. 5: Inhibiční zóny jelleinu I s *M. luteus*, *E. coli* a bakteriálními kmeny *P. larvae*.

Bakterie	Číslo kmene	Rozpouštědlo	Médium	Koncentrace peptidu	Výsledné množství peptidu na spotu	Délka inhibiční zóny
<i>S. aureus</i>	CCM 4516	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E. faecium</i>	CCM 2308	MYPGP	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E. faecium</i>	CCM 2308	K-Pi	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	4 mm
<i>E. faecium</i>	CCM 2308	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>P. aeruginosa</i>	CCM 1961	MYPGP, TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>P. aeruginosa</i>	CCM 1961	K-Pi	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	4 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	4 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	5 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	4 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	5 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	5 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	K-Pi	J-agar	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	LB	2000 µg/ml	10 µg	7 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	K-Pi	LB	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 4487	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	5 mm
<i>P. larvae</i>	CCM 4487	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	7 mm
<i>P. larvae</i>	CCM 4484	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 4484	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 38	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 38	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna

Tab. 6: Inhibiční zóny jelleinu II s testovanými mikroorganismy.

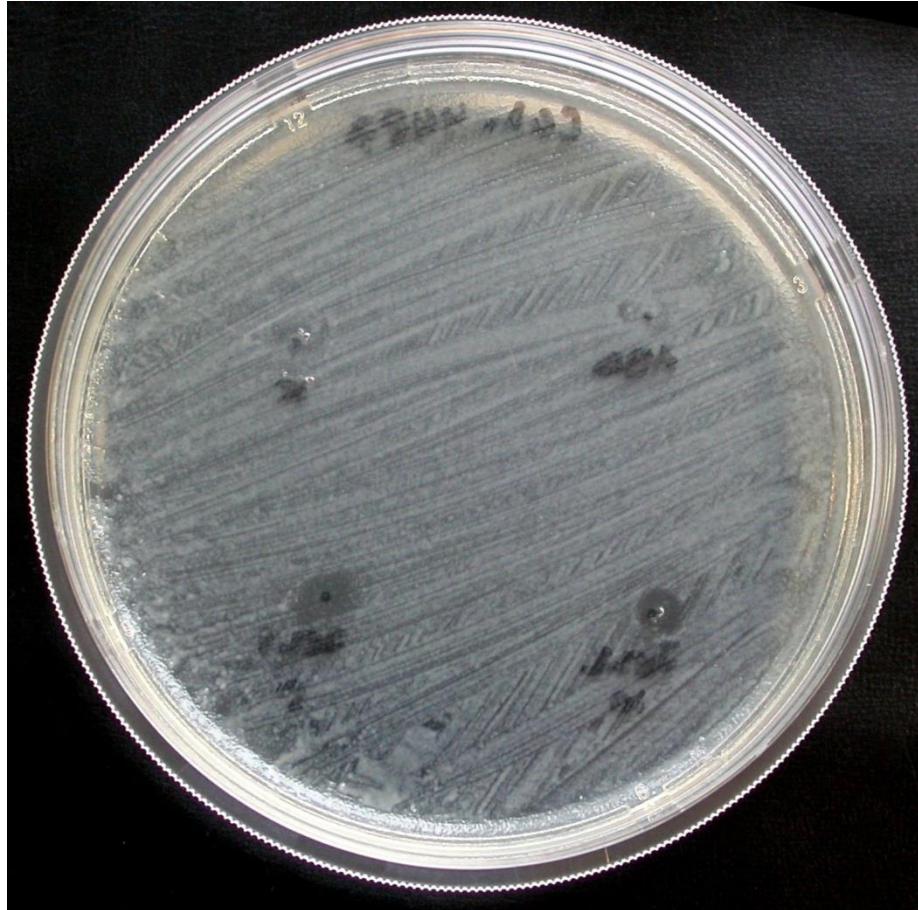
Bakterie	Číslo kmene	Rozpouštědlo	Médium	Koncentrace peptidu	Výsledné množství peptidu na spotu	Délka inhibiční zóny
<i>S. aureus</i>	CCM 4516	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E. faecium</i>	CCM 2308	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>P. aeruginosa</i>	CCM 1961	MYPGP, K-Pi, 0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	4 mm
<i>E.coli</i>	NCTC 10538	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	MYPGP	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	4,5 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	4 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	K-Pi	J-agar	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>M. luteus</i>	CCM 732	0,1% TFA	LB	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>M. luteus</i>	CCM 732	K-Pi	LB	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 4487	0,1% TFA	krevní agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna
<i>P. larvae</i>	CCM 4487	0,1% TFA	J-agar	4000 µg/ml	20 µg	žádná zóna

4.1.5.4 Antimikrobiální aktivita peptidů proti kmenům *P. larvae*

Na základě výsledků difúzních testů bylo zjištěno, že apidaecin Ia ani abaecin nemá antimikrobiální aktivitu proti různým kmenům *P. larvae*. Casteels *et al.* (1989) uvádějí, že MIC pro apidaeciny je pro bakterii *B. alvei* (NRRL-B-237) větší než 200 µg/ml, avšak v publikaci Casteels *et al.* (1990) se uvádí MIC apidaecinu Ia pro *B. alvei* (LMG 6322) 50 – 100 µg/ml. Jedná se ovšem o jiný kmen *B. alvei*, než je uveden v publikaci Casteels *et al.* (1989). MIC však není stanovena přímo pro některý z kmenů *P. larvae*.

Jako vhodné médium bylo ověřeno LB médium, na němž rostly všechny kmeny *P. larvae*. Difúzní testy jelleinu II provedené s jednotlivými kmeny *P. larvae* na LB médiu shrnuje tabulka č. 7. S jelleinem I bylo provedeno testování s bakteriálním kmenem *P. larvae* CCM 4487, kde byla vytvořena 5 mm zóna. Citlivost dalších kmenů *P. larvae* k jelleinu I zatím nebyla stanovována.

Koncentrační závislost velikosti inhibiční zóny a množství naneseného peptidu nebyla pozorována (Obr. 15). Obdobně jako u *M. luteus* se liší antimikrobiální aktivita jelleinu I a jelleinu II v závislosti na použitém médiu. Kmen *P. larvae* CCM 4487 vytvořil s jelleinem I 5 mm zónu v případě kultivace na LB médiu (tab. 7), podobná je i zóna při kultivaci na J-agaru nebo krevním médiu (tab. 5). Naopak jellein II projevuje svou antimikrobiální aktivitu proti kmenu *P. larvae* CCM 4487 kultivovaném na LB médiu (tab. 7), avšak na J-agaru nebo krevním agaru je jeho účinek nulový (tab. 6).



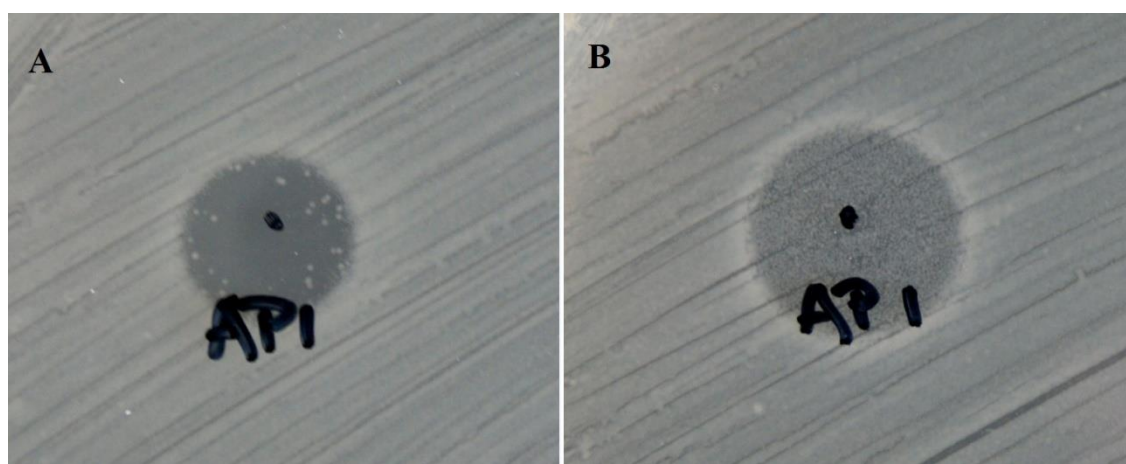
Obr. 15: Difúzní test peptidu jelleinu II s bakteriálním kmenem *P. larvae* CCM 4487 na LB médiu. Jellein II byl aplikován ve dvou koncentracích (2000 $\mu\text{g/ml}$; 1000 $\mu\text{g/ml}$). Peptidy byly aplikovány v objemu 5 μl . Množství testovaného peptidu na misce bylo 10 μg a 5 μg .

Tab. 7: Inhibiční zóny jelleinu II na kulturách kmenů *P. larvae* narostlých na LB médiu. Peptidy byly rozpuštěny v 0,1% TFA.

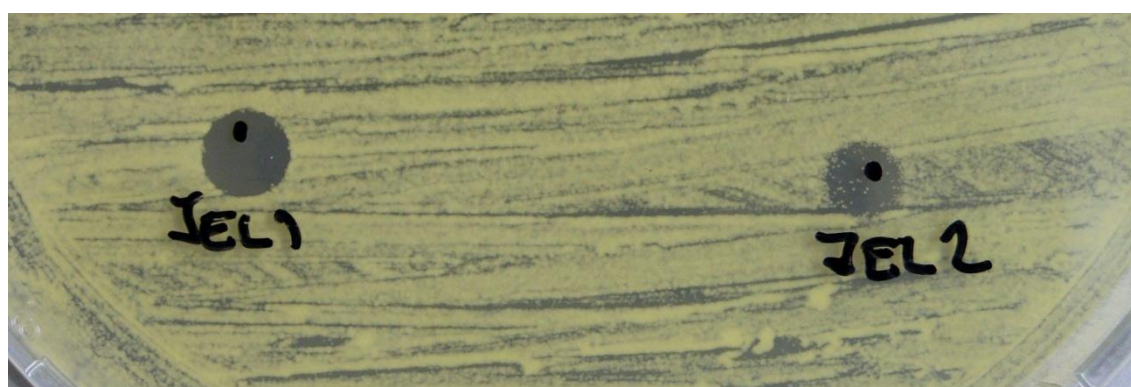
Testovaný bakteriální kmen	Koncentrace peptidu	Výsledné množství peptidu na spotu	Délka inhibiční zóny
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 38	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 38	1000 µg/ml	5 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 39	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 39	1000 µg/ml	5 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4483	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4483	1000 µg/ml	5 µg	4 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4484	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4484	1000 µg/ml	5 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4485	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4485	1000 µg/ml	5 µg	3 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4486	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4486	1000 µg/ml	5 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4487	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4487	1000 µg/ml	5 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4488	2000 µg/ml	10 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 4488	1000 µg/ml	5 µg	žádná zóna
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 5680	2000 µg/ml	10 µg	5 mm
<i>Paenibacillus larvae</i> CCM 5680	1000 µg/ml	5 µg	5 mm

4.1.5.5 Kultivace bakterií z inhibičních zón

U bakterií *E. coli* NCTC 10538 a *M. luteus* CCM 732 byly provedeny stěry z inhibičních zón, které vytvořil peptid apidaecin Ia (v případě *E. coli*) (Obr. 16) a jelleiny (v případě *M. luteus*) (Obr. 17). Po rekultivaci bakterií došlo k opětovnému nárůstu *E. coli*, ale *M. luteus* se ze zón nepodařilo znovu kultivovat. Opětovný nárůst bakterie *E. coli* může být zapříčiněn mechanismem účinku apidaecinu Ia na cytoplazmatickou membránu bakterií. Apidaeciny svým mechanismem účinku tuto membránu nenarušují, ale pouze jí pronikají a působí na cíle ve vnitřním prostoru bakteriální buňky. To, že nedochází k narušení cytoplazmatické membrány bakterie, může být příčinou pouze bakteriostatického účinku těchto peptidů (Casteels *et al.*, 1989).



Obr. 16: Vzhled inhibičních zón po aplikaci 10 μ g apidaecinu Ia na spot u kmenů *E. coli* kultivovaných na LB médiu. A – apidaecin Ia s *E. coli* CCM 4517. B – apidaecin Ia s *E. coli* NCTC 10538.



Obr. 17: Vzhled inhibičních zón po aplikaci 20 μ g jelleinů na spot u *M. luteus* CCM 732. Kultivace bakterie na J-agaru.

4.1.6 Stanovení růstové křivky *E. coli* v přítomnosti peptidu

Pro stanovení MIC a zjištění průběhu růstu bakteriálních kmenů *E. coli* s přítomností peptidu apidaecinu Ia byly změřeny růstové křivky bakterií v závislosti na koncentraci peptidu.

E. coli CCM 4517 má bez přítomnosti antibiotika tetracyklinu nebo peptidu apidaecinu Ia stejný průběh růstu ve všech třech médiích (MYPGP, J-agar, LB médium). Rozdíly v růstu lze však pozorovat při koncentraci apidaecinu Ia 12,5 µg/ml (Obr. 18). Při této koncentraci bakterie roste již jako bez přítomnosti peptidu, stacionární fáze růstu však nastává přibližně o dvě hodiny později ve srovnání s kontrolou. Kdežto v J-agaru je možno pozorovat výrazně delší dobu inhibice množení bakterií v porovnání s bakteriemi bez přítomnosti peptidu či antibiotika. Na konci experimentu (7. hodina) se *E. coli* stále nachází v exponenciální fázi růstu v přítomnosti 12,5 µg/ml apidaecinu Ia. Odlišný je růst u *E. coli* na LB médiu, kde se bakterie množí i při koncentraci 25 µg/ml apidaecinu Ia. Hodnotu MIC pro *E. coli* CCM 4517 je možno stanovit na 25 µg/ml, avšak jsou patrné značné rozdíly v růstu na hranici MIC (12,5 µg/ml), na které může mít právě vliv použité médium.

Antimikrobiální účinek apidaecinu Ia na druhý z testovaných kmenů *E. coli* NCTC 10538 je odlišný od účinku na *E. coli* CCM 4517 (Obr. 19). Růst *E. coli* NCTC 10538 bez přítomnosti antimikrobiálních látek (apidaecin Ia, tetracyklin) je odlišný v různých médiích. Stacionární fáze růstu této bakterie se objevuje u médií J-agaru a MYPGP médiu přibližně o hodinu dříve než u LB média. Na LB médiu je také bakteriální nárůst vyšší, než u J-agaru a MYPGP média. Inhibice růstu tohoto bakteriálního kmene při použití apidaecinu Ia nastává už při koncentraci 25 µg/ml u všech testovaných médií. Inhibice bakteriálního růstu však přetrvává pouze dvě hodiny od spuštění experimentu. Po uplynutí této doby dochází k exponenciálnímu nárůstu bakterií. V LB médiu je inhibice bakteriálního růstu nejkratší a nejslabší. Kmen *E. coli* NCTC 10538 vykazuje citlivost vůči tetracyklinu. Inhibice bakteriálního růstu způsobená tetracyklinem je však také časově omezena. K inhibici antimikrobiálních účinků tetracyklinu dochází po čtyřech hodinách od začátku měření.

Rozdíly v odlišném působení apidaecinu Ia na různé kmeny *E. coli* lze také pozorovat na výsledcích difúzních testů (Obr. 16). Zde jsou rozdíly patrné na vzhledu inhibičních zón. *E. coli* CCM 4517 tvoří s apidaecinem Ia jasně zřetelnou zónu, na jejíchž okrajích je asi 30 bakteriálních kolonií. Inhibiční zóna, kterou utvořil

apidaecin Ia s *E. coli* NCTC 10538, je pokrytá drobným povlakem bakteriálních kolonií, což může být způsobeno právě opětovným nárůstem bakterií, který je patrný i u růstových křivek.

Casteels *et al.* (1989) uvádějí MIC pro apidaecin Ia s bakteriálním kmenem *E. coli* NCTC 9001 hodnotu 0,1 µg/ml. MIC stanovená při měření růstových křivek v J-agaru je pro *E. coli* CCM 4517 25 µg/ml a pro *E. coli* NCTC 10538 25 µg/ml. Hodnoty MIC, které jsou uvedeny v článku (Casteels *et al.*, 1989), mohou být nižší z důvodu testování jiných bakteriálních kmenů *E. coli* či používání jiných médií a rozpouštěděl pro peptidy.

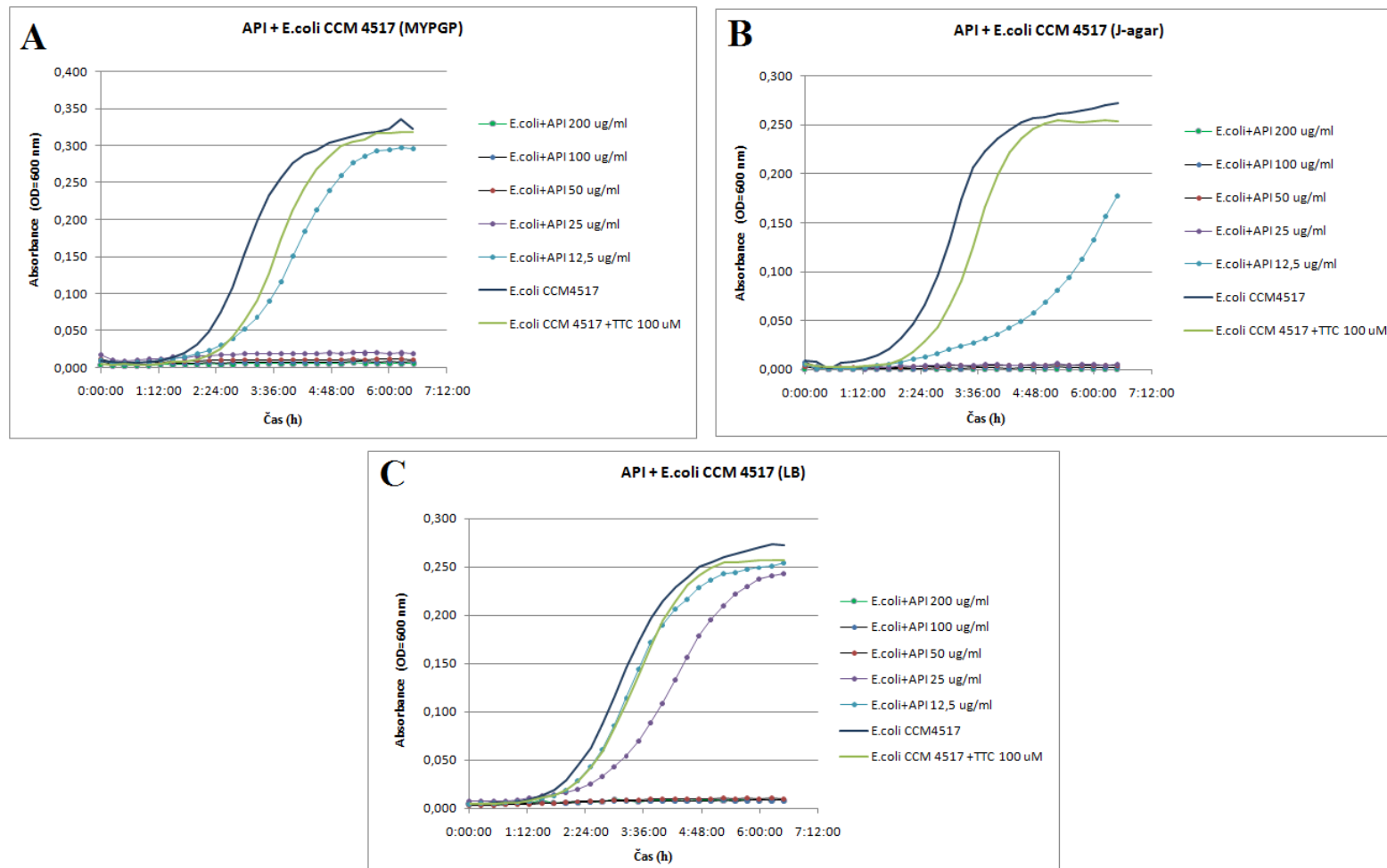
Dále bylo zjištěno, že *E. coli* CCM 4517 je k tetracyklinu rezistentní, avšak je citlivá na antimikrobiální účinek apidaecinu Ia.

4.1.6.1 Vliv inkubace apidaecinu Ia s *E. coli* CCM 4517

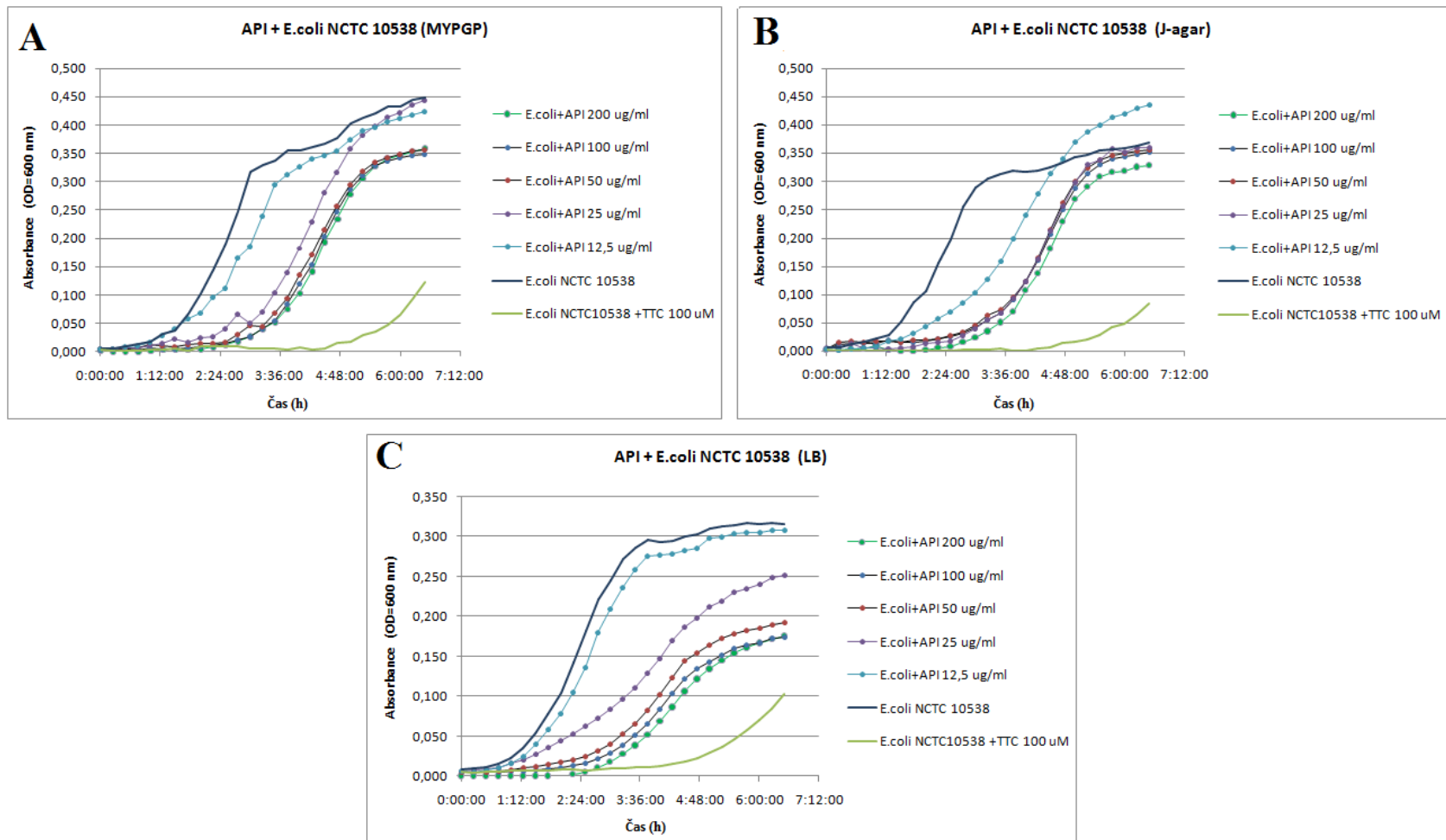
Inkubace apidaecinu Ia s bakteriemi přes noc při teplotě 4 °C nevedla ke změně MIC, je však možno pozorovat změnu průběhu inhibice růstu při koncentraci 12,5 µg/ml apidaecinu IA. V případě růstu bez předchozí inkubace peptidu s bakterií je pozorována inhibice bakteriálního růstu po dobu asi 2 hodin od začátku experimentu. Po noční inkubaci bakterie s peptidem se však při koncentraci 12,5 µg/ml apidaecinu Ia, neprojevil žádný inhibiční účinek peptidu. (Obr. 20).

4.1.7 Stanovení MIC jelleinu II na jednotlivé kmeny *P. larvae*

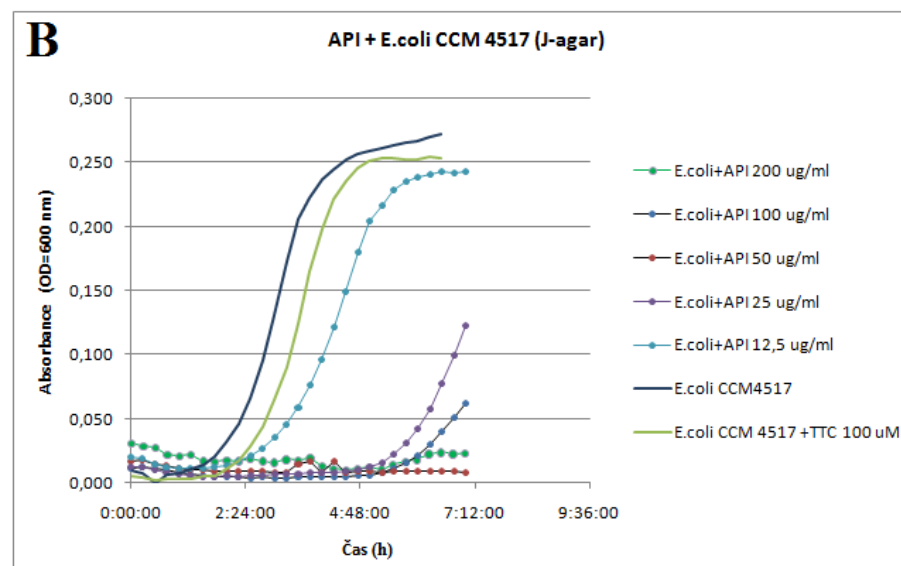
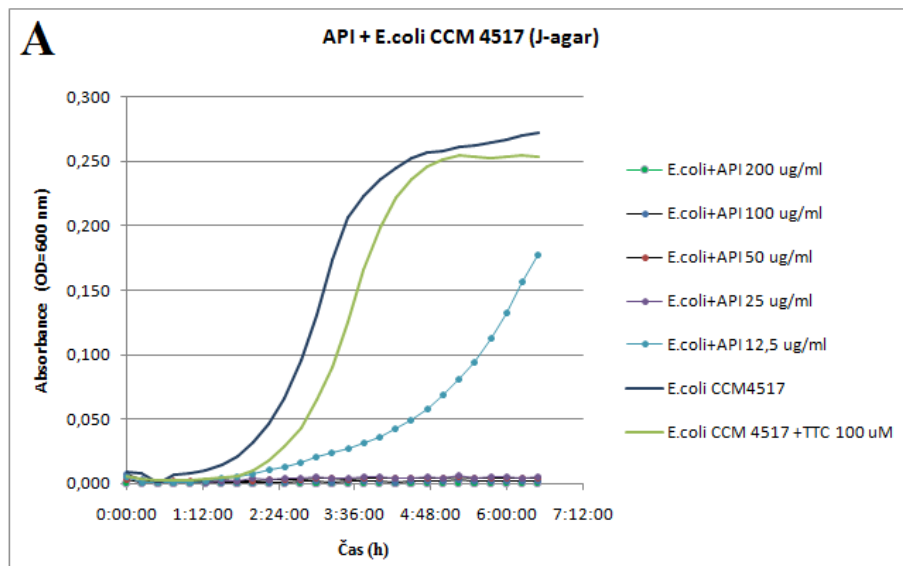
Stanovení MIC v mikrotitrační destičce pomocí klasické mikrobiologické metody (viz. kapitola 3.2.6) pro jednotlivé kmeny *P. larvae* s peptidem jellein II, neposkytuje reprodukovatelné výsledky i přes to, že aktivita tohoto peptidu byla ověřena pomocí difúzních testů. Ke stanovení MIC těchto bakterií je třeba použít jinou metodu. Bíliková *et al.* (2009) testují *P. larvae* pomocí stanovení růstových křivek, testují peptid apalbumin2, který také vykazuje antimikrobiální účinky vůči této bakterii. Testováním pomocí této metody by mohly být zjištěny změny v aktivitě jelleinů v průběhu inkubace s bakterií a dále by mohl být ověřen baktericidní účinek jelleinů, který vyplývá z rekultivace bakterií z inhibičních zón.



Obr. 18: Růstová křivka *E. coli* CCM 4517 s působením apdiaecinu Ia v různých koncentracích. Bakteriální růst byl měřen po dobu 7 hodin. A – peptid rozpuštěn v tekutém MYPGP médiu. B - peptid rozpuštěn v tekutém J-agaru. C – peptid rozpuštěn v tekutém LB médiu.



Obr. 19: Růstová křivka *E. coli* NCTC 10538 s působením apidaecinu Ia v různých koncentracích. Bakteriální růst byl měřen po dobu 7 hodin. A – peptid rozpuštěn v tekutém MYPGP médiu. B - peptid rozpuštěn v tekutém J-agaru. C – peptid rozpuštěn v tekutém LB médiu.



Obr. 20: Růstová křivka *E. coli* CCM 4517 s působením apidaecinu Ia v různých koncentracích. Jako médium pro rozpuštění peptidu byl použit J-agar. Bakteriální růst byl měřen po dobu 7 hodin. A – měření bez předchozí inkubace peptidu s bakteriemi. B – inkubace peptidu s bakteriální kulturou přes noc.

Stanovením MIC apidaecinu Ia bylo dosaženo velmi podobných výsledků, jaké jsou uváděny v literatuře (Casteels *et al.*, 1989). Aktivita tohoto peptidu byla pozorována u G-bakterií, vůči kterým by tento peptid měl být nejvíce aktivní (Casteels *et al.*, 1989). U tohoto peptidu se také projevují změny v délce inhibičních zón v závislosti na koncentraci peptidu.

Testování s kmeny *P. larvae* však neposkytovalo předpokládané výsledky. Růst této bakterie na doporučeném J-agaru (de Graaf *et al.*, 2013) byl příliš slabý pro účely testování antimikrobiální aktivity. Další doporučené MYPGP médium (de Graaf *et al.*, 2013) nelze pro testování použít, kvůli srážení jelleinů v tomto médiu. Tyto peptidy jako jediné z testovaných peptidů vykazovaly antimikrobiální aktivitu vůči *P. larvae*. Pro testování bylo tedy zvoleno LB médium (Bang *et al.*, 2010), na kterém kmeny *P. larvae* rostou všechny a v dostatečném množství pro testování antimikrobiální aktivity. Také peptidy jellein I a jellein II se v tomto médiu nesráží.

Při testování antimikrobiální aktivity jelleinů s kmeny *P. larvae* formou difúzních testů nebyly patrné změny ve velikosti inhibičních zón v závislosti na koncentraci peptidu, které byly sledovány při testování apidaecinu Ia s *E.coli*. Tento jev může být způsoben špatnou difúzí jelleinů médiem, kdy se utvoří zóna jen v místě aplikace antimikrobiální látky.

Stanovení MIC *P. larvae* po 48 hodinové inkubaci s jelleiny vykazuje negativní výsledky. To může být pravděpodobně způsobeno dlouhou dobou kultivace. Jelleiny mohou působit jen po určitou dobu, tak jak bylo pozorováno u růstových křivek apidaecinu Ia s *E. coli*, tudíž při odečítání výsledků po několikahodinové inkubaci s bakterií už nemusí peptid vůbec účinkovat. Je tedy potřeba zjistit, jak se mění účinek jelleinů v průběhu kultivace s bakterií.

5 Závěr

Tato práce byla zaměřena na antimikrobiální peptidy, mechanismus jejich účinku a na antimikrobiální aktivitu těchto látek. Praktická část této práce se také zabývala některými antimikrobiálními peptidy včely medonosné a jejich souvislostí s bakteriálními chorobami včel. Bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1.) Byla provedena literární rešerše o významu a funkci antimikrobiálních peptidů se zaměřením na včelí antimikrobiální peptidy.
- 2.) Byla testována vhodná média pro kultivaci testovaných bakterií. Kmeny *E. coli* a *M. luteus* rostou na MYPGP médiu, J-agaru i LB médiu. Kmeny *P. larvae* rostou na MYPGP médiu i LB médiu, některé z nich však nelze kultivovat na J-agaru.
- 3.) Metoda testování antimikrobiální aktivity peptidů pomocí difúzních testů byla optimalizována. Nejvhodnějším způsobem aplikace peptidů bylo jejich nanesení přímo na misku s pevným kultivačním médiem. Vytváření jamek v médiu či použití papírových disků vedlo k sníženému nebo žádnému antimikrobiálnímu efektu.
- 3.) Byla zjištěna antimikrobiální aktivita peptidu apidaecinu Ia vůči bakteriálním kmenům *E. coli*. Vůči každému z testovaných kmenů *E. coli* byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace.
- 4.) Antimikrobiální aktivita jelleinů byla prokázána u bakteriálních kmenů *P. larvae* metodou difúzních testů. Stanovit MIC se v tekutém médiu nepodařilo.
- 5) Byla zjištěna různá citlivost bakteriálních kmenů *E. coli* vůči antimikrobiálním látkám. Bakteriální kmen *E. coli* NCTC 10538 je méně citlivý k apidaecinu Ia, ale citlivý vůči antibiotiku tetracyklinu. Naopak kmen *E. coli* CCM 4517 je citlivý k apidaecinu Ia, ale rezistentní vůči tetracyklinu.

Další práce by měla být zaměřena na stanovení minimální inhibiční koncentrace u bakteriálních kmenů *P. larvae*. Dále by měly být zopakovány experimenty se stanovením růstových křivek pro získání statisticky významných dat. Dále by bylo vhodné otestovat peptid abaecin s kultivací bakterií na dalších médiích a případně i zoptimalizovat podmínky působení peptidu na bakterie.

6 Literatura

- Akiyama N., Hijikata M., Kobayashi A., Yamori T., Tsuruo T., Natori S. (2000): Antitumor effect of N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel antibacterial substance from an insect. *Anticancer Research* **20**, 357-362.
- Andreu D., Rivas L. (1998): Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- Bang J. K., Ravichandran, Murugan N., Kwak O. K., Jeon Y. H., Chung J. H., Lee K. W., Park J. H., Kim S., Park J. S., Kang S. W. (2010): Functional and structural characterization of apidaecin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **31**, 209-212.
- Bailey L. (1957): The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *Journal of General Microbiology* **17**, 39-48.
- Bailey L. (1983): *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honeybees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 65-69.
- 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., Mirgorodskaya E., Bukovská G., Gobom J., Lehrach H., Šimůth J. (2009): Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics* **9**, 2131-2138.
- Bozelli Jr J. C., Sasahara E. T., Pinto M. R. S., Nakaie C. R., Schreier S. (2012): Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritripticin to lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **165**, 365-373.
- Brey P. T., Hultmark D. (1998): *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed., Chapman & Hall, London, UK, 325 stran.
- Brodgen K. A. (1992): Ovine pulmonary surfactant induces killing of *Pasteurella haemolytica*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by normal serum. *Infection and Immunity* **60**, 5182-5189.
- Brodgen K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Bulet P., Dimarcq J. L., Hetru C. (1993): A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 14893-14897.
- Bulet P., Stöcklin R. (2005): Insect antimicrobial peptides: Structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* **12**, 3-11.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Tempst P. (1993): Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). *The 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. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 26107-26115.
- Casteels P., Tempst P. (1994): Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-pore-forming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**, 339-345.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1993): Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *The EMBO Journal* **12**, 1569-1578.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 28569-28575.
- Chernysh S., Cociancich S., Briand J. P., Hetru C., Bulet P. (1995): The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina*: identification of a novel family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin. *Journal of Insect Physiology* **42**, 81-89.
- Cheshire F. R., Cheyne W. W. (1985): The pathogenic history and history under cultivation of a new bacillus (*B. alvei*), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foul brood. *Journal of the Royal Microscopical Society* **5**, 581-601.
- Cézard Ch., Silva-Pirez V., Mullié C., Sonnet P. (2011): Antibacterial peptides: A review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* **2**, 926-937.
- Cociancich S., Dupont A., Hégy G., Lanot R., Holder F., Hetru C., Hoffmann J. A., Bulet P. (1994): Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Biochemical Journal* **300**, 567-575.
- Danihlík J. (2008a): *Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Danihlík J. (2008b): Kleštík včelí (*Varroa destructor*). *Moderní včelař* **3**, 17-19.
- de Graaf D. C., Alippi A. M., Antúnez K., Aronstein K. A., Budge G., Koker D. D., Smet L. D., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzales E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., van Engelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013): Standard methods for american foulbrood research. *Journal of Apicultural research* **52**, 1-28
- Destoumieux-Garzón D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachère E. (2001): Crustacean immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 47070-47077.
- Devine D. A., Marsh P. D., Percival R. S., Rangarajan M., Curtis M. A. (1999): Modulation of antibacterial peptide activity by products of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* spp. *Microbiology* **145**, 965-971.
- Dickinson L., Russell V., Dunn P. E. (1988): A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 19424-19426.
- Dimarcq J. L., Keppi E., Dunbar B., Lambert J., Reichhart J. M., Hoffmann D., Rankine S. M., Fothergill J. E., Hoffmann J. A. (1988): Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino acid sequence of the predominant member, dipterecin A. *European Journal of Biochemistry* **171**, 17-22.
- Dubos J. (1939a): Studies on bactericidal agent extracted from a soil Bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **70**, 1-10.
- Dubos J. (1939b): Studies on bactericidal agent extracted from a soil Bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. *The Journal of Experimental Medicine* **70**, 11-17.
- Dutta R. C., Nagpal S., Salunke D. M. (2008): Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1005-1015.
- Dzierzon J. (1882): *Rational bee-keeping*. Houlston and Sons, London. 339 stran.
- Foettinger A., Leitner A., Lindner W. (2006): Derivatization 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.
- Fogaça A. C., da Silva P. I., Miranda M. T. M., Bianchi A. G., Miranda A., Ribolla P. E. M., Daffre S. (1999): Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 25330-25334.
- Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M. M., Malaspina O., Palma M. S. (2004): Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* **25**, 919-928.

- Forsgren E. ((2010): European foulbrood in honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S5-S9.
- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.
- Genersch E. (2010): American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10-S19..
- Hancock R. E. W. (1997): Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-422.
- Hancock R. E. W., Lehrer R. (1998): Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* **16**, 82-88.
- Hancock R. E. W., Chapple D. S. (1999): Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Hitchcock J. D., Stoner A., Wilson W. T., Menapace D. M. (1979): Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various age (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **52**, 238-246.
- Holak T. A., Engström Å., Kraulis P. J., Lindeberg G., Bennich H., Awlyn Jones T., Gronenborn A. M., Marius Clore G. (1988): The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* **27**, 7620-7629.
- Hultmark D., Enström A., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H. G. (1983): Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal* **2**, 571-576.
- 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.
- Kreil G., Haiml L., Suchanek G. (1980): Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. *European Journal of Biochemistry* **111**, 49-58.
- Lai R., Liu H., Lee W. H., Zhang Y. (2002): An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**, 796-799.
- Lambert J., Keppi E., Dimarcq J. L., Wicker C., Reichhart J. M., Dunbar B., Lepage P., Van Dorsselaer A., Hoffmann J., Fothergill J., Hoffmann D. (1988): Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 262-266.
- Lavery G., Gorman S. P., Gilmore B. F. (2011): The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 6566-6596.
- Lele D. S., Talat S., Kaur K. J. (2013): The presence of arginine in the pro-arg-pro motif augments the lethality of proline rich antimicrobial peptides of insect source. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **19**, 323-330.
- Li W., Ma G., Zhou X. (2006): Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359.
- 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.
- Matsuyama K., Natori S. (1988): Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 17112-17116.
- Murray K., D., Aronstein K. A. (2008): Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* **75**, 325-328.
- Nakasutji T., Gallo R. L. (2012): Antimicrobial peptides: The old molecules with new ideas. *Journal of Investigative Dermatology* **132**, 887-895.
- Natori S. (1977): Bactericidal substance induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Journal of Insect Physiology* **23**, 1169-1173.

- Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy* **103**, 460-468.
- Nguyen L. T., Haney E. F., Vogel H. J. (2011): The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* **29**, 464-472.
- Nishikawa T., Akiyama N., Kunimasa K., Oikawa T., Ischizuka M., Tsujimoto M., Natori S. (2006): Inhibition of *in vivo* angiogenesis by N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine. *European Journal of Pharmacology* **539**, 151-157.
- Oren Z., Shai Y (1998): Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451-463.
- Otvos L. (2000a): Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Otvos L., (2000b): Interaction between heat-shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**, 14150-14159.
- Otvos L. (2002): The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1138-1150.
- Park C. B., Kim H. S., Kim S. C. (1998): Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**, 253-257.
- Patrzykat A., Friedrich C. L., Zhang L., Mendoza V., Hancock R. E. (2002): Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 605-614.
- Peschel A., Sahl H. G. (2006): The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 529-536.
- Powers J. P. S., Hancock R. E. W. (2003): The relationship between peptide structure and microbial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Pozo Navas B., Lohner K., Deutsch G., Sevcsik E., Riske K. A., Dimova R., Garidel P., Pabst G. (2005): Composition dependence of vesicle morphology and mixing properties in a bacterial model membrane system. *Biochimica et Biophysica Acta* **1716**, 40-48.
- Reichhart J. M., Meister M., Dimarcq J. L., Zachary D., Hoffmann D., Ruiz C., Richards G., Hoffmann J. A. (1992): Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter. *The EMBO Journal* **11**, 1469-1477.
- Schirach G. A. (1769): *Historie des abeilles*, p. 56 (Chapter 3).
- Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kolbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C. (2001): Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology* **2**, 1133-1137.
- Seufi A. M., Hafez E. E., Galal F. H. (2011): Identification, phylogenetic analysis and expression profile of an anionic insect defensin gene with antibacterial activity, from bacterial-challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *BMC Molecular Biology* **12**, 47.
- Sieprawska-Lupa M., Mydel P., Krawczyk K., Wójcik K., Puklo M., Lupa B., Suder P., Silberring J., Reed M., Pohl J., Shafer W., McAleese F., Foster T., Travis J., Potempa J. (2004): Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 4673-4679.
- Stefano G. B., Salzet B., Fricchione G. L. (1998): Enkelytin and opioid peptide association in invertebrates and vertebrates: immune activation and pain. *Immunology Today* **19**, 265-268.
- Steiner H., Hultmark D., Engström Å., Bennich H., Boman H. G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248.
- Steiner H. (1982): Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters* **137**, 283-287.
- Subbalakshmi C., Sitaram N. (1998): Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 91-96.
- Thomas H., Peychl J., Schevchenko A. (2004): Dried-droplet probe preparation on AnchorChipTM targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 923-930.

- Teixeira V., Feio M. J., Bastos M. (2012): Role of lipids in their interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**, 149-177.
- Vilmos P., Kurucz E. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Vizioli J., Salzet M. (2002): Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**, 494-496.
- Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černožorská L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V., Zahradníček O. (2010): *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun, Brno, Česká republika, 495 stran.
- Wen H., Lan X., Cheng T., He N., Shiomi K., Kajiura Z., Zhou Z., Xia Q., Xiang Z., Nakagaki M. (2009): Sequence structure and expression pattern of a novel anionic defensin-like gene from silkworm (*Bombyx mori*). *Molecular Biology Reports* **36**, 711-716.
- White G. F. (1906): The bacteria of the apiary with special reference to bee disease., Washington: Government printing office, Washington, USA, 40 stran.
- White G. F. (1912): The cause of European foulbrood. *US Department of Agriculture Circular* **157**, 1-15.
- Wilson W. T. (1971): Resistance to American foulbrood in honeybees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology* **17**, 247-255.
- Yang L., Harroun T. A., Weiss T. M., Ding L., Huang H. W. (2001): Barrel stave model or toroidal model? A case of study on melittin pores. *Biophysical Journal* **81**, 1475-1485.
- Yeaman M. R., Yount N. Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55.
- Yonezawa A., Kuwahara J., Fuji N., Sugiura Y. (1992): Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry* **31**, 2998-3004.
- Yoshiyama M., Kimura K. (2010): Characterization of antimicrobial peptide genes from Japanese honeybee *Apis cerana japonica* (Hymenoptera: Apidae). *Applied Entomology and Zoology* **45**, 609-614.
- Youenou B., Brothier E., Nazaret S. (2014): Diversity among strains of *Pseudomonas aeruginosa* from manure and soil, evaluated by multiple locus variable number tandem repeat analysis and antibiotic resistance profiles. *Research in Microbiology* **165**, 2-13.
- Yount N. Y., Bayer A. S., Xiong Y. Q., Yeaman M. R. (2006): Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Peptide Science* **84**, 435-58.
- Yue D., Nordhoff M., Wieler L. H., Genersch E. (2008): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **10**, 1612-1620.
- Zhang L., Benz R., Hancock R. E. W. (1999): Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of α -helical peptides. *Biochemistry* **38**, 8102-8111.

7 Seznam použitých zkratk

ABA	abaecin
AcN	acetonitril
AK	aminokyselina
AMP	antimikrobiální peptidy
API	apidaecin
CM	cytoplazmatická membrána
G+	Gram-pozitivní bakterie
G-	Gram-negativní bakterie
JEL	jellein
K-Pi	K-fosfátový pufr
LPS	lipopolysacharidy
MALDI-TOF	desorpční ionizace laserem za účasti matrice
MIC	minimální inhibiční koncentrace
OD	optická hustota
5-S-GAD	N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin
TFA	trifluoroctová kyselina