

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Analýza parametrů humorální imunity včel

Diplomová práce

Autor:	Bc. Jiří Danihlík
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Termín odevzdání práce:	

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Děkuji svému školiteli Dr. Markovi Petřivalskému za odborné vedení v praktické části, za jeho cenné rady a připomínky při psaní diplomové práce.

Poděkování patří i Dr. Renému Lenobelovi za pomoc s nanoLC-MS metodou a vyhodnocením naměřených dat a doc. Michaele Sedlářové za pomoc při kultivaci bakterie *E. coli*.

V neposlední řadě bych rád poděkoval celé Katedře biochemie za vstřícný přístup během mého studia.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení    Bc. Jiří Danihlík

autora

Název práce        Analýza parametrů humorální imunity včel

Typ práce            Magisterská

Pracoviště            Katedra biochemie

Vedoucí práce        Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

Rok obhajoby         2011

práce

Abstrakt

Včelstva jsou ohrožována mnoha chorobami, které působí rozsáhlé ekonomické i ekologické škody. Studium imunitního systému včel je důležité pro získání nových poznatků o vlivu patogenů na včelí jedince nebo i celá včelstva. Imunitní systém včel je tvořen z dílčích částí a to z fyzikálních bariér, buněčné a humorální imunity, jejíž součástí jsou také antimikrobiální peptidy. Teoretická část obsahuje stručný náhled na imunitní systém včel s podrobným zaměřením na antimikrobiální peptidy. Praktická část obsahuje vývoj a testování několika různých přístupů k detekci antimikrobiálních peptidů ve včelích homogenátech. První dvě metody, polyakrylamidová elektroforéza s transferem rozdělených peptidů na membránu a extrakce peptidů na iontoměničové pevné fázi kombinovaná s koncovou HPLC-DAD detekcí, nebyly dostatečně selektivní a citlivé pro požadovanou rutinní analýzu. Poslední testovaná metoda je založená na kombinaci extrakce peptidů z homogenátu na kationtoměničových extrakčních discích s odsolením na C<sub>8</sub> reverzní fázi a analýzou nanokapilární chromatografií na C<sub>8</sub> fázi s hmotnostní detekcí v MS módu (Q-TOF). Tato metoda je s ohledem na nutnost použití nanokapilární chromatografie relativně robustní a velmi citlivá, protože umožnila analýzu antimikrobiálních peptidů v homogenátu připraveného z jedné včely. Byl stanovován obsah apidaecinu, jeho prekurzoru a abaecinu u vybraných skupin včel: kontrolní skupina (K), skupina včel uměle nakažená bakterií *E. coli* (IM), včely ze včelstva s klinickými příznaky viru pytlíčkového plodu (SBV) a včely z celkově oslabeného včelstva (EV). Bylo zjištěno, že hladina apidaecinu se významně mění mezi jednotlivými skupinami včel. Na rozdíl od apidaecinu, změny hladin jeho prekurzoru mezi skupinami K, IM a EV nebyly významné. Výjimku tvořila skupina

SBV, kde obsah prekurzoru byl asi 9násobně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Změny v obsahu abaecinu mezi jednotlivými skupinami včel také nebyly statisticky významné. Je patrné, že metoda postavená na kombinaci kationtoměničové purifikaci s nanoLC-MS analýzou nabízí možnost rutinní analýzy antibakteriálních peptidů ve včelách. Vzhledem k citlivosti metody je možné získat nová data o výskytu těchto peptidů, jejich hladinách a změn v jednotlivých včelách nebo i v celých včelstvech jako odezvu na výskyt různých chorob.

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, včela medonosná, vrozená imunita, apidaecin, abaecin.
Počet stran	106
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Jiří Danihlík
Title	Antimicrobial peptides and immunity of honeybees
Type of thesis	master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>Bees are endangered by many diseases, which can cause large economic and ecologic damages. It is important to study the bee's innate immune system to get new insights on the influence of pathogens to a single bee or to whole bee hives. The bee innate immune system involves physical barriers, cellular response and humoral immunity, which involves also antimicrobial peptides. The theoretical part of this work is focused on the humoral immunity and on antimicrobial peptides in detail. The practical part includes the development and testing of several different methods for the detection of antimicrobial peptides in bees. Two methods, polyacrylamide gel electrophoresis and blotting to membranes, and ion-exchange solid phase extraction combined with HPLC-PDA detection, were not selective and sensitive enough as required for routine analysis. The last tested method combines a purification step on a cation-exchange extraction disc, and a desalting step on a C<sub>8</sub> reversed phase extraction disc, and analysis on a nanocapillary chromatography with mass spectrometry detection in positive MS mode (Q-TOF). This method is quite robust and sensitive because it was possible to detect antimicrobial peptides from only one bee. There were three antimicrobial peptides, apidaecin, its precursor, and abaecin, quantified in four different groups of bee's sample: a control group (K), an artificially infected group (IM), bees from a bee hive with Sack brood virus (SBV) and bees from a very weak and poor bee hive (EV). It was observed that the levels of apidaecin were significantly changed among different groups. On the other hand the levels of precursor of apidaecin were not significantly different among groups K, IM and EV, but the group SBV was</p>

different. The group SBV had extra high level (9-times higher) of precursor of apidaecin in comparison to the control group. The levels of abaecin were not significantly changed among all analyzed groups. The final optimized method offers a powerful tool for the analysis of antimicrobial peptides in bees. Due to its sensitivity it will be possible to collect a new knowledge about the role of bee's antimicrobial peptides in bee immunity and function as a response to the infection by bee's pathogens.

Keywords	Antimicrobial peptides, honey bee, innate immunity, apidaecin, abaecin
Number of pages	106
Number of appendices	0
Language	Czech

<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>13</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>14</b>
<b>2 IMUNITA VČEL.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Buněčná imunita včel.....	15
<b>2.2 Humorální imunita.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Lysozym.....	16
2.2.2 Lektiny .....	16
2.2.3 Fenoloxidasová kaskáda.....	16
2.2.4 Antimikrobiální peptidy .....	18
2.2.4.1 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů .....	19
2.2.4.2 Rekombinantní antimikrobiální peptidy .....	20
2.2.4.3 Apidaeciny .....	20
2.2.4.4 Abaecin .....	21
2.2.4.5 Defensin .....	23
2.2.4.6 Hymenoptaecin .....	24
2.2.4.7 Jelleiny .....	24
<b>2.3 Signální dráhy imunitní reakce.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Toll signální dráha.....	24
2.3.2 Imd dráha.....	25
2.3.3 JAK/STAT signální dráha.....	26
<b>2.4 Závislost imunitní odpovědi na vývojovém stádiu včely.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Další složky obranyschopnosti včelstva.....</b>	<b>27</b>
<b>3 METODY ANALÝZY IMUNOPEPTIDŮ.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Obecná identifikace imuno-peptidů.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Analýza peptidů včel .....</b>	<b>28</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIÁL .....</b>	<b>31</b>



4.1	Chemikálie .....	31
4.2	Biologický materiál.....	31
4.3	Přístrojové vybavení.....	31
5	<b>METODY .....</b>	<b>33</b>
5.1	Imunizace včel.....	33
5.2	Mikrobiologický rozbor na spory moru včelího plodu .....	33
5.3	Elektroforéza IMP včel .....	33
5.3.1	Příprava vzorků a standardů .....	34
5.3.2	Barvení gelů po elektroforéze .....	34
5.4	Western blotting.....	35
5.4.1	Barvení membrán po blotingu .....	35
5.5	Chromatografické metody.....	35
5.6	Zpracování vzorků .....	36
5.6.1	Vzorky pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii s reverzní fází bez iontoměničové předseparace.....	36
5.6.2	Vzorky pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii s reverzní fází v kombinaci s iontoměničem .....	36
5.7	Iontoměničová předseparace vzorků .....	37
5.7.1	Purifikace vzorku aniontoměničovou extrakcí na pevné fázi.....	37
5.7.2	Purifikace vzorku kationtoměničovou extrakcí na pevné fázi.....	37
5.7.3	Iontoměničová chromatografie on-line spojená s vysokotlakou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi.....	38
5.8	Vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi.....	38
5.9	Analýza peptidů kapilární kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (nanoLC-MS) .. Chyba! Záložka není definována.	
5.9.1	Příprava vzorku pro nanoLC-MS .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.9.2	Purifikace vzorků extrakcí na pevné fázi .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.9.3	Purifikace vzorků metodou extrakce na pevné fázi ve špičkách SCX Stage Tip	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.9.4	Přečištění vzorků metodou C <sub>8</sub> Stage Tip.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

5.9.5	Analýza metodou nanoLC-MS.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.9.5.1	Vyhodnocení výsledků po použití metody nanoLC-MC .	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.10	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	39
5.11	Statistické vyhodnocení.....	39
6	VÝSLEDKY .....	40
6.1	Analýza včelích IMP elektroforézou a blotováním .....	40
6.2	Analýza včelích IMP chromatografickými metodami .....	44
6.2.1	Vysokotlaká kapalinová chromatografie bez iontoměničové předseparace.....	44
6.2.2	Stanovení čistoty standardů apidaecinu a abaecinu.....	49
6.2.3	Iontoměničová chromatografie on-line spojená s HPLC na reverzní fázi.....	49
6.2.4	Extrakce na pevné fázi a následné RP-HPLC .....	54
6.2.4.1	Porovnání různých sorbentů použitých pro SPE.....	56
6.3	Analýza IMP metodou nanoLC-MS.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.1	Purifikace vzorku kationtoměničovou chromatografií na SPE kolonce.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.2	Optimalizace purifikace vzorku kationtoměničovou chromatografií pomocí SCX disků a přečištění na C <sub>8</sub> disku technikami StageTip.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.3	Závislost intenzity signálu v nanoLC-MS analýze na koncentraci apidaecinu	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.4	Analýza reálných vzorků včel metodou nanoLC-MS .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.5	Kvantifikace apidaecinu a jeho prekurzoru ve vzorcích včel..	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.6	Detekce abaecinu ve vzorcích .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6.3.7	PCA analýza naměřených dat.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
7	DISKUSE.....	57
7.1	Analýza IMP včel elektromigračními metodami.....	57
7.2	Analýza IMP včel chromatografickými metodami s UV detekcí.....	58
7.3	Analýza IMP včel pomocí nanoLC-MS.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

7.4	Diskuse naměřených biologických dat.....	Chyba! Záložka není definována.
8	ZÁVĚR .....	59
9	SEZNAM LITERATURY .....	61
10	SEZNAM ZKRATEK .....	67

## **Cíle práce**

- Provést literární rešerši poznatků o antimikrobiálních peptidech a složkách imunitního systému včel.
- V praktické části bylo cílem zavedení metody detekce některých antimikrobiálních peptidů spolu s optimalizací přípravy a zpracování vzorků.
- Provedení analýzy reálných vzorků včel.

## **Teoretická část**

# 1 Úvod

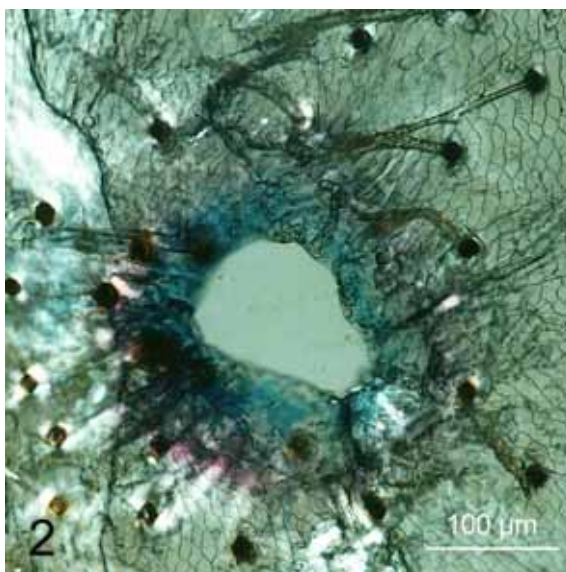
Včelstva ohrožuje mnoho různě nebezpečných chorob, s některými se včelař setká pouze sporadicky a bývají vázány třeba na určité období v roce, lze jim i v celku snadno předcházet vhodnými zootechnickými způsoby ošetřování včelstev. Existují však i podstatně nebezpečnější choroby mající různé původce (virus, bakterie, houba nebo roztoč). Proti některým z nich jsou včelařům k dispozici účinná léčiva, část z nich se přesto nesmí používat (antibiotika), aby byla zajištěna bezpečnost včelích produktů uváděných na trh.

Na choroby včel a jejich eradikaci je pohlíženo různě. Jedním z takových pohledů je šlechtění odolných včelstev. Dosud se ve včelařství šlechtí klasickými zootechnickými postupy, které jsou zdoluhavé. Využití moderních laboratorních metod by mohlo přinést určité zrychlení postupů šlechtění. Jejich otestování určitou laboratorní metodou by mohlo podstatě rychleji odpovědět, zda jsou či nejsou odolnější vůči patogenům. Vyvíjená metodika detekce antimikrobiálních peptidů by měla přinést i nové poznatky ve fungování imunity včel při jejich reakci na určitého patogena.

Početnost včelstev celosvětově klesá, což působí rozsáhlé škody nejen samotných včelařům ale i dalším zemědělcům. Studium imunity včel a vývoj laboratorní metodiky testování včel a včelstev je nyní velmi aktuální.

## 2 Imunita včel

Včelí imunita sestává z několika úrovní, v základní úrovni jsou fyzikální bariéry, mezi něž patří např. stěna střeva, kutikula. Narušením těchto fyzikálních bariér může dojít ke snadnějšímu přístupu patogenu do těla včely. Poškození fyzikálních bariér imunity včel způsobují především dva hlavní paraziti. Jedná se o roztoče kleštíka včelího (*Varroa destructor*) a houbu hmyzomorku (*Nosema sp.*). Kleštík včelí prokousne kutikulu včely, čímž umožní vstup například virovým částicím (Kanbar et al., 2004), houba *Nosema* poškozuje stěnu střeva svým pólovým vláknem. Další úrovní imunitní odpovědi jsou buněčná imunita a humorální imunita.



Obr. č. 1: Mikrofotografie poškozené kutikuly trubce, epidermální buňky barveny trypanovou modří. (převzato z Kanbar et al., 2004)

### 2.1.1 Buněčná imunita včel

K mechanismům buněčné imunity včel patří cytotoxicita (tvorba cytotoxických látek pro cizí buňky), fagocytóza (pohlčení patogenu imunitní buňkou), nodulace a enkapsulace (zapouzdrnění buněk jinými buňkami), koagulace, hojení ran (Turner, 1994). Buňky zodpovědné za buněčnou imunitní odpověď hmyzu se označují jako hemocyty (Salt, 1970). Mezi nejběžnější hemocyty u hmyzu patří prohemocyty, granulocyty, plasmocyty, spherulocyty a oenocyty (Lavine a Strand, 2002). Jejich zastoupení a množství se mění s věkem (Götz a Boman, 1985; Amaral et al., 2010). Buněčná imunita je úzce spjata s humorální imunitou, hemocyty produkují některé látky účastnící se humorální imunitní odpovědi.

## 2.2 Humorální imunita

Humorální imunita je tvořena jednotlivými molekulami účastnících se určitých imunitních reakcí. Řadíme mezi ně lektiny, lysiny (lysozym) i antimikrobiální peptidy, dále pak fenoloxidasovou kaskádu (Turner, 1994).

### 2.2.1 Lysozym

Lysozym (E.C. 3.2.1.17) hydrolysuje  $\beta$ -1,4-glykosidovou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu mureinu a mezi N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky chitinu. Enzym je relativně malý (kolem 15 kDa), včela exprimuje tři typy lysozymu – dva c-lysozymy (chicken – kuřecí typ) a jeden i-lysozym (invertebrate - bezobratlí) (Evans et al., 2006). Jeho koncentrace se u dospělých včel pohybuje mezi 5 až 25  $\mu\text{g/ml}$ , při nákaze může koncentrace narůst až na 1300  $\mu\text{g/ml}$  u larev, resp. na 40  $\mu\text{g/ml}$  u dospělých včel. Lysozym je namířen proti grampozitivním (G+) bakteriím (Glinsky a Jarosz, 1993).

### 2.2.2 Lektiny

Lektiny mají glykoproteinovou povahu, rozpoznávají glykosylované části na buněčné stěně bakterií, vážou se na ni, spouštějí další součásti imunity – fagocytózu a fenoloxidasovou kaskádu. Lektiny potřebují pro svou funkci  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. V organismu včely je přítomno několik modifikací lektinů, protože vazba mezi lektiny a jednotlivými glykosylovanými proteiny je velice specifická (Turner, 1994).

### 2.2.3 Fenoloxidasová kaskáda

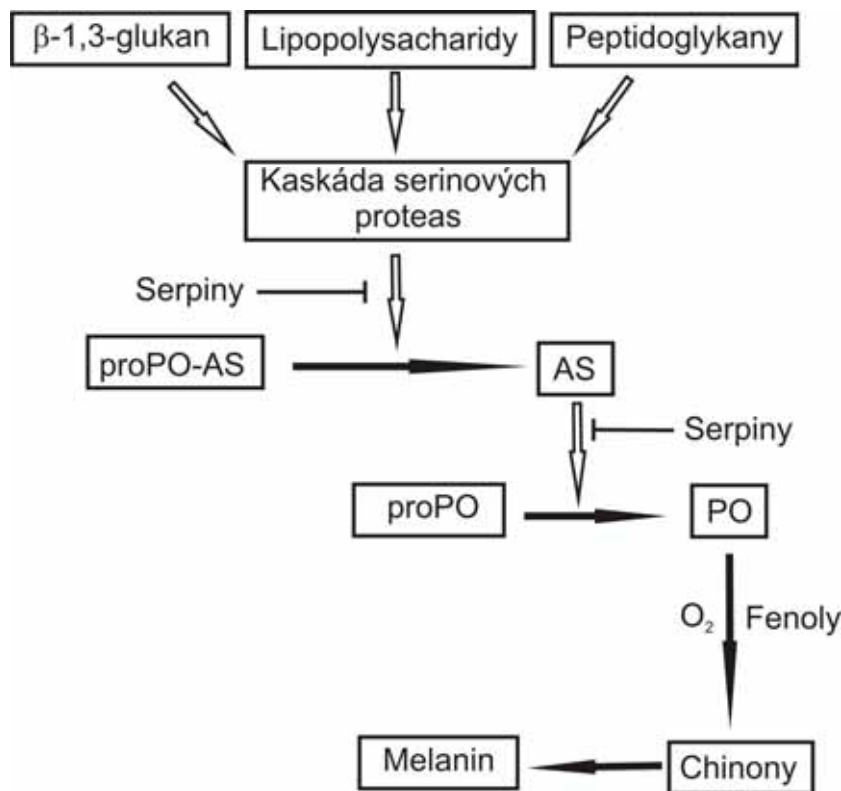
Jedná se o soubor enzymových reakcí, které se účastní imunitní odpovědi bezobratlých. Na konci této kaskády se nachází enzym zvaný fenoloxidasa (zkratka PO, EC 1.14.18.1), která katalyzuje o-hydroxylaci monofenolů a oxidaci o-difenolů na chinony. Chinony jsou pak neenzymaticky polymerizovány až na melanin, který vykazuje cytostatické a antibakteriální účinky, čehož organismus hmyzu využívá při imunitních reakcích. Aktivita fenoloxidasy stoupá při nakažení organismu patogenem, zvyšuje se také koncentrace lysozymu a antimikrobiálních peptidů (hymenoptaecinu), aktivita PO nebyla pozorována v prvních dvou dnech larválního vývoje včely, ale poté začne stoupat. (Chan et al., 2009). Hmyzí fenoloxidasa je sekvenčně podobná savčím tyrosinásam, které stejně jako fenoloxidasa potřebují měďnatý iont pro katalytické reakce (Kanost a Gorman, 2008).

Celá fenoloxidasová kaskáda je spouštěna tzv. systémem aktivujícím profenoloxidasu (proPO-AS) (Cerenius a Söderhäll, 2004). Stimulace proPO-AS je způsobena lektiny nebo molekulami glykoproteinů ze stěny bakterií, hyfami hub, viriony (Cerenius a Söderhäll, 2004),



příčemž proti nim je také celá enzymová kaskáda namířena (Wilson-Rich, 2008). Po aktivaci fenoloxidasové kaskády dojde k uvolnění profenoloxidas (proPO) z hemocytů, kde je proPO syntetizována. proPO je zymogenem PO, který je uvolněn z hemocytů za současného rozpadu buňky (Kanost a Gorman, 2008). Aktivace proPO vyžaduje účast proteinových kofaktorů, které tvoří kaskádu serinových proteas s postupně aktivovanou proteasolytickou aktivitou po rozeznání přítomnosti patogenu. proPO systém v hemolymfě je regulován inhibitory serinových proteas a některé regulační proteiny mohou inhibovat také přímo aktivovanou PO. Regulace celého systému je velice důležitá, neboť produkty PO mohou být toxické i pro buňky hostitele. Regulace fenoloxidasové kaskády je také spojena s nadprodukcí antimikrobiálních peptidů, protože exprese genů proPO je regulována Toll signální dráhou (Kanost a Gorman, 2008; Cerenius a Söderhäll, 2004; Evans et al., 2006). Proteinové inhibitory proteasové kaskády patří do superrodiny serpinů. Ve včelím genomu se nachází pouze dva geny kódující serpiny, zatímco u octomilky (*Drosophila melanogaster*) jich bylo nalezeno 28 a u komára (*Anopheles gambiae*) 14 (Evans et al., 2006).

Zufelato et al. (2004) uvádí pH optimum enzymu fenoloxidas (E.C. 1.14.18.1) při teplotě 20 °C v rozmezí 6,5 až 7, enzym je plně stabilní po 30 min při teplotě 50 °C. Aktivátorem enzymu je trypsin, aktivita je inhibována inhibitory serinových proteas a fenyلكetonmočovinou. Zajímavé je, že teplota v úle se v plodovém období pohybuje kolem 34,5 °C, kdežto teplotní optimum PO je 20 °C. Zufelato et. al. (2004) z toho vyvozuje, že PO není stěžejním prvkem ve včelí imunitě.

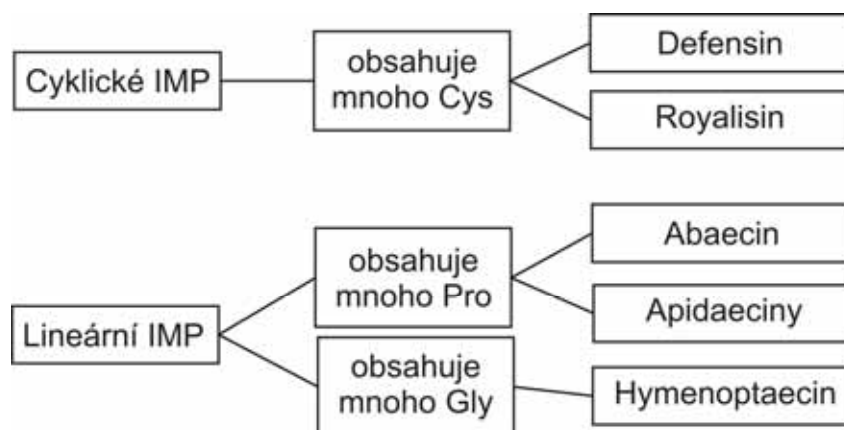


Obr. č. 2: Schéma regulace fenoloxidasové kaskády (upraveno dle Ceresnius a Söderhäll, 2004; Kanost, 2008).

Fenoloxidasová kaskáda není zodpovědná pouze za imunitní reakce včely. Melanin je důležitý pro vývoj včelích kukel, resp. pro sklerotizaci kutikuly, a jeho produkce je řízena hormonálně. Hlavními hormony řídícími metamorfózu hmyzu jsou ekdysteroid a juvenilní hormon. Ekdysteroid, látka steroidní povahy, navozuje svlékání kutikuly, jeho antagonistou je juvenilní hormon (terpenoidní povahy), který udržuje larvální stadium hmyzu. proPO je inkorporována do nově vzniklé kutikuly, PO je aktivována poklesem koncentrace hormonu ekdysteroidu (Bittonti, 1998).

#### 2.2.4 Antimikrobiální peptidy

Nappi a Ottaviani (2000) uvádějí, že u živočichů se nachází na 500 různých antimikrobiálních peptidů (synonymum je imunopeptidů, v dalším textu bude používána zkratka IMP), z toho až 200 imunopeptidů u hmyzu. Wimley a Hristova (2011) už uvádějí, že je známo celkem na 1000 různých IMP. U včely medonosné (*Apis mellifera*) je do dnešní doby popsáno pět IMP, které patří do dvou skupin – cyklické a lineární (Andreu a Rivas, 1998). Přehledně jsou rozděleny v obr. č. 3. IMP jsou syntetizovány v tukovém tělese včel nebo v hemocytech.



Obr. č. 3: Schéma rozdělení jednotlivých včelích imunopeptidů (upraveno dle Andreu a Rivas, 1998).

Spektrum účinku IMP je dosti široké, jsou účinné proti grampozitivním (G+) i gramnegativním (G-) bakteriím, virům i houbám (Cooper, 2006). Včelí imunopeptidy se liší ve svém účinku, apidaecin je účinnější proti G- bakteriím (Casteels et al., 1989) stejně tak i hymenoptaecin (Casteels et al., 1993), na abaecin jsou senzitivnější spíše G+ bakterie (Casteels et al., 1990) a dle Schlünse a Croziera. (2007) vyvolávají expresi abaecinu a hymenoptaecinu pravděpodobně i viry. Defensiny z hemolymfy mají účinnost proti G+ i G- bakteriím a houbám (Klaudiny et al., 2005), royalisin, defensin izolovaný z mateří kašičky, je však převážně účinný proti G+ bakteriím včetně bakterie *Paenibacillus larvae*, původce moru včelího plodu (Fujivara et al., 1990).

#### 2.2.4.1 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Hancock (1997) popisuje účinek kladně nabitých IMP na bakteriální membránu jako elektrostatickou vazbu peptidu na záporně nabitou membránu bakterie, resp. lipopolysacharidy (LPS) na jejím povrchu. Po navázání kladného IMP na membránu bakterie dojde ke změně membránového potenciálu a následně k vytvoření kanálků, kterými mohou procházet i velké molekuly jako jsou menší proteiny, hydrofobní látky atd., čímž dojde k zahubení bakterie (Schen et al., 2010). Apidaecin proniká volně skrze lipidovou membránu bez současného lytického efektu (Piantavigna et al., 2009). Chopra (1997) uvádí, že účinek IMP je selektivní proti prokaryotům, Hancock (1997) píše, že eukaryotické buňky mají nižší membránový potenciál a v cytoplazmatické membráně mají vysoký obsah cholesterolu a méně anionických lipidů než bakterie, proto jsou na IMP senzitivnější prokaryotické buňky. Wimley a Hristova (2011) uvádějí dvě základní hypotézy, na které dosud chybí odpověď: 1. IMP nerozpoznávají eukaryotickou membránu, ale zda prokaryotickou buňku lyzuje závisí na koncentraci nebo 2. IMP selektivně rozpoznává membránu prokaryotické buňky a lépe se na ni váže. Mattiuzo et al. (2007) zjistila, že Bac7, IMP zrodiny peptidů bohatých na prolin a izolovaný ze savčích neutrofilů, do

buňky *E. coli* (G-) vstupuje přes SmbA protein nacházející se na buněčné stěně bakterie, přičemž tento protein je součástí ABC transporteru. Peptidy bohaté na prolin nenarušují buněčnou stěnu bakterie, ale prostupují do bakterie (Benincasa et al., 2009).

Některé IMP jsou však produkovány samotnými prokaryoty, např. *E. coli* tvoří IMP zvané koliciny (Riley a Wertz, 2002). Koliciny jsou kódovány v bakteriálních plasmidech, jejich geny jsou exprimovány hlavně při stresu. Produkce toxinu je letální pro bakterii a některé okolní buňky, které jsou na koliciny citlivé (Papagianni, 2003).

Otvos et al. (2000a) také popisuje silnou interakci mezi IMP a lipopolysacharidy buněčné stěny bakterií s následným průnikem do cytosolu bakterie. Krátké na prolin bohaté IMP se váží specificky na bakteriální DnaK (70 kDa heat shock protein), např. peptid Bac7, a nespecificky na chaperonin GroEL. Podařilo se prokázat, že jeden z IMP pyrrolicin se neváže na lidský analog DnaK protein Hsp70. (Otvos et al., 2000b; Kragol et al., 2001; Scocchi et al., 2009).

Andreu a Rivas (1998) uvádějí, že některé IMP mohou působit i jako pseudosubstráty nebo inhibitory některých enzymů.

#### **2.2.4.2 Rekombinantní antimikrobiální peptidy**

Geny IMP se podařilo exprimovat v bakteriích. Perinerin je peptid z asijského červa *Perineris aibuhitensis*, tento peptid vykazuje účinek proti G+ i G- bakteriím a byl exprimován v *E. coli* (Zhou et al., 2007). Dalším rekombinantním peptidem je plestacin, jenž pochází ze saprofytické houby *Pseudoplectania nigrella*, jeho spektrem účinku jsou G+ bakterie ale především *Streptococcus pneumoniae*. Plestacin byl také exprimován v *E. coli* (Jing et al., 2010). CeropinAD, vykazující antibakteriální a dokonce i protirakovinné účinky, byl exprimován v eukaryotické kvasince *Pichia pastoris* (Jin et al., 2009), v této kvasince byl také exprimován peptid Ch-penaedin pocházející z vodního korýše (Li et al., 2005).

Praktické provedení exprese eukaryotického IMP v bakterii nese jisté komplikace. Bakterie jsou na IMP citlivé a *de facto* jsou i proti nim namířeny. Některé peptidy jsou tedy exprimovány v neaktivní formě prekurzoru peptidu a až při použití je *in vivo* peptid sestřížen do aktivní formy (Ingham a Moore, 2007).

Z výsledků studií o účincích IMP plyne obrovský význam pro farmaceutické použití, protože jejich účinek je vysoce selektivní a dosud na ně nebyla prokázána rezistence (Hancock, 1997) ani vedlejší účinky. Potenciálním problémem při použití IMP jako antibiotických látek je vytvoření multilékové rezistence (MDR, multi drug resistance) bakterií obdobně jako u ostatních antibiotik (Wiradharma et al., 2011).

#### **2.2.4.3 Apidaeciny**

Apidaecin je krátký na prolin bohatý IMP obsahující 18 aminokyselin (AK). Pro aktivaci apidaecinu je nutné odstřížení 8 AK signální sekvence z prekurzoru peptidu. Neaktivní prekur-

sor peptidu se nachází v hemolymfě plodu, u dospělců se tvoří již aktivní IMP bez signální sekvence. K expresi apidaecinu dochází především po infekci, rychlý nárůst transkriptů lze pozorovat přibližně 6 hodin po infekci. Nejvyšší koncentrace apidaecinů byla až 360 µg/ml 36 hodin po imunizaci včel. Exprese apidaecinů pravděpodobně závisí i na celkové kondici včel a míře stresu, jemuž byly vystaveny (Casteels et al., 1989, 1993).

Byla vytvořena cDNA knihovna z mRNA pro apidaeciny, v jedné prekurzorové mRNA jsou 3 introny, některé formy mRNA ale obsahují pouze 2 introny. Alelová diferenciaci nebo rozdílný splicing může být příčinou vzniku 3 rozdílných transkriptů apidaecinů (Casteels et al., 1993).

Na základě analýzy cDNA knihovny bylo zjištěno, že ve včelí hemolymfě se vyskytují geny pro 3 isoformy apidaecinu v poměrném zastoupení: isoforma Ia 5 %, Ib 80 – 90 % a II 5 – 15 %. Výsledky analýzy cDNA korespondují i se zastoupením jednotlivých peptidů v hemolymfě včel (Casteels et al., 1989, Casteels-Josson et al., 1993).

Aminokyselinové sekvence isoform apidaecinů jsou (Casteels et al., 1989):

Ia: GNNRPVYIPQPRPPHPRI

Ib: GNNRPVYIPQPRPPHPRL

II: GNNRPIYIPQPRPPHPRL

Apidaecinům podobné peptidy byly také nalezeny u jiných druhů hmyzu, avšak apidaeciny se liší v antibakteriální specifitě (Casteels a Tempst., 1994a, Casteels et al., 1994b).

C-koncová sekvence PRPPHPRL je vysoce konzervovaná, ale N-koncová část je variabilní. Postupným nahrazováním všech 18 aminokyselin alaninem bylo prokázáno, že odstřižení leucinu nebo isoleucinu na C-konci peptidu vede ke ztrátě antimikrobiální aktivity (Dutta et al., 2008). Mutace na N-koncové polovině peptidu měly jen malý význam na antibakteriální aktivitu proti G- bakteriím. Mutace prolinu za alanin v pozicích 9, 11, 13, 16 a argininu na pozici 17 vedlo ke úplnému potlačení antimikrobiální aktivity proti *E. coli* (G-), mutace téhož argininu měla stejný vliv i na *M. luteus* (G+) (Czihal a Hoffmann, 2009). Různé typy apidaecinů se liší především v antibakteriální specifitě, byly objeveny u včel, čmeláků, cikád a dalšího hmyzu (Li et al., 2006)

#### 2.2.4.4 Abaecin

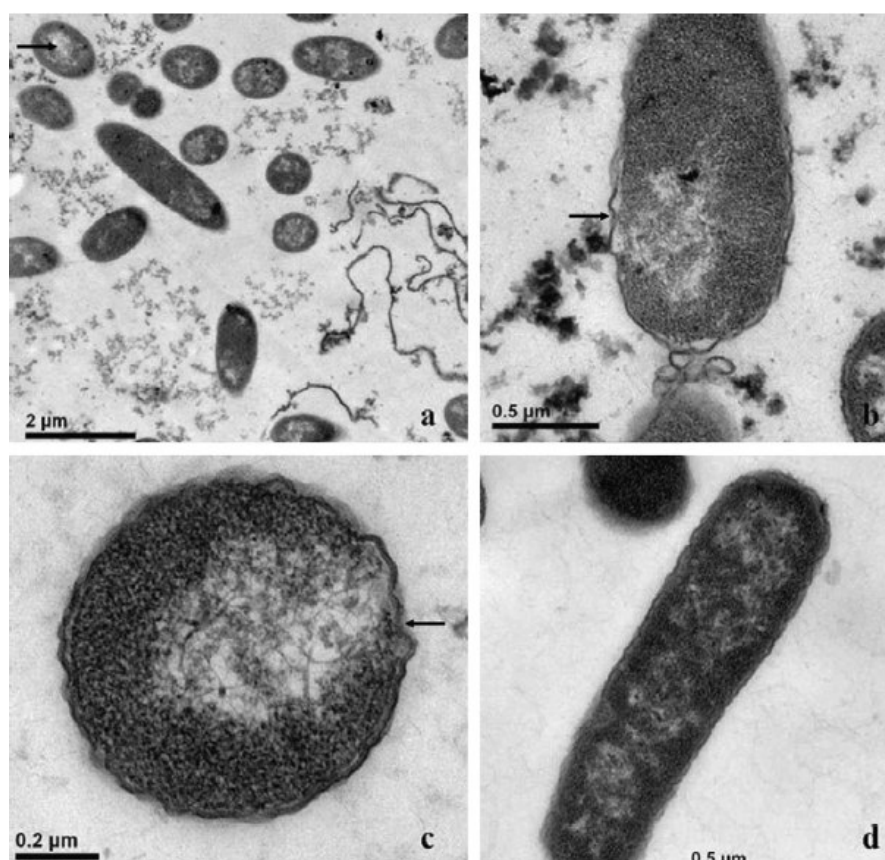
Abaecin se skládá z 34 AK, je z rodiny peptidů obsahujících větší množství prolinu. Prekurzor abaecinu je delší o 19 AK, které se při aktivaci peptidu odštěpí. V neaktivní formě se peptid nachází u jak u dospělých včel, tak i u plodu (Casteels et al., 1990; Casteels-Josson et al., 1994).

Aminokyselinová sekvence abaecinu je (Casteels et al., 1990):

YVPLPNVPQP GRRPFPTFPQ QGPFNPKIKW PQGY

Abaecin je účinný proti G+ i G- bakteriím, avšak proti G- bakteriím je méně účinný než apidaecin (Casteels et al., 1990). Evans (2004a) uvádí, že abaecin inhibuje růst *Paenibacillus larvae* způsobující onemocnění mor včelího plodu. Gen pro abaecin se exprimuje během 24 hod po infekci a míra exprese nezávisí na stáří larvy. Schlüns a Crozier. (2007) uvádí, že k expresi abaecinu dochází i po expozici umělé dsRNA.

Peptid PP30 byl objeven v chalcidce *Pteromalus puparum*. Tento peptid je sekvečně podobný abaecinu. Je účinný proti G- bakteriím, nelyzuje lidské erytrocyty (Schen et al., 2010). Obr. č. 3 ukazuje, jak peptid PP30 působí na membránu *E. coli*. Peptid byl také nalezen v hemolymfě čmeláka zemního (*Bombyx mori*), u něhož je tento peptid O-glykosylován, kdežto včelí abaecin glykosylován není (Hara a Yumakawa, 1995).



Obr. č. 4: Fotografie z elektronového transmisního mikroskopu. Obrázky a až c znázorňují strukturní změny na membráně *E. coli* po působení peptidu PP30. Obrázek d je kontrola. Šipky označují trhliny v buněčné stěně (převzato z Schen et al., 2010).

Gregory et al. (2005) kvantifikovala mRNA abaecinu a defensinu metodou PCR u kukel nakažených kleštíkem včelím (*Varroa destructor*). Jejich výsledky poukazují na snížení exprese mRNA abaecinu a defensinu po naze kleštíkem. Je pravděpodobné, že je kleštík schopen redukovat imunitní odpověď, zatímco saje hemolymfu vyvíjejícího se plodu. Nebyl také zjištěn

vztah mezi mírou exprese peptidů a hmotností kukly. Dle studie Casteelse et al. (1989) se však v hemolymfě kukel nenacházejí peptidy v aktivní formě, ale pouze jako prekurzory. Decanini et al. (2007) zjišťoval heritabilitu (dědivost) exprese abaecinu ( $h^2 = 0,3 - 0,4$ ), z čehož vyvozují, že sledování míry exprese abaecinu by mohlo vést k selekci potenciálně odolných včelstev.

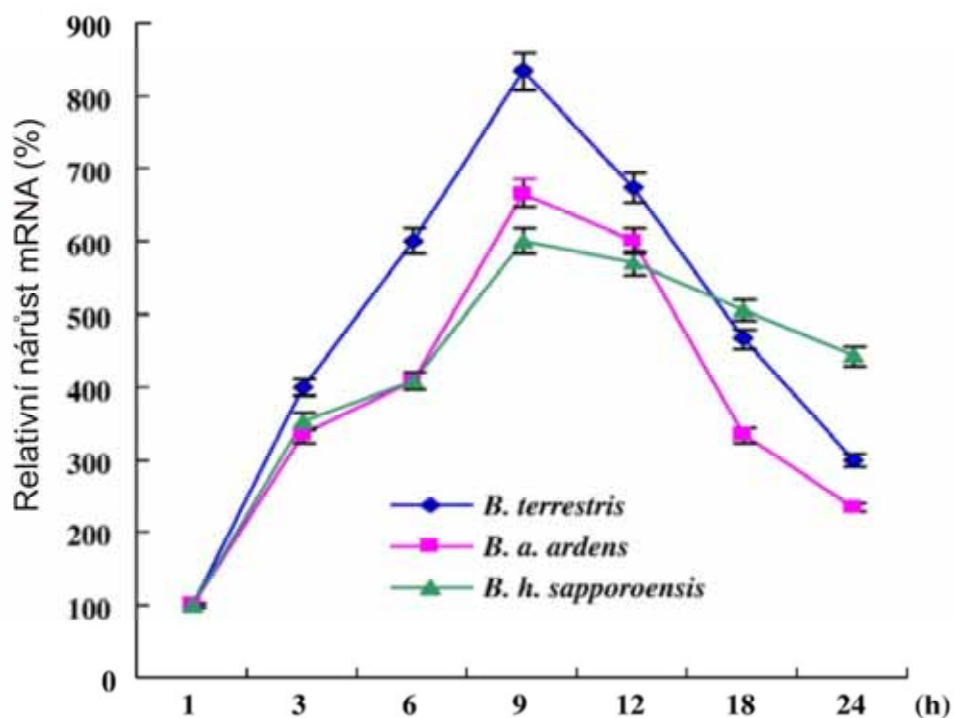
#### 2.2.4.5 Defensin

Defensiny patří mezi peptidy bohaté na cystein, složeny jsou z 36 – 51 aminokyselin. Struktura je tvořena smyčkou z  $\alpha$ -helixu a dvěma antiparalelními  $\beta$ -skládanými listy, které jsou stabilizovány třemi disulfidickými můstky (Klaudiny et al., 2005).

Defensiny se nacházejí u rostlin i u živočichů. U člověka se defensiny vyskytují v granulocytech a sliznici dýchacího ústrojí, působí proti G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím a dokonce i proti některým houbám (Klaudiny et al., 2005; Papagianni, 2003). O expresi genu pro včelího defensinu se také zmiňuje Gregory et al. (2005).

U včel byly popsány dva geny kódující defensiny, gen pro defensin1 kóduje dva známé peptidy: royalisin, defensin mateří kašičky a defensin nacházející se v hemolymfě včel, expri-movaný po bakteriální infekci. Gen pro defensin2 byl popsán pouze na úrovni mRNA, ale příslušný peptid nebyl dosud detekován. (Casteels-Josson et al., 1994; Klaudiny et al., 2005).

Yoon et al. (2009) uvádí, že gen pro čmeláčí defensin obsahuje celkem 3 exony. Analýzou exprese defensinu v tukovém tělese včel bylo zjištěno, že jeho exprese je indukována lipopolysacharidy (LPS).



Obr. č. 5: Expresa defensinu u různých druhů čmeláka po umělé imunizaci lipopolysacharidy (převzato a upraveno dle Yoon et al., (2009)).

#### 2.2.4.6 Hymenoptaecin

Hymenoptaecin byl u včel identifikován Casteelsem et al. (1993), jedná se o peptid o velikosti 10,5 kDa s účinkem převážně proti G- bakteriím. Spektrem účinku je podobný apidaecinu, ovšem k jeho expresi dochází i po vystavení včel syntetické dsRNA, podobně jako u abaecinu (Schlüns a Crozier, 2007).

#### 2.2.4.7 Jelleiny

Jako jelleiny se označuje skupina IMP izolovaných z mateří kašičky, tyto peptidy jsou účinné proti G+ i G- bakteriím a dokonce i proti kvasinkám (Fontana et al., 2004, Romanelli et al., 2011). O těchto peptidech je toho však dosud známo jen velmi málo.

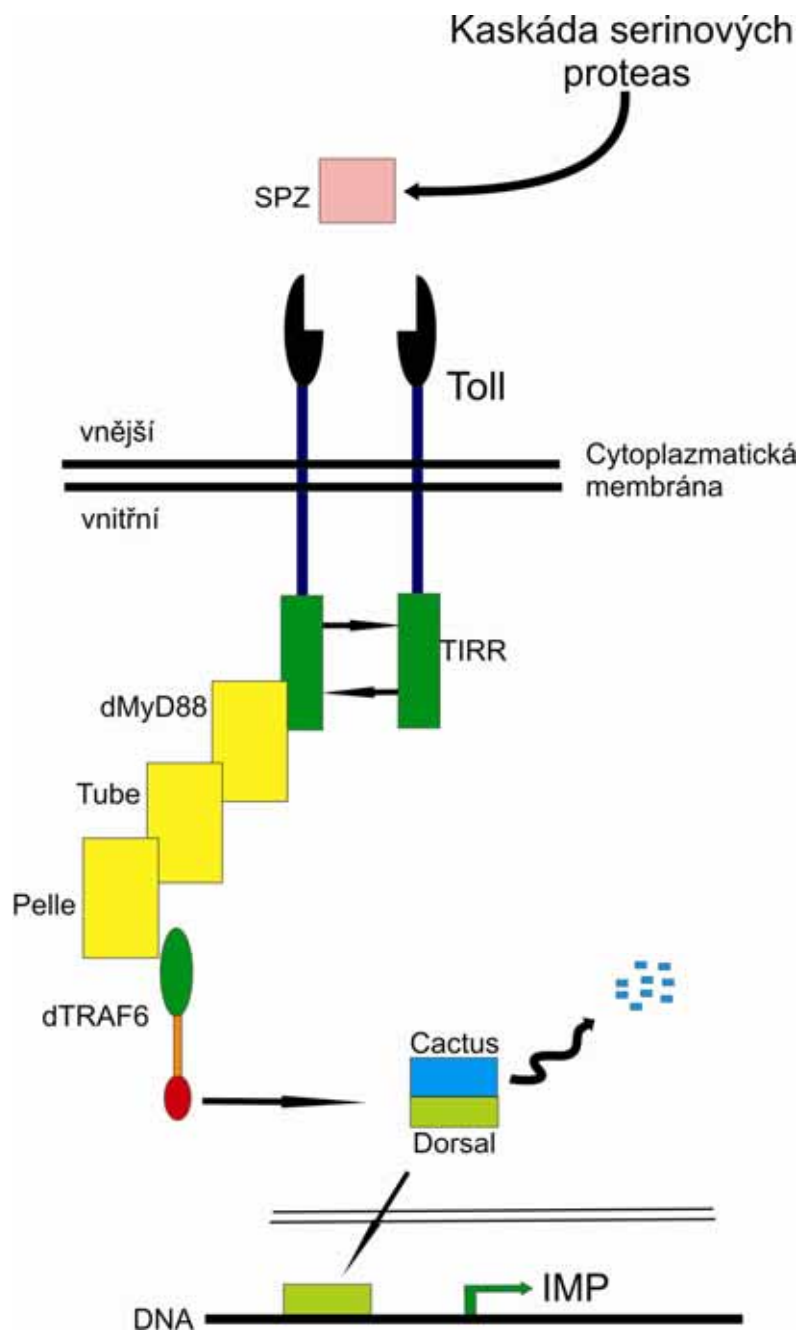
### 2.3 Signální dráhy imunitní reakce

Hmyzí signální dráhy jsou studovány především na octomilce (*Drosophila melanogaster*) a komárovi *Anopheles gambiae*. Geny imunitní signální dráhy včely jsou orthologní s octomilkou i komárem *Anopheles gambiae*. U včel je potvrzeno několik drah: Toll signální dráha, Imd signální dráha, JAK/STAT signální dráha a JNK signální dráha (Evans et al., 2006).

#### 2.3.1 Toll signální dráha

Toll a Toll-like receptory (TLR) jsou převodníkem signálu mezi vnější a vnitřní stranou buněčné membrány a jsou orthologní pro lidské TLR a receptory TNF signální dráhy, které jsou také zodpovědné za imunitní reakce organismu (Beutler a Hoffmann, 2004). V signální dráze octomilky dochází ke spouštění Toll signální dráhy pomocí tzv. Spätzle proteinu, který se v genomu octomilky nachází asi ve 3 různých alternativách (Parker et al., 2001). U včely byly nalezeny dva geny orthologní ke genům pro Spätzle proteiny octomilky. Po vazbě Spätzle proteinu na TLR dojde ke konformační změně Toll receptoru (dimerizace) a následné degradaci inhibitoru IκB. Degradace IκB (Cactus) způsobí translokaci NF-κB (Dorsal) do jádra (Royet et al., 2005), kde působí jak transkripční faktor. Dva homologní geny pro Dorsal se také nacházejí ve včelím genomu (Evans et al., 2006). Tato signální dráha spouští expresi genů pro IMP, melanizaci a lysozymy. Schlüns a Cronzier (2007) uvádějí, že geny defensinu1 jsou u včel regulovány Toll dráhou, na rozdíl od octomilky, kde jsou regulovány Imd signální dráhou.





Obr. č. 6 : Schématické znázornění Toll signální dráhy. Spätzle protein (SPZ) je aktivován kaskádou serinových proteas, následně se SPZ naváže na receptorovou doménu Toll, čímž dojde k dimerizaci TIRR. Dochází k přenosu signálu přes proteiny dMyD88, Tube, Pelle až ke kinase dTRAF6, která fosforyluje protein Cactus, ten je degradován; transkripční faktor Dorsal je translokován do jádra, kde aktivuje expresi genů pro IMP (upraveno dle Evans et al., 2006; Wang a Ligoxygakis, 2006).

### 2.3.2 Imd dráha

Imd signální dráha je aktivována proteiny rozpoznávajícími peptidoglykany (PGRP) a je specifická pro antibakteriální imunitní odpověď (Hultmark, 2003). Imd signální dráha je homo-

logní k signální dráze TNF u živočichů (Wang et al., 2006). V octomilce tato dráha indukuje aktivaci mnoha složek humorálního imunitního systému, zejména exprese genů IMP. Imd dráhu spouští především G- a některé G+ bakterie. Imd signální dráha aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B zvaný Relish, který se translokuje do jádra. Imd signální dráha může také aktivovat části JAK/STAT signální dráhy (Boutros et al., 2002), jejíž geny byly v genomu včely také identifikovány (Evans et al., 2006). Protein Relish je transkripčním faktorem pro geny abaecinu a hymenoptaecinu (Schlüns a Crozier, 2007). Kromě aktivace Relish proteinu vede Imd signální dráha i k aktivaci JNK signální dráhy, jejímž výsledkem je apoptóza, případně melanizace nebo regulace exprese imunopeptidů (Evans et al., 2006).

### **2.3.3 JAK/STAT signální dráha**

JAK/STAT signální dráha je spouštěna virovými částicemi (Evans et al., 2006), pravděpodobně vede k vysoké proliferaci hemocytů a následnému spuštění fagocytózy. JAK/STAT dráha je u octomilky spouštěna extracelulárním glykosylovaným proteinem Upd. Na povrchu buňky se nachází protein Domeless, což je cytokinový receptor, následně dojde k aktivaci JAK (Hopscotch), která aktivuje STAT (Stat92E). Geny pro Upd protein však nebyly v genomu včely nalezeny (Evans et al., 2006).

## **2.4 Závislost imunitní odpovědi na vývojovém stádiu včely**

Wilson-Rich et al. (2008) zjistili, že existují rozdíly v imunitní odpovědi u různých vývojových stádií včel, což bylo potvrzeno pro parametry jako aktivita PO, počet hemocytů a velikost tukového tělesa. Larvy a kukly mají vyšší počet hemocytů a nižší aktivitu PO než dospělé včely. Enkapsulace patogenních částic zůstává konstantní. Včely kojičky mají větší tukové těleso než létavky, což může znamenat vyšší schopnost tvořit antimikrobiální peptidy. Bedick et al. (2001) publikovali, že míra nodulace, jako buněčné odpovědi imunitního systému, není konstantní po celou dobu života včely.

Podobné výsledky publikovali i Schmid et al. (2008), kteří pozorovali snížený počet hemocytů u včel ve srovnání s plodem, aktivita PO se však liší mezi jednotlivými kastami včel (matka, trubec, dělnice). Množství enzymu kontinuálně roste s věkem dělnice. U trubce množství PO nepatrně klesá. Snížení množství hemocytů také není specifické jen pro dělnice, nýbrž pro všechny kasty včel.

Kojičky jsou více vystaveny infekčnímu tlaku než zbylé úlové včely, jednak krmí plod a také se starají o čistotu v úlovém prostředí, např. likvidují uhynulé kukly.

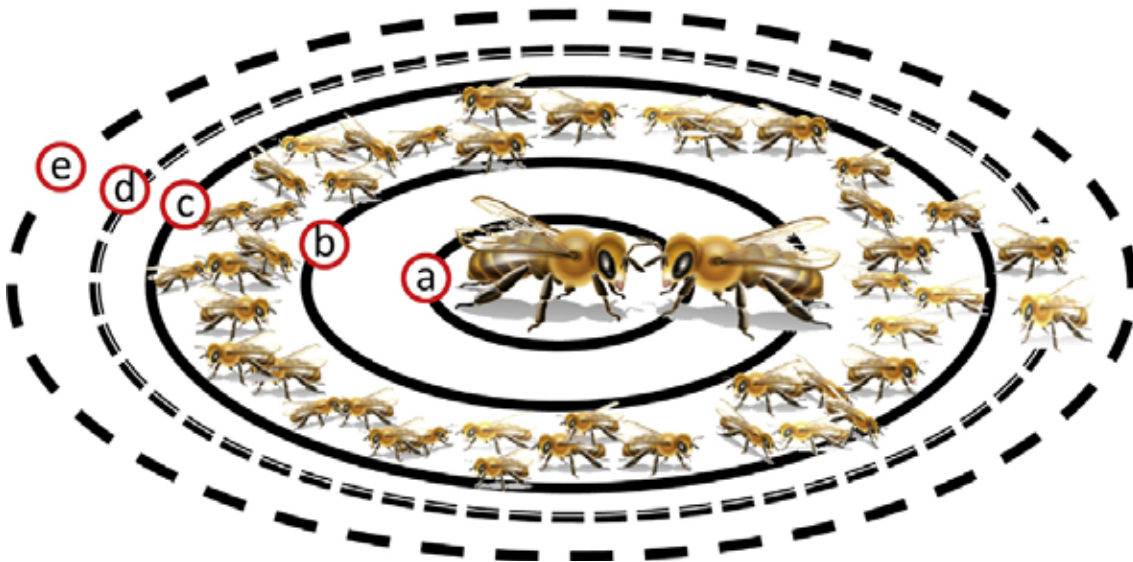
Při testování exprese genů pro IMP bylo zjištěno, že propolis snižuje imunitní odpověď včel, pravděpodobně je to způsobeno jeho samotnou antibakteriální funkcí (Simone et al., 2009).

## 2.5 Další složky obranyschopnosti včelstva

Včelstvo jako superorganismus má i další možnosti obrany před patogeny. Mezi hlavní patří čistící pud, což je geneticky podmíněná vlastnost. Včelstva s vysokým čistícím pudem jsou schopna rychle a efektivně vyklízet uhynulý plod a včely z prostoru úlu (např. na virové nebo bakteriální choroby). Díky tomu se ve včelstvu snižuje infekční tlak a zvyšuje potenciální šance na přežití včelstva (Wilson-Rich et al., 2009). Je prokázána účinnost propolisu na inhibici růstu různých včelích patogenů, např. *Paenibacillus larvae* (Antúnez et al., 2008).

S výjimkou Austrálie je po celém světě rozšířena varroóza včel, snahou chovatelů je šlechtit včely odolné proti této parazitóze. Jedním z hledisek posuzování tzv. varroatolerance včelstev je parametr VSH, neboli Varroa Sensitive Hygiene (česky překládáno jako hygiena namířená proti kleštíkoví). Princip VSH je rozpoznání kukly nakažené kleštíkem včelím, dospělé včely pak takto nakaženou kuklu odstraní, čímž dojde také ke snižování populace kleštíka. Likvidace samotného včelího plodu je zanedbatelná vzhledem k eliminaci populace kleštíka (Harbo a Harris, 2009).

Za určitých podmínek může být obranyschopnost včelstva značně oslabena. Hlavní příčinou bývá stres, který může mít více původců – např. časté rušení včelařem, hladovění, nedostatek vody nebo nedostatek jedné ze složek potravy (pyl). Může však dojít i k oslabení imunitní odpovědi jednotlivých včel. Již bylo prokázáno, že na vitalitu včel mají velký vliv používané pesticidy v zemědělské výrobě, v dnešní době hlavně neonikotinoidy. Výsledky jednotlivých studií se však často ve svých závěrech diametrálně odlišují (Garwood, 2010).



Obr. č. 7: Schéma obranyschopnosti včelstva; a – individuální imunita jednotlivé včely, b – párová obranyschopnost (např. grooming); c – obrana celého včelstva před patogenem (VSH hygieny), d – minimalizace možnosti vniknutí patogenu do prostředí úlu; e – používání dalších ochranných prostředků, např. propolisu k desinfekci prostoru úlu (převzato a upraveno dle Evans a Spivak, 2010).

### 3 Metody analýzy imunopeptidů

S postupným poklesem účinku používaných antibiotik a vzniku rezistentních kmenů bakterií proti antibiotikům jsou imunopeptidy předmětem výzkumu stále častěji (Reddy et al., 2004). Včelí imunopeptidy (IMP) byly poprvé popsány a izolovány z uměle imunizovaných včel na počátku 90. let 20. století.

#### 3.1 Obecná identifikace imunopeptidů

Imunopeptidy jsou izolovány z různých živočichů i rostlin či jejich částí. Obecná strategie detekce IMP spočívá v postupném rozdělování homogenátu připraveného z biologického vzorku a testování antimikrobiální aktivity jednotlivých frakcí. Otestované frakce jsou dále děleny různými metodami, nejčastěji chromatografickými, dokud se ve frakci nenachází jen jeden aktivní peptid. Izolovaný peptid s prokázanou antimikrobiální aktivitou je sekvencován nejčastěji technikou Edmanova odbourávání. Identifikovaný peptid je podle zjištěné sekvence uměle syntetizován a dále podroben studiu účinku antimikrobiální aktivity a případně také cytotoxicity. Práce jsou směřovány do farmaceutického využití antimikrobiálních peptidů (Čeřovský et al., 2007, 2008a, 2008b).

#### 3.2 Analýza peptidů včel

Při analýzách imunopeptidů byly včely nejdříve imunizovány pro vyvolání imunitní odpovědi. Včely byly imunizovány bakteriemi, vybranými kmeny *E. coli*, poté byla včelám odebrána hemolymfa, která byla purifikována za využití denaturační schopnosti kyseliny trifluoroctové (TFA). Zástupci včelích IMP apidaecin, abaecin a hymenoptaecin jsou velice stabilní, proto bylo možné do procesu purifikace těchto peptidů zařadit i další krok denaturace varem, při níž byly odstraněny další balastní proteiny. Následně byla směs separována pomocí metody HPLC na reverzní fázi na C<sub>4</sub> koloně a poté byly vybrané frakce dále analyzovány metodou HPLC na C<sub>18</sub> koloně (Casteels et al., 1989, 1990, 1993). Takto byly ve včelí hemolymfě detekovány apidaecin, abaecin a hymenoptaecin, byla zjištěna i jejich aminokyselinová sekvence. Ostatní práce zabývající těmito třemi IMP se odkazují na výše zmíněné první práce skupiny Casteels et al.

Bachanová et al. (2002) uvádí metodu detekce IMP royalisinu z mateří kašičky, hrudníků a hlav včel založenou na migraci peptidů v elektrickém poli s využitím polyakrylamidové plošné gelové elektroforézy (PAGE). Purifikace peptidů je odlišná od metody použité Casteelsem et al. (1989, 1990, 1993). Pro extrakci IMP z mateří kašičky, hlav a hrudníků včel byl použit sukcinátový pufr. Byla optimalizována elektroforéza s následným přenosem peptidů na membránu blotováním a vybrané zóny byly sekvencovány N-koncovou Edmanovou degradací.

Některé metodiky extrakce IMP z různých biologických vzorků zařazují jako první krok jednu z nízkotlakých chromatografických metod, např. gelovou filtraci, a poté frakce dále analyzují metodou HPLC. Jako v případě extrakce IMP z hadího jedu (Gomes et al., 2005). Také jsou používány kombinace chromatografické metody a elektroforézy, případně přenosu na membránu, např. extrakce peptidu apisiminu (který ovšem není imunopeptidem) z mateří kašičky včel (Biliková et al., 2002).

Metoda detekce IMP kombinující metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí byla použita v práci Fontana et al. (2004). Směs IMP byla ovšem izolována z mateří kašičky, nikoli z hemolymfy včel. Purifikovaná směs byla nejprve rozdělena HPLC na C<sub>18</sub> koloně, vybrané frakce byly manuálně sbírány a analyzovány hmotnostní spektrometrií metodou Q-TOF MS/MS umožňující určení sekvence peptidů.

MALDI-TOF metoda byla využita pro identifikaci peptidů z ganglií a mozku včel bez předchozí purifikace (Boerjan et al., 2010). Mozek a ganglia byly odpreparovány, homogenizovány a centrifugovány, před samotným nanesením na MALDI destičku byly vzorky pouze odso- leny pomocí špiček ZipTip se sorbentem C<sub>18</sub>. MALDI-TOF metoda byla také využita pro analýzu peptidů ze žláz s vnitřní sekrecí (corpora cardiaca a corpora allata), žlázy byly odpreparovány, homogenizovány a před hmotnostně spektrometrickou analýzou rozděleny pomocí HPLC na reverzní fázi C<sub>18</sub> (Audsley et al., 2006).

Kvantitativní proteomika byla využita pro sledování několika proteinů v imunitní dráze, IMP se však mezi sledovanými analyty nenacházejí. Pro kvantifikaci byla využita metoda LC-MS/MS s použitím hmotnostního analyzátoru OrbitrapXL (Chan et al., 2009). V této práci jsou proteiny kvantifikovány za využití značených peptidů (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O a C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) z tryptického štěpení proteinů.

Práce zabývající se problematikou IMP v hemolymfě včel obsahují také metody molekulárně-biologické. Evans et al. (2004) využívá kvantitativní PCR pro zjištění míry exprese mRNA abaecinu a defensinu. Klaudiny et al. (2005) zjišťuje míru exprese defensinu I za využití RT-PCR.

## **Experimentální část**

## 4 Materiál

### 4.1 Chemikálie

- Sigma-Aldrich: SDS-PAGE Marker – Ultra Low range, SDS-PAGE Marker – High range, trifluoroctová kyselina, kyselina mravenčí – MS kvalita, fenylthiomočovina
- Penta: thiosíran sodný
- 3M: sorbent EMPORE 3M C<sub>8</sub>, sorbent EMPORE 3M SCX
- Anaspec: apidaeciny Ia a Ib
- Peptide 2.0: standard abaecinu
- Roche: Pefabloc SC
- Fluka: kyselina mravenčí, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, močovina,
- J.T. Baker: acetonitril HPLC grade, methanol HPLC grade
- Serva: Amberlite IRC 50, CG 50, CG 120II
- GE Healthcare: DEAE Sephadex A-25
- MP Biomedicals: Tris – ultra čistý, N,N'-metylen-bis-akrylamid – ultra čistý, akrylamid – ultra čistý
- Thermo-Scientific: kit MemCode™
- Bio-Rad: Bio-Safe Coomassie, N,N,N',N'-tetrametylendiamin, persíran amonný, dodecyl síran sodný, filtrační papír pro blot, polyvinylidendifluoridová membrána, nitrocelulózová membrána
- Bruker-Daltonics:  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
- Lach-Ner: aceton p.a., kyselina chlorovodíková 35% p.a., hydroxid sodný p.a., glycin p.a., n-butanol p.a., isopropanol, glycerol

### 4.2 Biologický materiál

Vzorky včel používané v praktické části diplomové práce pocházejí ze soukromé včelnice Bc. Jiřího Danihlíka z Valašského Meziříčí a ing. Květoslava Čermáka, CSc. z Petrušova.

### 4.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Dark Blue transiluminátor (Clare Chemical Research, USA)

Digitální pH metr MV-87 (Practitronic, Německo)

Digitální předvážky (OHAUS, USA)

Dokumentační systém UVP Biospectrum 410 (UVP, Velká Británie)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, ČR)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)  
HPLC kolonový termostat (Croco-Cil™)  
HPLC system s detektorem diodového pole (Knauer, Německo)  
Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)  
Lyofylizátor Lyovac GT-2 (Leybold-Heraeus, Německo)  
Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker-Daltonics, Německo)  
Q-TOF MAXIS UHR-Q –TOF (Bruker Daltonics)  
Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR)  
Vision works LS (UVP, Velká Británie)  
Vortex (Stuart, UK)  
Zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad, USA)



## 5 Metody

### 5.1 Imunizace včel

Včely byly imunizovány 1  $\mu$ l suspenze o koncentraci  $5 \times 10^4$  bakterií *Escherichia coli* (NCTC 9001) v PBS (0,15M PBS, pH 7,2) (Casteels, 1989). K imunizaci jednotlivých včel byla použita Hamiltonova pipeta s ostrou špičkou. Byl proveden vpich na ventrální straně hrudníku do hrudních svalů včely a injektován 1  $\mu$ l bakteriální suspenze. Infikované včely byly uchovány v klíčkách při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté byly včely utraceny v tekutém dusíku a dále zpracovány.

### 5.2 Mikrobiologický rozbor na spory moru včelího plodu

Mikrobiologický rozbor na prokázání výskytu spor moru včelího plodu byl proveden ve Státním veterinárním ústavu v Olomouci ze směsného vzorku 25 včelstev na stanovišti v zimní měli. Na základě rozboru byl vydán veterinární atest pro přesun včel ze dne 16. 4. 2010, číslo: CZ 10-S-72025-090.

### 5.3 Elektroforéza IMP včel

Byla provedena elektroforéza standardů peptidů a vzorků. Jako standard molekulových hmotností byl zvolen komerční marker – Ultra-Low Range Molecular Weight Marker (ULMW) (Sigma-Aldrich), s rozpětím molekulových hmotností od 1,060 do 26,600 kDa. Složení markeru: triosafosfát isomerasa z králíka (26600 Da), myoglobin z koňského srdce (17000 Da),  $\alpha$ -laktalbumin z kravského mléka (14200 Da), aprotinin z hovězích plic (6500 Da), insulin řetězec B (3496 Da), bradykinin (1060 Da). Vzhledem k velikosti sledovaných peptidů byla zvolena tricínová elektroforéza v 16% polyakrylamidovém gelu a tricínová elektroforéza v 16% polyakrylamidovém gelu s přidavkem 6M močoviny. Protokol vychází z postupu dle Schäggera a von Jagova (1987). Iniciační napětí při elektroforéze bylo 50V a separační 120V, aparatura byla chlazená v chladničce.

Tab. č. 1: Přehled standardů peptidů a proteinů použitých při optimalizaci elektroforézy.

<b>Název</b>	<b>Molekulová hmotnost (kDa)</b>
Trypsin	23,0
Lysozym	14,3
Cytochrom c	12,4
Aprotin	6,5
Insulin	3,5
Bradykinin	1,1
Apidaecin	2,1
Abaecin	3,8

### 5.3.1 Příprava vzorků a standardů

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny homogenizací celých včel. Včely byly homogenizovány v tekutém N<sub>2</sub>(l), následně byl homogenát extrahován do 0,1% TFA s 1μM Pefablocem SC; na jednu včelu ve vzorku bylo zvoleno 0,5 ml extrakčního roztoku. Po extrakci byl vzorek centrifugován 10 000 xg 10 min, 4 °C, supernatant byl následně zfiltrován.

Vzorky byly před nanesením na gel inkubovány se vzorkovacím puftrem (Schägger a von Jagov, 1987) v poměru 2:1. Vzorek byl inkubován s puftrem 10 min při 60 °C. Na jamku bylo naneseno 5 μl vzorku nebo standardů peptidů.

Metoda byla vyvíjena se zakoupenými standardy IMP – apidaecinu a abaecinu, dále byly použity další peptidy s malou molekulovou hmotností, jak uvádí tab. č. 1, a komerční směsi proteinových markerů Ultra-Low Range Marker, Sigma Marker High Range.

### 5.3.2 Barvení gelů po elektroforéze

#### 5.3.2.1.1 Coomassie barvení

Složení roztoků pro Coomassie barvení vychází z postupu dle Schäggera (2006). Gel byl nejprve 1 hodinu fixován v roztoku obsahujícím 50% methanol a 10% kyselinu octovou. Samotné barvení gelů proběhlo v roztoku 0,025% Coomassie G-250 v 10% kyselině octové. Po obarvení byl gel několikrát propláchnut v 10% kyselině octové a deionizované vodě. Odbarvení lze provést ve směsi 50% methanolu, 50mM NaHCO<sub>3</sub> a 10% kyseliny octové.

#### 5.3.2.1.2 Stříbrné barvení

Postup stříbrného barvení vychází z postupu dle Schäggera (2006). Gel byl nejprve fixován 30 min ve fixačním roztoku (50% methanol, 10% kyselina octová), poté byl gel 2x promyt v deionizované vodě. Pro zvýšení citlivosti byl gel inkubován 15 – 60 min. v 0,005% roztoku thiosíranu sodného. Inkubace v 0,1% AgNO<sub>3</sub> trvala stejně dlouhou dobu jako inkubace ve fixačním roztoku. Poté byl gel promyt deionizovanou vodou. Vyvolání gelu probíhalo 1 – 2 min.

v roztoku obsahujícím 0,036% formaldehyd a 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Vyvíjení gelu bylo ukončeno oplachem gelu v 50mM EDTA (16 – 60 min.)

#### **5.3.2.1.3 Rychlé koloidní barvení na Coomassie**

Barvicí roztok obsahoval 2% Coomassie G-250 a 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po rozpuštění Coomassie G-250 byl k roztoku přidáno 220 ml 10M NaOH. Nakonec bylo k barvicímu roztoku přimícháno 310 ml 100% trichloroctové kyseliny. Barvení probíhalo 3 hod při teplotě 50°C (Westermeier, 2006).

### **5.4 Western blotting**

Pro blotting bylo zvoleno uspořádání tank-blot. Byla použita nitrocelulózová (NC) nebo polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána. Blotovací pufr obsahoval 0,025M TRIS, 0,192M glycin, 20% methanol, pH 8,3. Pro blotování byl použit konstantní proud 0,8 mA.cm<sup>-2</sup> po dobu minimálně 3 hodin.

#### **5.4.1 Barvení membrán po blotingu**

##### **5.4.1.1.1 Barvení kitem MemCode™**

Kit MemCode™ (Pierce) je určen k barvení NC membrán. Membrána byla ponořena na cca 30 sekund do barvicího roztoku kitu.

##### **5.4.1.1.2 Barvení amidočerní**

Membrána byla ponořena na 2 - 4 min. do roztoku obsahujícího 0,1 % (w/v) amidočerně 10B ve směsi methanol : kyselina octová : voda v poměru 45 : 10 : 45. Odbarvení bylo provedeno methanolem.

### **5.5 Chromatografické metody**

Pro analýzu včelích IMP byly optimalizovány chromatografické metody. Byla vyzkoušena chromatografie na reverzní fázi a iontoměničová chromatografie, která využívá rozdílného isoelektrického bodu analyzovaných peptidů a balastních proteinů. V následující tab. č. 2 jsou uvedeny isoelektrické body (pI) včelích antimikrobiálních peptidů, na které je práce zaměřena a isoelektrický bod jejich peptidových prekurzorů. Bradykinin byl použit jako kontrolní standard k optimalizaci metod, protože se tento peptid ani jeho prekurzor v organismu včel nevyskytuje. Chromatografické metody byly prováděny na přístroji Knauer s UV/VIS detektorem diodového pole (PDA).

Tab. č. 2: Isoelektrické body peptidů

Peptid	pI prekurzoru peptidu	pI peptidu
apidaecin	10,27	11,71
abaecin	10,19	10,45
bradykinin	-	9,75

## 5.6 Zpracování vzorků

### 5.6.1 Vzorky pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii s reverzní fází bez iontoměničové předseparace

Byly vyzkoušeny dva způsoby zpracování – odběr hemolymfy jednotlivých včelám pomocí Hamiltonovy pipety a homogenizace celých včel.

#### Zpracování vzorků hemolymfy

Hemolymfa byla odebírána Hamiltonovou pipetou s ostrou špičkou z dorzální části zadečku včely. Z jedné včely bylo možno odebrat 2 – 8  $\mu$ l hemolymfy. K odebrané hemolymfě byl přidán alikvotní podíl 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) s 1 $\mu$ M Pefabloc SC, směs byla centrifugována 10 min. při 16500 xg. Supernatant byl nanesen přímo na kolonu nebo denaturován varem 5 min. 100 °C.

#### Zpracování homogenátu včel

Včely byly zamrazeny v tekutém dusíku a rozmělněny na třecí misce. K homogenátu byla přidána 0,1% TFA s 1 $\mu$ M Pefabloc SC v poměru 1 včela : 0,5 ml 0,1% TFA. Homogenát byl zfiltrován a centrifugován 10 min. při 16500 xg. Supernatant byl nanesen přímo na kolonu nebo navíc denaturován varem 5 min. při 100°C

### 5.6.2 Vzorky pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii s reverzní fází v kombinaci s iontoměničem

Použitý postup zpracování vzorků vychází z prvotních výsledků analýzy metodou HPLC bez iontoměničové chromatografie.

Včely byly zamrazeny v tekutém dusíku a rozmělněny na třecí misce. K homogenátu byla přidána 0,1% TFA v poměru 1 ml 0,1% TFA na 1 včelu. Homogenát byl zfiltrován a centrifugován 10 min. při 16500 xg. Odpipetovaný supernatant byl denaturován varem 5 min. při 100 °C. Kvůli lepšímu zakoncentrování vzorků byl supernatant lyofilizován a následně rozpuštěn v příslušném rozpouštědle (uvedeno dále u jednotlivých modifikací iontoměniče) v poměru 1 : 10 (objem po lyofilizaci : objemu před lyofilizací).

## 5.7 Iontoměničová předseparace vzorků

### 5.7.1 Purifikace vzorku aniontoměničovou extrakcí na pevné fázi

Pro purifikaci koncentrovaného vzorku byla použita aniontoměničová extrakce na pevné fázi (SPE). Byly použity a slabé (WAX) aniontoměniče. Kolonky byly plněny 1 ml aniontoměničového sorbentu. Byly použity sorbenty DEAE Sephadex A-25 (GE Healthcare) a TEAE celuloza. Sorbenty byly ekvilibrovány 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% MeOH o pH 9. Na kolonku bylo naneseno 100  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu rozpuštěného v 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% MeOH, následně byla kolonka promyta 2 ml 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% MeOH pH 9. Při použitím pH pufru se zkoumané IMP nezachytí na koloně, ale protečou kolonou v mobilní fázi. Spojené eluáty z kolonek byly odpařeny na centrifugační odparce při 60 °C. Před nanesením na kolonu s reverzní fází byly vzorky rozpuštěny ve 150  $\mu\text{l}$  mobilní fáze se složením totožným jako složení mobilních fází na počátku gradientu použité metody HPLC. Pro analýzu byla použita kolona Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4 $\mu\text{m}$ , C<sub>12</sub>), na kterou bylo naneseno 50  $\mu\text{l}$  rozpuštěného vzorku nebo standardu.

### 5.7.2 Purifikace vzorku kationtoměničovou extrakcí na pevné fázi

Pro kationtoměničovou purifikaci na pevné fázi (SPE) vzorku byly použity následující sorbenty: slabé kationtoměniče (WCX) Amberlite CG50, Amberlite IRC 50 a silný kationtoměnič (SCX) Amberlite CG 120 II (Serva).

#### Varianta 1

V kolonce bylo použito 1 ml sorbentu. K ekvilibraci kolonky byla použita 5% kyselina mravenčí (FA). Na kolonku bylo naneseno 100  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu rozpuštěného v 5% FA. Promytí kolonky bylo provedeno 5% FA, eluce 2 ml 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

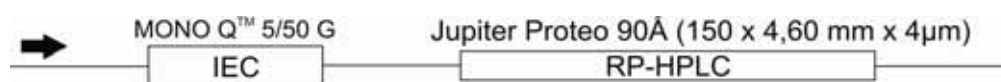
#### Varianta 2

K ekvilibraci kolonky byl použit 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 2,5% methanolem, pH 9. Frakce 1 byla eluována 30mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% obsahem MeOH, pH 10, frakce 2 byla eluována 0,1M NaOH, pH 12 (upraveno pomocí HCl).

Získané frakce byly eluovány 2 ml příslušného elučního roztoku, následně byly frakce odpařeny na centrifugační odparce při 60 °C. Před nanesením na kolonu s reverzní fází byly vzorky rozpuštěny ve 150  $\mu\text{l}$  mobilní fáze se složením totožným jako na počátku gradientu použité metody HPLC. Na HPLC kolonu Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4 $\mu\text{m}$ , C<sub>12</sub>) bylo naneseno 50  $\mu\text{l}$  přečištěného vzorku nebo standardu.

### 5.7.3 Iontoměničová chromatografie on-line spojená s vysokotlakou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi

Byla zvolena aniontoměničová chromatografie (IEC) v přímém spojení s HPLC analýzou na reverzní fázi. Analýza byla provedena ve dvou krocích, v prvním kroku byly sériově zapojeny kolony MONO Q™ 5/50 GL (aniontoměničový sorbent) a kolona Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4µm, C<sub>12</sub>). Na IEC kolonu bylo nanášeno 20 µl nebo 50 µl vzorku nebo standardu. Použitá mobilní fáze byla 15mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 5% obsahem methanolu, pH 7,9. Byl použit průtok mobilní fáze 250 µl/min a chromatografická separace probíhala při laboratorní teplotě. V druhém kroku byla odpojována IEC kolona a v systému byla zapojena pouze kolona s reverzní fází, na které byly zachycené analyty ze vzorku separovány gradientovou elucí.



Obr. č. 8: Schéma zapojení IEC kolony a RP-HPLC kolony.

### 5.8 Vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Separace byly prováděny na koloně s reverzní fází (RP-HPLC) Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4µm, C<sub>12</sub>). Jako výsledná mobilní fáze A byla zvolena 0,1% trifluoroctová kyselina (TFA) a výsledná mobilní fáze B byl použit 100% acetonitril (AcN) obsahující 0,1 % TFA. Bylo vyzkoušeno několik gradientů i koncentrace AcN v mobilní fázi B, popis je uveden ve výsledkové části. Na kolonu bylo dávkováno 20 nebo 50 µl vzorku nebo standardu.

Výsledný gradient mobilních fází použitý pro separaci vzorku na C<sub>12</sub> koloně uvádí následující tab. č. 3:

Tab. č. 3: Optimalizovaný gradient pro separaci purifikovaného vzorku.

Čas (min.)	A (%)	B (%)
0	95	5
2	95	5
5	70	30
17	45	55
19	0	100
24	0	100
26	95	5
36	95	5

## 5.9 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Frakce získané po separaci vzorku metodou HPLC na reverzní fázi byly odpařeny na centrifugační odparce a před nanesením na MALDI destičku byly rozpuštěny v 10  $\mu$ l 0,1% TFA. Pro analýzu MALDI-TOF byl použit přístroj Microflex LRF20 MALDI-TOF obsahující iontový zdroj microScout s dusíkovým laserem 337 nm. Pro pozitivní hmotnostní spektra bylo použito akcelerační napětí 19 kV a extrakční napětí 16,1 kV, napětí čočky bylo 9,1 kV, napětí reflektoru 20kV, délka prodloužené extrakce 250 ns. Byl použit reflektornový mód Microflex.

Jako matrice byla použita  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA); 2 mg CHCA byly rozpuštěny v 0,33 ml 2,5 %TFA a 66% AcN (Thomas et al, 2004). Na destičce bylo smíseno 0,5  $\mu$ l vzorku s 0,5  $\mu$ l matrice, krystalizace byla provedena metodou vysušené kapky. Naměřená spektra byla analyzována programem flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics).

## 5.10 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2007. V programu byly provedeny všechny statistické výpočty a vytvořeny výsledkové tabulky a grafy.

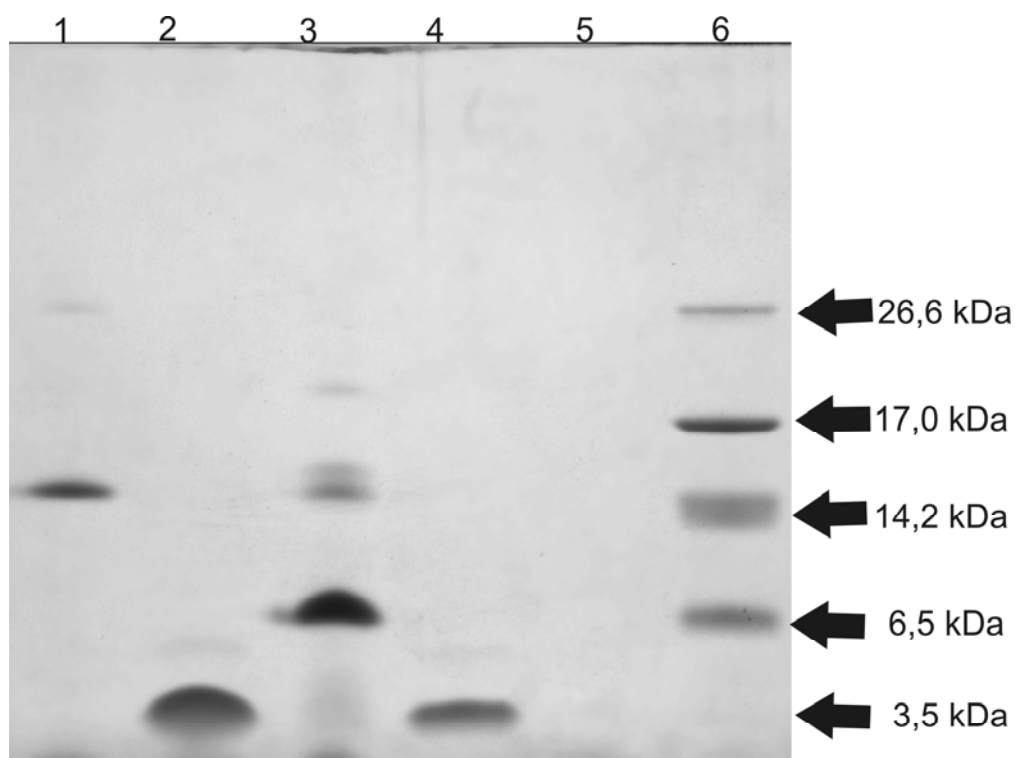
Metoda Principal component analysis (PCA) byla vypočítána v programu DataAnalysis (Bruker).

## 6 Výsledky

### 6.1 Analýza včelích IMP elektroforézou a blotováním

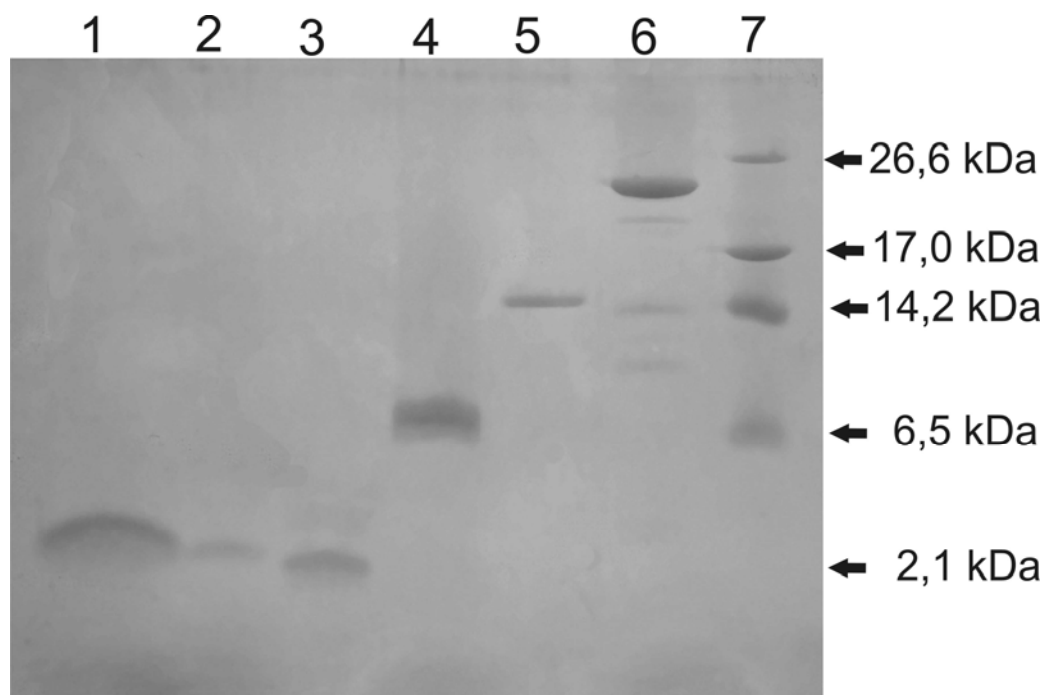
S vývojem elektromigračních metod pro dělení IMP z hemolymfy včel bylo započato již v bakalářské práci (Daníhlík, 2009), taktéž bylo vyzkoušeno několik variant detekce IMP v gelu a posléze i blotování peptidů z gelů na membrány. V diplomové práci byly ověřeny výsledky z bakalářské práce a doplněny o další výsledky.

Bylo ověřeno, že pro separaci malých peptidů je vhodné použít tricínovou elektroforézu s přídavkem močoviny (Schägger a von Jagov, 1987). Byla zkoušena 3M a 6M koncentrace močoviny v dělicím gelu, nejlepší dělicí schopnost měl polyakrylamidový gel obsahující 6M močovinu. Jak již bylo uvedeno v bakalářské práci, tricínová elektroforéza bez přídavku močoviny má nedostatečné dělicí vlastnosti pro takto malé peptidy, jakými jsou IMP z hemolymfy včel. Pro zlepšení separačních vlastností byl mezi zaostřovací a dělicí gel vložen 10% polyakrylamidový gel, zlepšení dělicí schopnosti gelu však nebylo pozorováno, tato modifikace pouze prodloužila celou analýzu.



Obr. č. 10: Polyakrylamidový gel bez přídavku 6M močoviny, barvení Coomassie G-250. 1 – lysozym (7,5 ng/μl), 2- insulin (0,75 μg/μl), 3 – aprotin (0,75 μg/μl), 4 – insulin 33 ng/μl), 5 – apidaecin (7,5 ng/μl), 6 – standardy proteinů ULMW.





Obr. č. 11: Polyakrylamidový gel obsahující 6M močovinu v dělicím gelu, barvení Coomassie G-250. 1 – apidaecin (250 ng/μl), 2 – apidaecin (33 ng/μl), 3 – insulin (33 ng/μl), 4 – aprotin (33 ng/μl), 5 – lysozym (33 ng/μl), 6 – trypsin (33 ng/μl), 7 – standardy proteinů UL-MW.

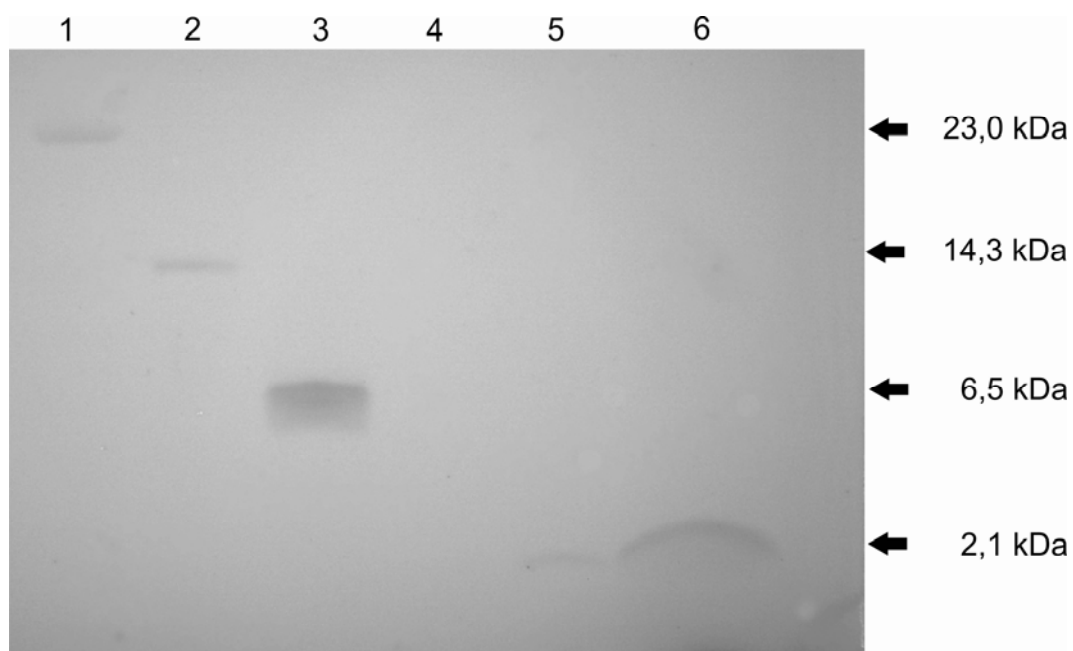
Obr. č. 10 a č. 11 uvádějí srovnání dělení peptidů v separačním gelu s přidavkem a bez přidavku močoviny. Z obrázků je patrné, že je nutné použít gel obsahující 6M močovinu, tento výsledek je vlastně ověřením výsledku z bakalářské práce, kde se došlo ke stejnému závěru. Obr. č. 11 také ukazuje rozdílný vzhled bandu vzorku apidaecinu, který byl smíchán s v laboratoři připraveným vzorkovacím pufrem (linie 1) (dle návodu Schägger, 2006) a vzorku smíchaným s komerčním vzorkovacím pufrem od firmy BioRad (linie 2). Na zakřivení bandu neměla vliv koncentrace peptidu v jamce, protože podobný jev byl pozorován i při nižších koncentracích peptidů nanášených na gel.

Pro barvení peptidů v gelu se nejlépe osvědčil postup dle Schäggera (2006), bylo vyzkoušeno barvení stříbrem a Coomassie G-250. Dle protokolu Westermeiera (2006) bylo provedeno také rychlé koloidní Coomassie barvení. To však nepřineslo žádné výsledky, nedošlo k obarvení standardů ani markeru UMLW, proto nebylo již nadále používáno.

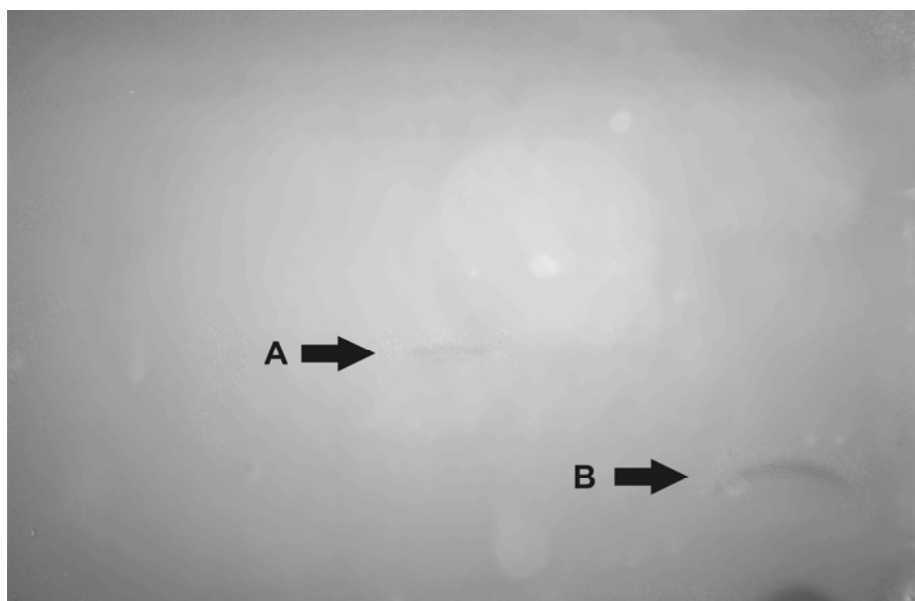
Pro optimalizaci detekce peptidů po elektroforetickém rozdělení byl vyzkoušen transfer peptidů z gelu na membránu. Již v bakalářské práci byla zkoušena nitrocelulózová (NC) a polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána. Dle výsledků transferu a následného barvení spotů na membráně bylo zjištěno, že pro analyzované peptidy je vhodnější transfer na NC membránu a barvení kitem MemCode™. PVDF membrány byly barveny amidočerní. Použití PVDF mem-

brán se jeví jako nevhodné pro analyzované peptidy, nedošlo totiž k obarvení žádného spotu na membráně.

Spoty peptidů na NC membráně obarvené kitem MemCode<sup>TM</sup> nebyly dobře reprodukovatelné. Při transferu byly na sebe navrstveny dvě NC membrány o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a obě barveny, membrány jsou na obr. č. 12 a č. 13. Bylo pozorováno, že apidaecin a insulin prochází skrz první membránu na druhou. Z toho důvodu se nedařilo blotování provádět reprodukovatelně. Blotování takto malých peptidů na NC membránu nemůže tedy sloužit ke kvantitativnímu vyhodnocení analýzy. Při delším blotování v podstatě ani kvalitativnímu, hrozí totiž, že peptidy projdou skrze membránu do blotovacího pufru, čímž nebudou zachyceny na membráně.

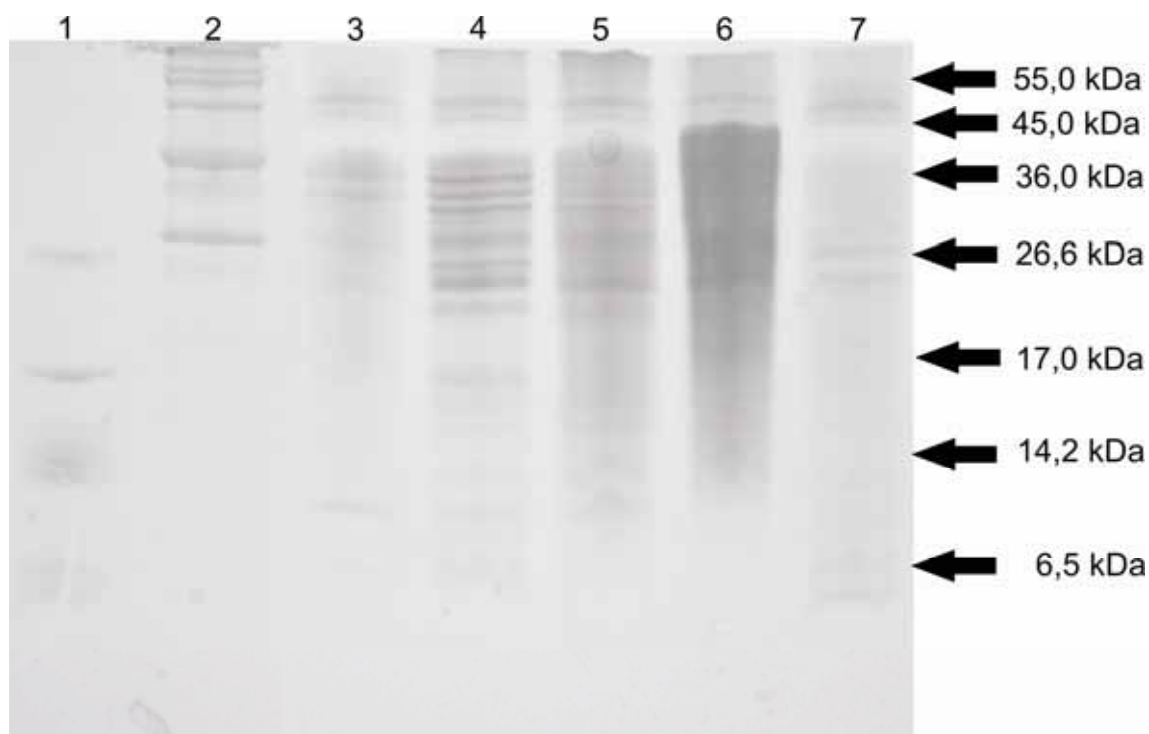


Obr. č. 12: NC membrána barvená kitem MemCode<sup>TM</sup>. Jedná se o membránu, která první v pořadí za gelem ve směru putování peptidů v elektrickém poli. 1- trypsin (33 ng/ $\mu\text{l}$ ), 2 – lysozym (33 ng/ $\mu\text{l}$ ), 3 – aprotin (33 ng/ $\mu\text{l}$ ), 4 – insulin (33 ng/ $\mu\text{l}$ ), 5 – apidaecin (33 ng/ $\mu\text{l}$ ), 6 – apidaecin (240 ng/ $\mu\text{l}$ ).



Obr. č.13 : NC membrána barvená kitem MemCode™, membrána druhá v pořadí za gelem. Šipka A ukazuje spot aprotinu a šipka B apidaecinu, peptidy tedy procházejí přes NC membránu.

Byla provedena elektroforéza reálných vzorků. Vzorky byly připraveny homogenizací celých včel a zpracovány dle postupu uvedeného v metodické části.



Obr. č. 14: Výsledek tricínové elektroforézy s 6M močovinou reálných vzorků zpracovaných z celých včel. Barvení bylo provedeno barvivem Coomassie G-250. 1 – standardy proteinů ULMW, 2 – standard Sigma 30 - 200 kDa, 3 – vzorek 84 (20 včel) imunizován, 4 – vzorek 84

(20 včel) kontrola, 5 – vzorek 23 (10 včel) imunizován, 6 – vzorek 23 (10 včel) kontrola, 7 – vzorek 4 (120 včel) bez imunizace.

Obr. č. 14 ukazuje výsledek tricínové elektroforézy s přidavkem 6M močoviny, z výsledku je patrné, že popsanou metodou elektroforézy nelze citlivě detekovat malé peptidy nacházející se v hemolymfě včel v malých koncentracích. Cílem metodiky detekce IMP je hlavně možnost peptidy kvantifikovat. Od metody plošné elektroforézy v polyakrylamidovém gelu bylo tedy upuštěno, následně byly vyvíjeny různé chromatografické metody se spektrofotometrickým a hmotnostně spektrometrickým způsobem detekce.

## 6.2 Analýza včelích IMP chromatografickými metodami

### 6.2.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie bez iontoměničové předseparace

Metoda RP-HPLC byla původně navržena dle literatury (Casteels et al., 1989, 1990), kde autoři použili předseparaci vzorků hemolymfy na koloně s reverzní C<sub>4</sub> fází a následně analyzovali frakci s výskytem antimikrobiálního peptidu na koloně s reverzní C<sub>18</sub> fází.

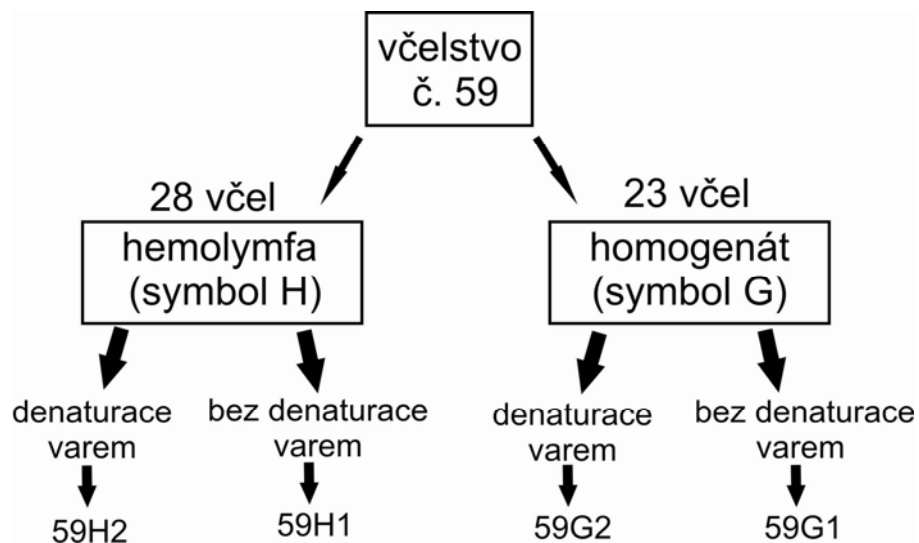
Pro detekci apidaecinu a abaecinu byla navržena metoda gradientové eluce na koloně C<sub>12</sub> Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4µm, C<sub>12</sub>). Nejdříve bylo vyzkoušeno několik modifikací gradientu se složením mobilních fází 0,1% TFA (A) a 70% AcN s 0,1% TFA (B). Gradient s optimalizovanou retencí standardu apidaecinu byl následující (tab. č. 6):

Tab. č. 6: Gradient RP-HPLC metody analýzy IMP

Čas (min.)	A (%)	B (%)
0	80	20
20	20	80
23	10	90
26	10	90
27	80	20
37	80	20

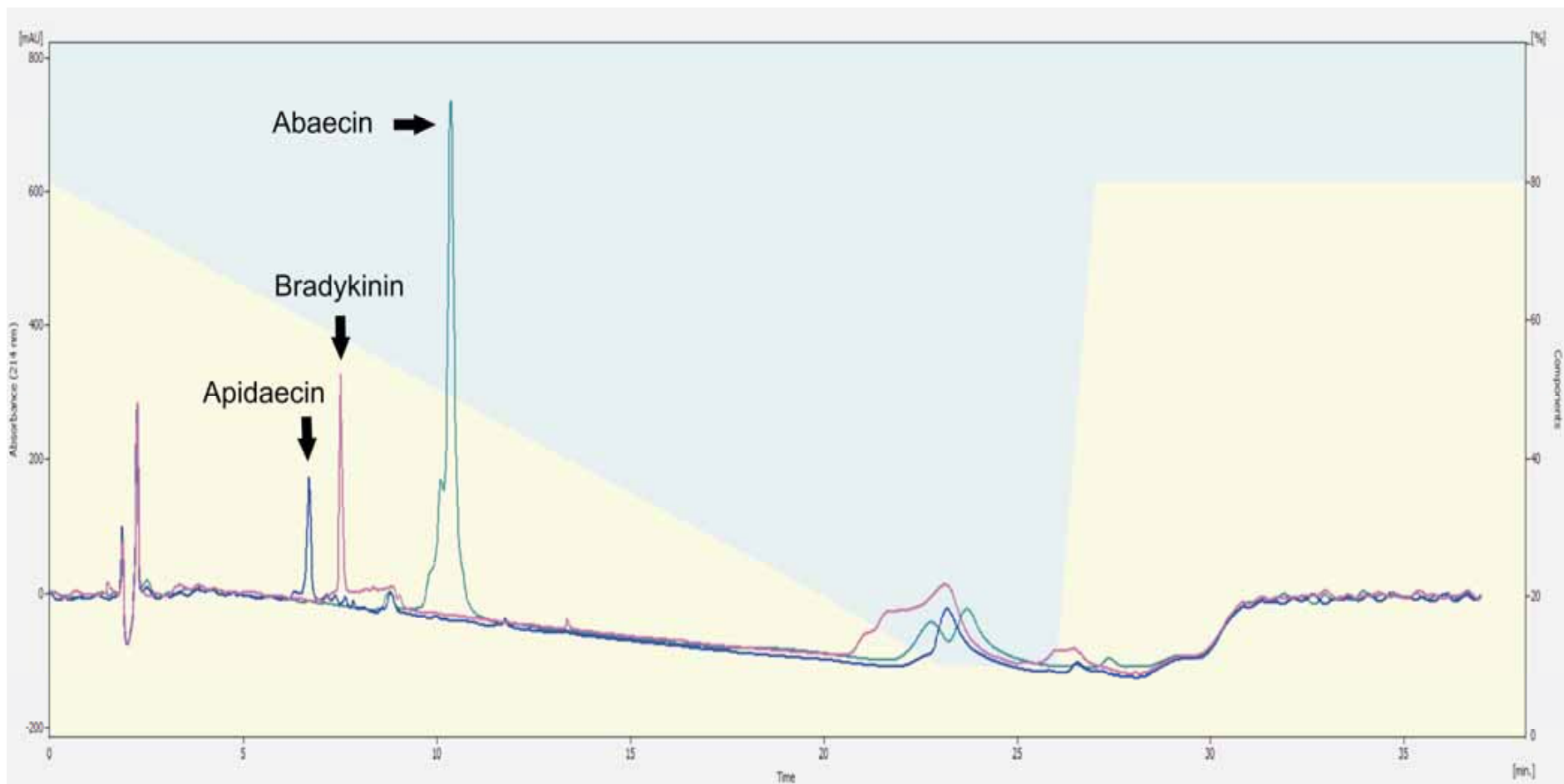
Retenční časy standardních peptidů byly 6,70 min. pro apidaecin, 10,37 min. pro abaecin a 7,52 min. pro bradykinin (obr. č. 16).

Po zjištění retenčních časů standardů peptidů bylo přistoupeno k analýze reálných vzorků extraktů včel. Vzorkem byly včely ze včelstva č. 59, které nebyly laboratorně imunizovány. Bylo vyzkoušeno několik modifikací zpracování vzorků. Schéma zpracování vzorků uvádí obr. č. 15.

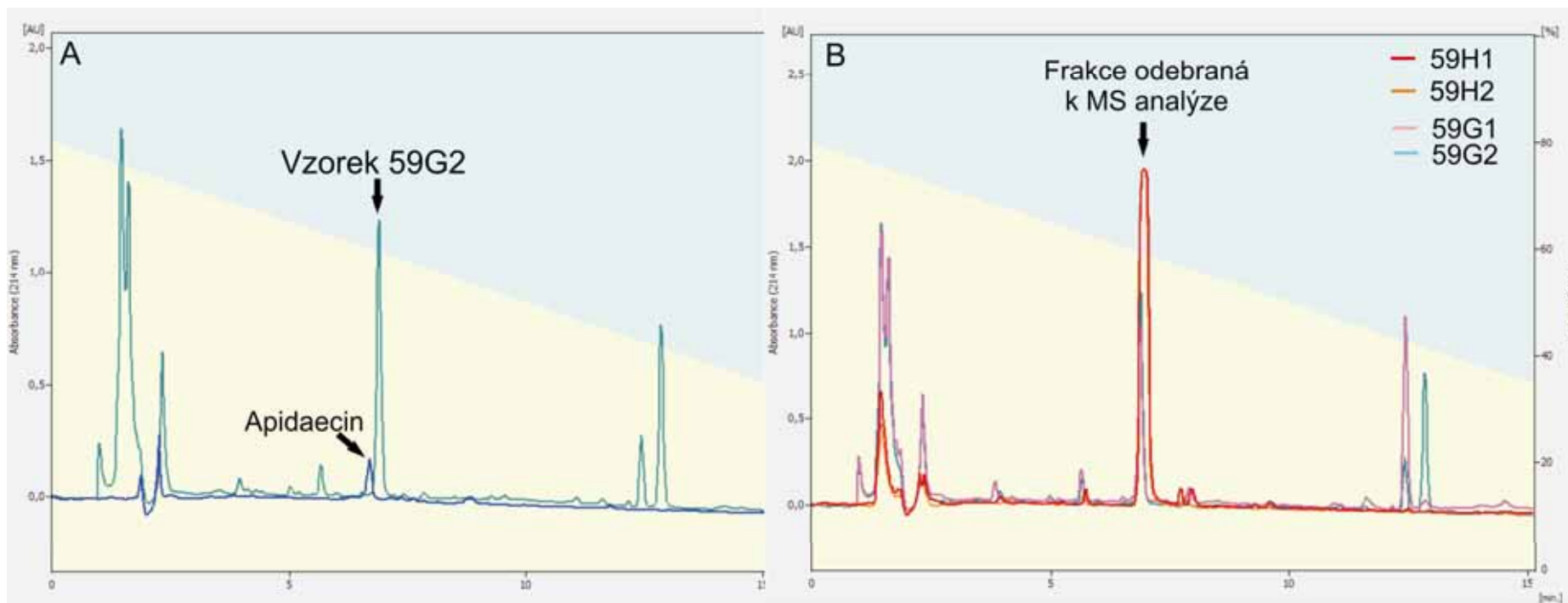


Obr. č. 15: Schéma zpracování a označení vzorku včel ze včelstva č. 59.

Representativní výsledek analýzy reálných vzorků z včelstva č. 59 ve srovnání s retenčními časy standardů je znázorněn na obr. č. 17.

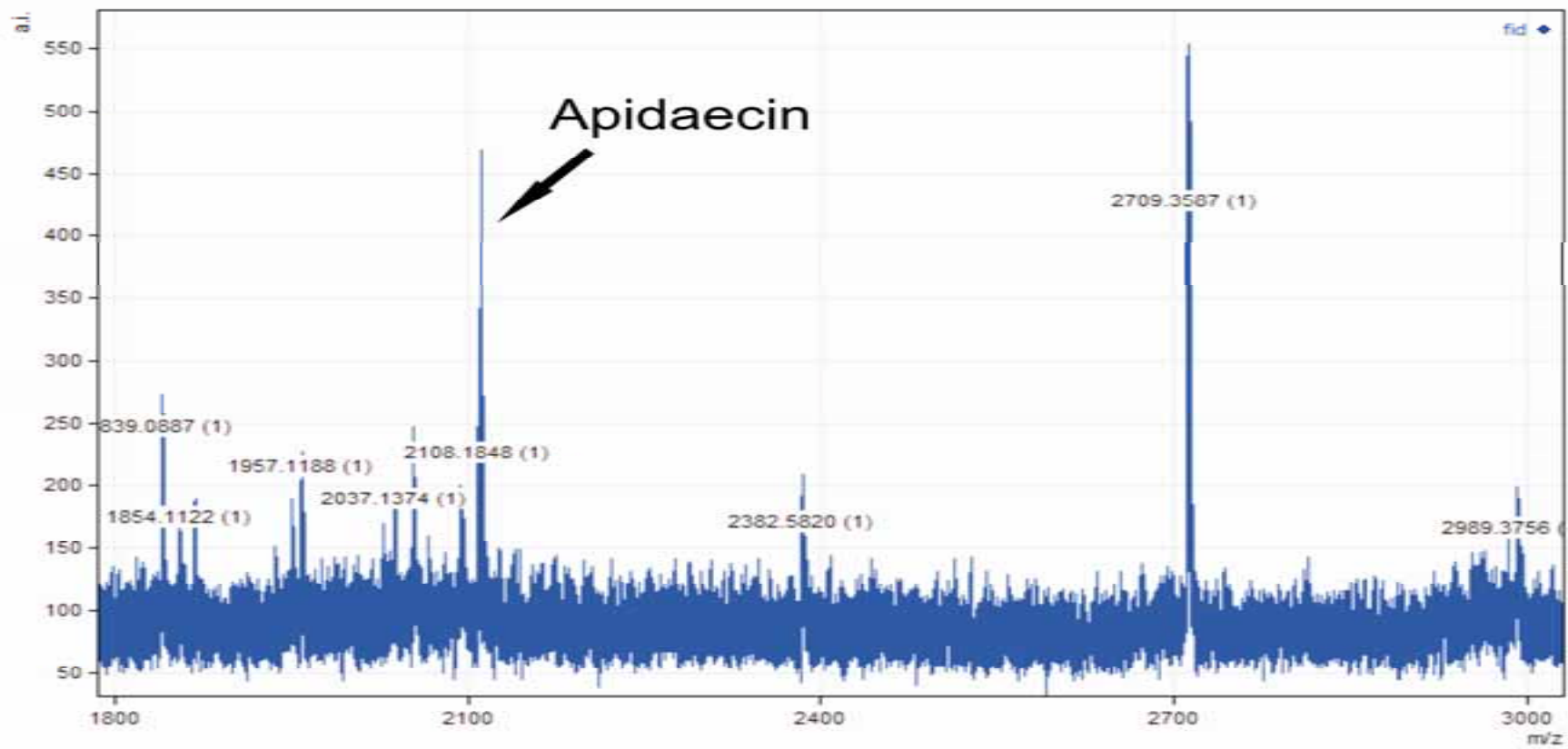


Obr. č. 16: Proložení chromatogramů použitých standardů. Na obrázku je celý chromatogram s vyznačením gradientu mobilní fáze (osa vpravo). Použité standardy peptidů byly v 100 $\mu$ M koncentraci, na kolonu bylo naneseno 20  $\mu$ l. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.



Obr. č. 17: Obrázek A zobrazuje proložení standardu apidaecinu ( $100\mu\text{M}$ ) s reálným vzorkem 59G2. Dochází k mírnému překryvu píků v jejich patě, posun retenčního času u vzorku může být způsoben složitostí reálného vzorku. Obrázek B zobrazuje proložení chromatogramů jednotlivých vzorků připravených dle schématu zobrazeného na obr. č. 15. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

Obsah peptidů ve frakci odebrané v čase 6,80 – 7,10 min. ze vzorku 59G2 byl analyzován pomocí MALDI-TOF. Odebraná frakce byla nejdříve odparena na vakuové odparce a poté znovu rozpuštěna v  $10\ \mu\text{l}$  0,1% TFA. Vzorek byl nanesen na MALDI destičku a kokrytalován s matricí metodou vysušené kapky (Thomas et al., 2004). Výsledky hmotnostně spektrometrické analýzy ukázaly, že analyzovaná frakce obsahovala několik peptidů, a to včetně apidaecinu (obr. č. 18).



Obr. č. 18: Spektrum z MALDI-TOF analýzy frakce odebrané z RP-HPLC v retenčním čase 6,90. min. Ve frakci se vyskytuje apidaecin spolu s dalšími peptidy, které se nepodařilo dostatečně rozdělit na C<sub>12</sub> koloně.



Na obr. č. 17 je vidět, že výsledky analýzy pro purifikovanou směs připravenou z hemolymfy nebo homogenizací včel je prakticky totožná. V oblasti retence apidaecinu se píky neliší. Z hlediska jeho analýzy tedy nemá velký význam, zda je včelám odebírána jen hemolymfa nebo jsou homogenizovány celé včely. Z praktického i časového hlediska je mnohem pohodlnější zpracovávat celé včely pro analýzu sledovaných včelích IMP. Na komplexnost směsi analyzované za výše uvedených podmínek nemá vliv ani denaturace vzorku varem. Tyto zjištěné poznatky byly využity při dalších zpracování vzorků. Včelám již nebyla odebírána hemolymfa, ale byly zpracovávány celé. Všechny vzorky byly nadále denaturovány varem. Po denuraci a centrifugaci totiž vzniklo větší množství precipitátu. Ze směsi tímto byly odstraněny lipidy a proteiny, které způsobovaly nehomogenost a zákal vzorku, což mohlo mít nepříznivý vliv na použitý chromatografický systém. Předpokládalo se, že sledované IMP se v precipitátu nenacházely.

## **6.2.2 Stanovení čistoty standardů apidaecinu a abaecinu**

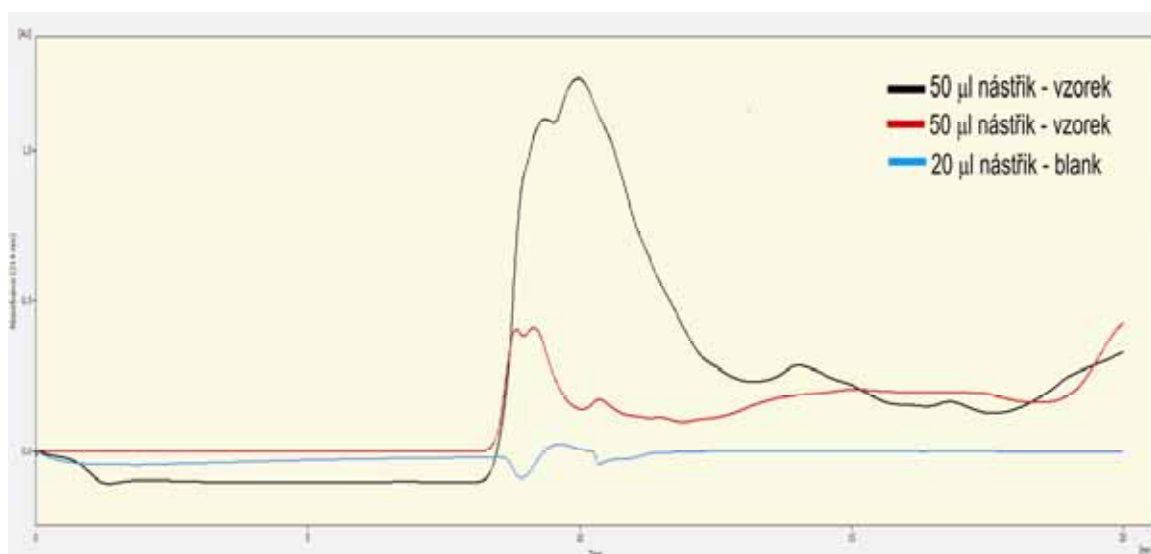
Snaha optimalizovat metodu RP-HPLC poukázala na možnou nečistotu zakoupeného a synteticky vyrobeného standardu abaecinu (zdvojený pík abaecinu na obr. č. 16). Oba standardy byly podrobeny analýze technikou nanoLC-MS, kde bylo zjištěno, že apidaecin se ve vzorku nachází spolu s nečistotami, které jsou pravděpodobně meziprodukty nebo vedlejšími produkty chemické syntézy samotného peptidu. Abaecin se však v zakoupeném standardu nacházel jen ve velmi malém množství. Většina zakoupeného standardu byla tvořena úplně jiným peptidem s odlišnou molekulovou hmotností. Standard abaecinu nebyl nadále používán pro optimalizaci metody detekce ve vzorku. Metodika se zaměřila pouze na optimalizaci analýzy pro standard apidaecinu.

## **6.2.3 Iontoměničová chromatografie on-line spojená s HPLC na reverzní fázi**

Aby byla metoda RP-HPLC využitelná pro kvantitativní analýzu apidaecinu, bylo nutno navrhnout zařazení předseparační metody využívající jiných vlastností studovaných analytů než chromatografie na reverzní fázi. Byla navržena metoda přímého spojení iontoměničové chromatografie a chromatografie na reverzní fázi. Na přístroji Knauer byla spojena kolona MONO Q<sup>TM</sup> 5/50 GL přímo s kolonou C<sub>12</sub> Jupiter Proteo 90Å (150 x 4,60 mm x 4µm, C<sub>12</sub>). V první fázi byl zvolen aniontoměnič a ve druhé reverzní fáze C<sub>12</sub>. Navržená metoda vycházela ze známých hodnot isoelektrického bodu analyzovaných peptidů a proteinů a zároveň vysoké bazicity apidaecinu. Metoda byla nejprve optimalizována se standardem bradykininu.

Na kolonu MONO Q<sup>TM</sup> 5/50 GL bylo nanášeno 20 µl nebo 50 µl standardu nebo vzorku, průtok 250 µl/min, isokratická seprace, mobilní fáze 15mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 5% methanolem (Me-

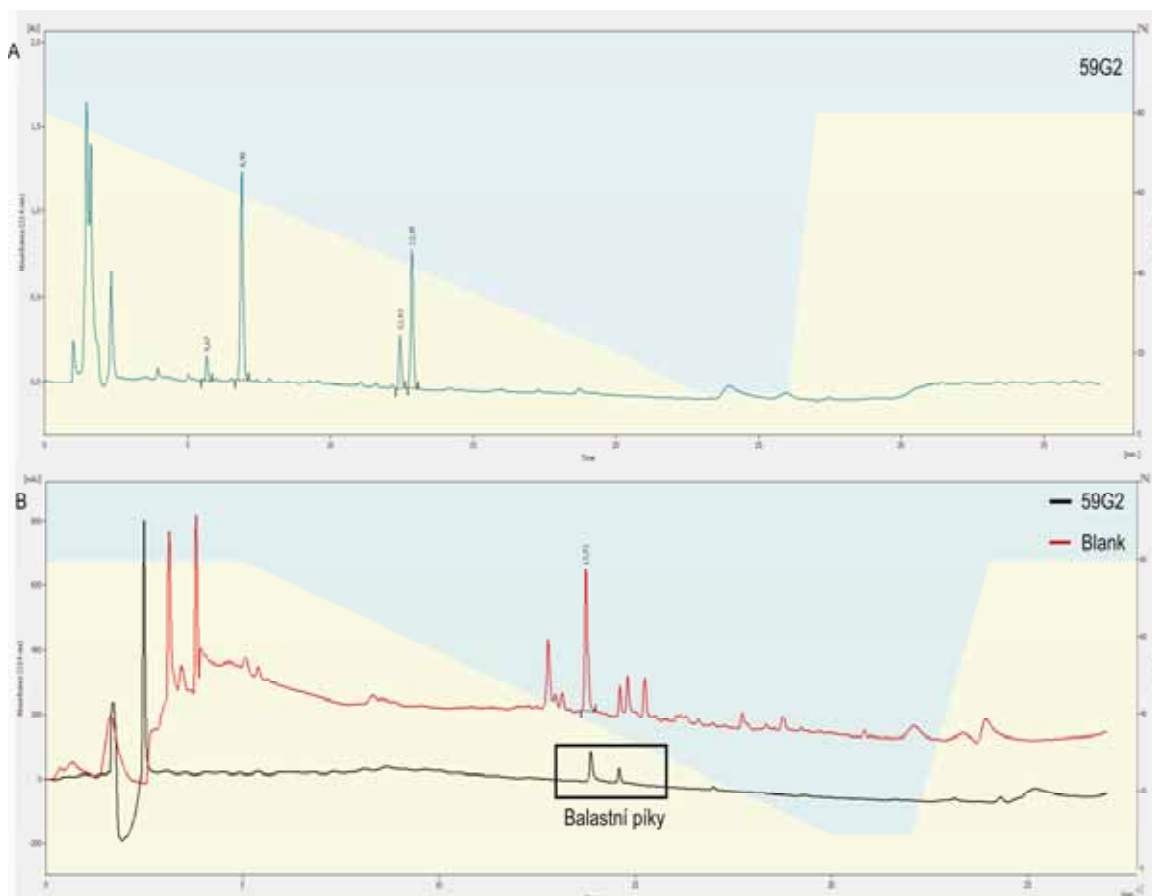
OH), pH 7,9. Na koloně MONO Q™ se zachytí balastní proteiny, které mají záporný náboj, kladně nabitě proteiny a peptidy kolonou protečou a zachytí se na druhé koloně s reverzní fází C<sub>12</sub>. Nanášení vzorku na systém on-line spojení IEC a RP-HPLC kolon probíhalo po dobu 20 minut, poté byla IEC kolona odpojena a zachycené peptidy byly rozděleny gradientovou elucí na koloně s reverzní fází. Mrtvý objem samotné kolony MONO Q™ je 1 ml, kolona byla promyta 5 ml 15mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 5% MeOH, pH 7,9, což je pětinasobek jejího mrtvého objemu. Po separaci byla kolona regenerována dle návodu od výrobce (2M NaCl, 2M NaOH, 75% kyselina octová, 50% MeOH).



Obr. č. 19: Chromatogram analýzy přímého spojení iontoměničové kolony s HPLC na reverzní fází (IEC-RP-HPLC). Pík na chromatogramu zobrazuje mrtvý objem spojených IEC a RP-HPLC kolon. Pík mrtvého objemu se eluuje ve zhruba 10. minutě, takže mrtvý objem celého systému je cca 2,5 ml.

Promytí 5ml 15mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 5% MeOH, pH 7,9 postačí k doputování analytů ke koloně s reverzní fází. Protože je využíváno pI peptidů, bazické IMP se na IEC koloně nezachytí, ale protečou jí, kdežto balastní látky s pI nižším než 7,9 se zachytí na IEC koloně. Směs látek zachycených na RP-HPLC koloně by se měla tedy podstatně zjednodušit ve srovnání s výchozím vzorkem.

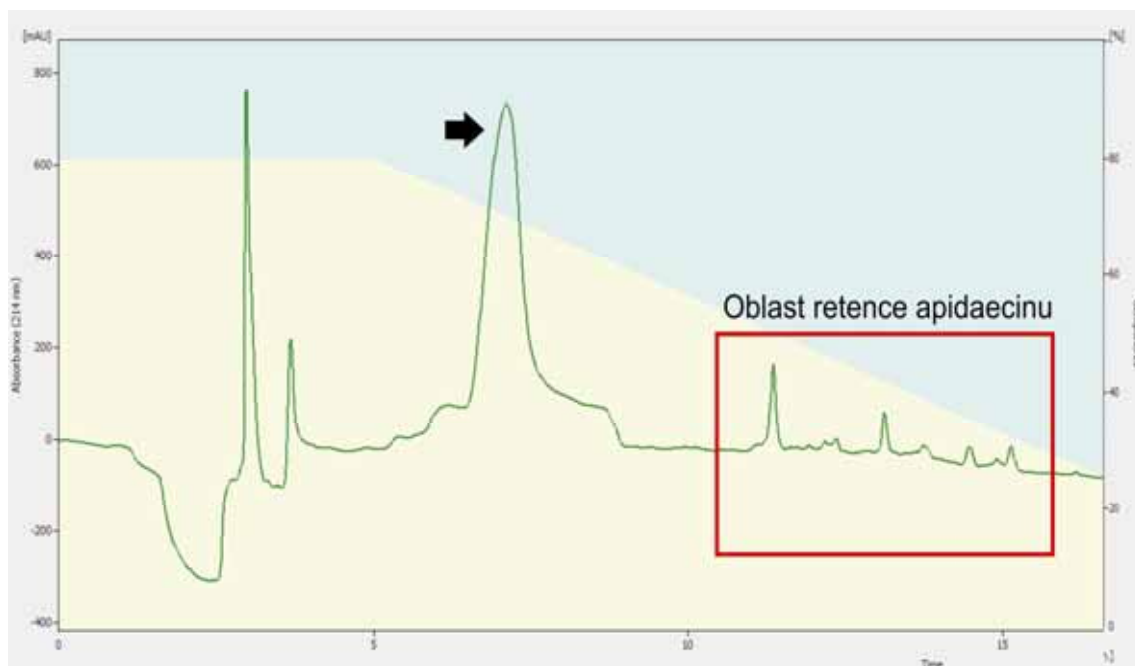
Gradient mobilních fází na koloně s reverzní fází byl nejdříve zvolen totožný s gradientem použitým na HPLC bez zařazené iontoměničové předseparace, odlišný je jen začátek gradientu, kde byla definována isokratická separace na 6 min. nutná pro vyplavení použitých solí mobilní fáze z kolony s reverzní fází. Rozdíly v analýze bez IEC kolony a včetně IEC kolony jsou patrné na chromatogramech na následujícím obr. č. 20.



Obr. č. 20: Srovnání chromatogramů bez (A) a včetně (B) iontoměničové chromatografie on-line spojené s kolonou s reverzní fází. Na obrázku B je také zobrazen chromatogram blanku (methanol) s vyznačenými balastními píky. Na IEC kolonu bylo v obou případech nastříknuto 20  $\mu$ l vzorku. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

Obr. č. 20 znázorňuje gradient a chromatogramy analýzy vzorku 59G2, který byl použit pro optimalizaci metody. Jedná se tentýž vzorek použitý v metodě RP-HPLC bez IEC chromatografie. Z části B obr. č. 20 je vyobrazen chromatogram blanku (MeOH), na jehož chromatogramu jsou vidět dva píky (na obrázku zvýrazněny rámečkem), které v systému nejspíše zůstaly po předchozí analýze vzorku. Bylo provedeno několik nástřiků blanku, aby se zjistilo, zda se nečistota vymývá. Ke zmenšení ploch píků v blanku nedocházelo ani po opakovaném nástřiku. Pravděpodobně jde o látky – nečistoty z chemikálií nebo o látky zachycené v některé z částí chromatografického systému, např. zachycení v nástřikové kapiláře nebo smyčce.

Po nanesení standardu apidaecinu se také eluovalo několik píků, takže nebylo možné jednoznačně určit retenční čas apidaecinu (obr. č. 21).



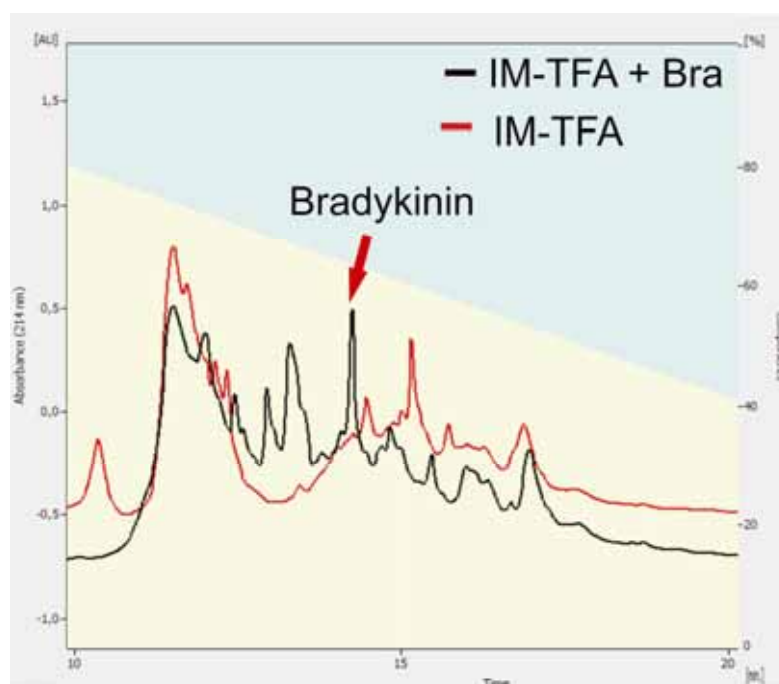
Obr. č. 21: Výřez chromatogramu standardu apidaecinu po předchozích nástřících vzorků. V červeném rámečku jsou píky, které jsou pozůstatkem předchozí analýzy, není z nich možné jednoznačně určit pík apidaecinu. Černá šipka ukazuje pík, který byl nejspíše způsoben krátkou isokratickou elucí před nárůstem gradientu mobilní fáze. Tento pík se v chromatogramech vyskytoval náhodně. Nástřik standardu na IEC kolonu byl 20  $\mu$ l. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

Kvůli nedostatečné eluční síle gradientu mobilní fáze, jaký využívala metoda RP-HPLC bez zařazené iontoměničové chromatografie, bylo navrženo několik modifikací gradientů. Byl prodloužen čas isokratické separace na začátku gradientu po iontoměničové chromatografii a také byl modifikován gradient pro lepší rozlišení píků. Testovanými gradienty bylo analyzováno několik standardů i vzorků. Zjistilo se, že použití 70% AcN s obsahem 0,1% TFA v mobilní fázi B je nedostačující pro kompletní vymytí kolony od všech zachycených látek. Ve všech případech byly totiž patrné píky i u blanku v časech blízko retenčním časům standardu apidaecinu. Výsledkem optimalizace bylo použití gradientu se 100% AcN s 0,1% TFA jako mobilní fáze B. Metoda separace na koloně s reverzní fází používala tyto mobilní fáze 0,1% TFA (A) a 100% AcN s 0,1% TFA (B), upravený gradient ukazuje následující tabulka č. 7:

Tab. č. 7: Gradient RP-HPLC metody s mobilními fázemi 0,1% TFA (A) a 100% AcN s 0,1% TFA (B).

Čas (min.)	A (%)	B (%)
0	95	5
6	95	5
23	30	70
25	0	100
30	0	100
31	95	5
32	95	5

Při použití gradientu uvedeného v tab. č. 7 bylo dosaženo promytí kolony při každé analýze, což bylo ověřeno několika nástřiky blanku mezi jednotlivými analýzami. Následně byla ověřována stabilita retenčních časů a reprodukovatelnost výsledků. Byl použit vzorek s označením IM-TFA (homogenát připraven z 39 imunizovaných včel) a tentýž vzorek s přidavkem standardu bradykininu.



Obr. č. 22: Srovnání chromatografického dělení jednoho vzorku (IM-TFA) s přidavkem a bez přidavku standardu bradykininu. Na obrázku je pouze výřez 10. až 20. minuty celého chromatogramu. Na MonoQ<sup>TM</sup> kolonu bylo naneseno 50  $\mu$ l vzorku. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

Obr. č. 22 ukazuje problematiku s opakovatelností analýzy jednotlivých reálných vzorků. Po provedení opakovaných nástřiků těchto vzorků bylo jen stěží možno dosáhnout reprodukovatelnosti.

telných chromatogramů. Chromatogramy na obr. č. 22 by se měly lišit pouze o jediný pík bradykininu. Je však patrné, že chromatogramy jsou velmi rozdílné.

Kvůli tomuto problému a nestabilitě retenčních časů samotných standardů bylo přistoupeno k použití metody zahrnující off-line iontoměničovou extrakci na pevné fázi (SPE) a následnou separaci gradientovou elucí na koloně s reverzní fází.

#### 6.2.4 Extrakce na pevné fázi a následné RP-HPLC

Extrakce na pevné fázi (SPE) byla provedena s několika sorbenty. Nejdříve byly vyzkoušeny aniontoměniče, aby byl zachován princip metody podobně jako u on-line spojení IEC s RP-HPLC. V metodě RP-HPLC byla také vytvořena nová metoda, protože již nebylo potřeba tak dlouhé isokratické separace na počátku analýzy kvůli odsolení vzorku i kolony po nanesení vzorku na IEC kolonu. Byly použity tyto mobilní fáze: 0,1% TFA (A), 100% AcN s 0,1% TFA (B).

Tab. č. 8: Gradient č. 1 RP-HPLC metody použité po SPE

<b>Čas (min.)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	95	5
2	95	5
17	45	55
19	0	100
24	0	100
26	95	5
34	95	5

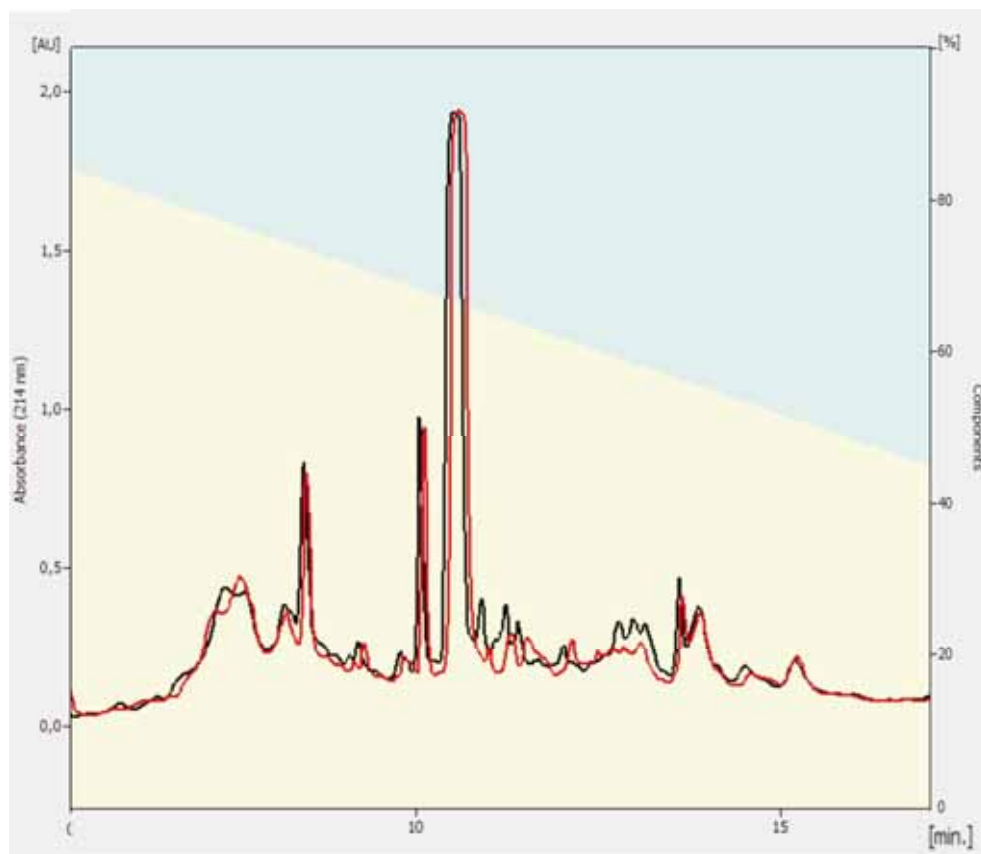
Tab. č. 9: Gradient č. 2 RP-HPLC metody použité po SPE

<b>Čas (min.)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	95	5
2	95	5
5	70	30
17	45	55
19	0	100
24	0	100
26	95	5
36	95	5

Byly vyzkoušeny aniontoměniče DEAE Sephadex A-25 a TEAE celulosa. Nejdříve byla optimalizována metoda SPE přečištění vzorků. Byl použit totožný eluční roztok jako u on-line spojení IEC a RP-HPLC, tedy 15mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 5% MeOH, pH bylo upraveno na 9. Tento roztok byl použit i na ekvilibraci sorbentů, kolony byly plněny 1 ml sorbentu, který byl následně

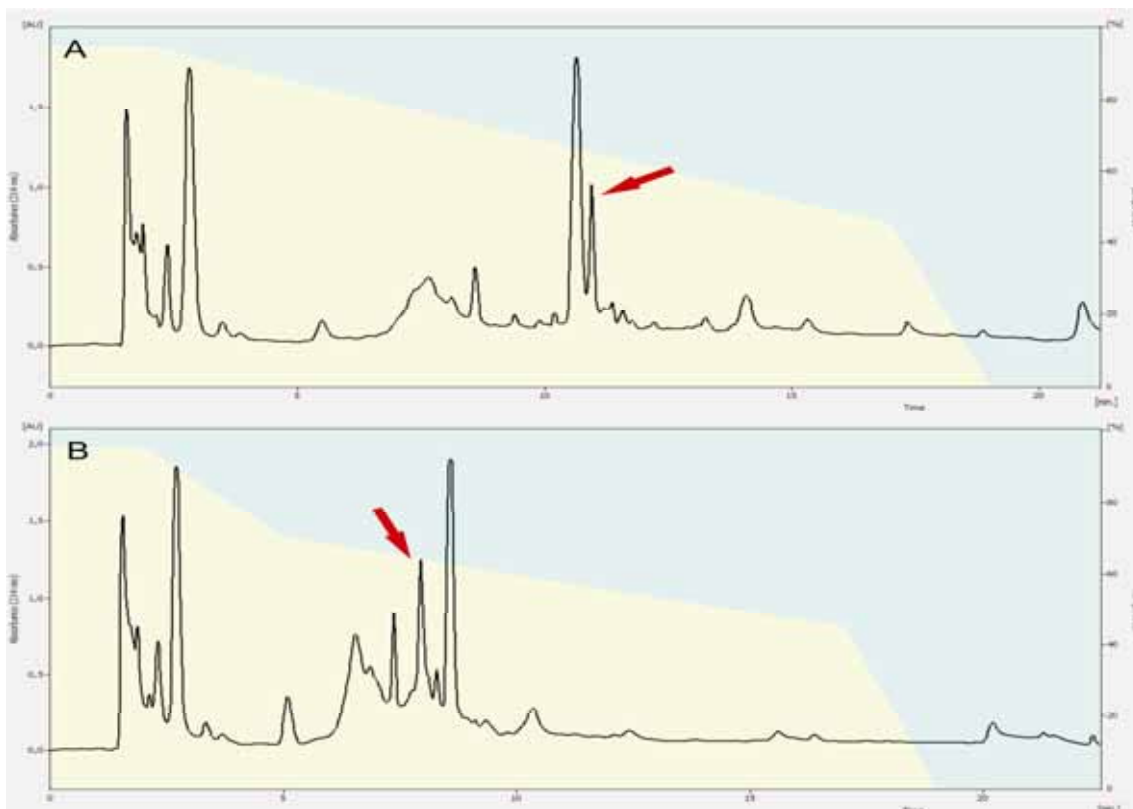
promyt 2 ml 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% MeOH. Vzorek byl posléze odpařen ve vakuové odparce při 60 °C.

Obr. č. 23 srovnává výřezy chromatogramů vzorku (homogenát ze 120 neimunizovaných včel), které byly z SPE kolony vymyty 1,5 nebo 2 ml elučního roztoku. V retenčním čase největšího píku se také eluuje apidaecin, což bylo potvrzeno další analýzou standardu apidaecinu.



Obr. č. 23: Porovnání výřezu RP HPLC chromatogramů frakcí vzorků eluovaných z SPE kolony 1,5 ml (červeně) a 2 ml (černě) 15mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 5% MeOH, pH 9. Použitý sorbent DEAE Sephadex A-25. Na kolonu bylo naneseno 50  $\mu\text{l}$  vzorku. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

Po provedeném SPE přečištění byl vzorek analyzován na RP-HPLC. Výchozí testovaný gradient č. 1 (uveden v tab. č. 8) musel být upraven (tab. č. 9), protože nebyl vhodný pro rozdělení dvou částečně překrývajících se píků, jak ukazuje obr. č. 24 části A, píky se překrývají v patě. Gradient byl na počátku urychlen a v časech retence analytů byla snížena rychlost nárůstu organické mobilní fáze B. Rychlejšším nárůstem mobilní fáze B došlo k přesunutí dvou píků, viz. obr. č. 24.



Obr. č. 24: Ukázka rozdílného dělení píků při dvou různých gradientech. V části A je uveden nejdříve gradient č. 1, v části B je výsledek získaný s upraveným gradientem č. 2. Jedná se o chromatogramy vzorku, ke kterému byl přidán standard apidaecinu (koncentrace ve vzorku  $200\mu\text{M}$ ), v obrázku jsou uvedeny pouze výřezy chromatogramů. Šipka označuje píky přidaného apidaecinu. Vzorek byl přečištěn na DEAE Sephadexu A-25. Gradient zobrazuje klesající obsah mobilní fáze A.

#### 6.2.4.1 Porovnání různých sorbentů použitých pro SPE



## 7 Diskuse

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci s názvem „Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel,“ která byla zpracována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v roce 2009.

### 7.1 Analýza IMP včel elektromigračními metodami

Schägger a von Jaggov (1987) uvádějí, že nejvhodnější elektroforetickou metodou dělení peptidů je tricínová elektroforéza. Pro dělení malých peptidů se doporučuje do dělicího gelu přidat močovinu v 6M koncentraci ke zhuštění pórů v gelu. Z našich výsledků je patrné, že tento způsob malých peptidů je účinný a hodí se i pro IMP z hemolymfy včel. U malých peptidů hrozí, že při barvení difundují z gelu, proto se doporučuje při barvení stříbrem přidat do fixačního roztoku glutaraldehyd, ten způsobí zesíťování postraních skupin methioninů. Pro analýzu apidaecinu a abaecinu však tato fixace nemá význam, protože oba IMP neobsahují ve své primární struktuře aminokyselinu methionin.

Pro přípravu vzorků se osvědčil komerční vzorkovací pufr od firmy BioRad, standardy peptidů připravené s tímto pufrem lépe putovaly v gelu, podstatně méně docházelo k tzv. „smiling efektu“ – zakřivení bandů. Laboratorně vyráběný vzorkovací pufr byl připravován dle návodu od Schägggra (2006), na vlastnosti připraveného pufru pravděpodobně měla vliv kvalita použitých chemikálií. Oba postupy barvení gelů jsou použitelné pro detekci standardů IMP, jako vhodnější se však jeví barvení pomocí Coomassie G-250, protože nedochází k přebarvení jiných více koncentrovaných bandů jako u stříbrného barvení, navíc postup barvení Coomassie je z praktického hlediska jednodušší. Přestože v návodu dle Westermeiera (2006) je pro barvení oligopeptidů (10 – 15 AK) vhodné rychlé koloidní Coomassie barvení, pro barvení IMP se nehodí, k obarvení nedošlo ani při zvýšení koncentrace na jednotky  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  peptidů v nanášeném standardu na gel.

Transfer peptidů z gelů na membrány není vhodné používat pro peptidy menší než 6 kDa, dochází totiž k průchodu peptidů skrze membránu (za použití membrány s 0,45  $\mu\text{m}$  póry), tomu lze zabránit použitím membrány s menší porézností. Pokud jsou peptidy či proteiny blotovány na NC membránu, je vhodné k barvení použít komerční kit MemCode<sup>TM</sup>. Dochází k rychlému obarvení spotů na membráně a spoty lze i odbarvit. Bohužel se při blotingu apidaecinu z gelu na membrány neosvědčilo použití PVDF membrán, protože pravděpodobně se na PVDF membránu nevážou. Tento jev může být způsobeno jejich hydrofilitou a velkým množstvím bazických skupin na povrchu apidaecinu i abaecinu. Peptidy se lépe vázaly na NC membránu, lepší vazba je pravděpodobně způsobena větší hydrofilitou nitrocelulózy a záporným nábojem na nitroskupině způsobené záporným indukčním efektem.

Apidaecin je možné detekovat při použití barvení Coomassie G-250 (Schägger, 2006) už od koncentrace 165 ng vzorku na jamku. SDS-PAGE metoda se nehodí pro kvantitativní analýzu takto malých peptidů, peptidy je možné detekovat kvalitativně, přesto však ani kvalitativní detekce není 100% spolehlivá. Jednotlivě připravené gely se mírně odlišují ve svých vlastnostech (např. různý stupeň polymerizace akrylamidu). Při elektroforéze vzorků nebylo možné jednoznačně detekovat zónu apidaecinu kvůli množství nebo nezaostření jednotlivých zón v místě teoretického výskytu bandu apidaecinu a abaecinu. Kvůli těmto nepřesnostem bylo přistoupeno k vývoji jiných analytických metod používaných k analýze peptidů a proteinů.

## **7.2 Analýza IMP včel chromatografickými metodami s UV detekcí**

## 8 Závěr

Byla zpracována diplomová práce s názvem Analýza parametrů humorální imunity včel, bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Byla zpracována literární rešerše zabývající se antimikrobiálními peptidy včel.
2. Pro analýzu kvantitativní analýzu peptidů apidaecinu a abaecinu není vhodná metoda tricínové elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ani transfer peptidů na membrány, testované metoda nemá dostatečnou citlivost pro nízké koncentrace peptidů ve vzorcích včel.
3. Metoda využívající chromatografii na reverzní fázi byla nevyhovující pro specifickou detekci peptidů v komplexní směsi látek v extraktech včelích těl. Purifikace na aniontoměničích nebo kationtoměničích zařazených před chromatografií na reverzní fázi také nevykázala dostatečné přečištění vzorku umožňující detekci imunopeptidů včel.
4. Byla vyvinuta metoda purifikace na špičkách se kationtoměničovým sorbetem z extrakčních disků s následným odsolením na C<sub>8</sub> sorbentu. Vzorky byly analyzovány pomocí metody nanoLC-MS. Touto metodou je možné detekovat apidaecin a jeho prekurzor a v uvedeném nastavení purifikace na SCX disku i abaecin. Díky citlivosti metody je možné detekovat a potenciálně i kvantifikovat peptidy z jedné včely.
5. Bylo změřeno a relativně kvantifikováno několik vzorků rozdělených do 4 skupin podle znaků infekce patogeny, které byly pro určitou skupinu významné. Zjištěné výsledky ukazují možné ovlivnění koncentrace IMP v tělech infikovaných včel, kvůli malému počtu analyzovaných vzorků a nedostatečné statistické průkaznosti získaných výsledků však nebylo možné stanovit spolehlivé biologické závěry. Bylo však možné pozorovat vliv viru pytlíčkovitého plodu na koncentraci apiaecinu a jeho prekurzoru v tělech včel. Metoda by mohla být v budoucnu využita i pro sledování vztahu mezi infekcí, hladinou peptidů a odolností včelstev na daného patogena.
6. Vyvinutá metodika purifikace a následnou analýzy metodou nanoLC-MS má potenciální využití pro studie dalších bazických peptidů, které se mezi jednotlivými vzorky včel nejvíce odlišovaly.

Další práce by měla být zaměřena na analýzu velkého počtu různých vzorků včel a následné vyhodnocení získaných dat s biologickými souvislostmi. Pro vylepšení metodiky detekce by bylo vhodné zařadit purifikační krok obsahující molekulové síto. Pro kvantifikaci peptidů by

bylo možné použít značené standardy. Přínosná bude identifikace a studium dalších bazických peptidů, jejichž množství se významně liší mezi vzorky.

## 9 Seznam literatury

- Amaral, I.M.R., Neto, J.F.M., Pereira, G.B., Franco, M.B., Beletti, M.E., Kerr, W.E., Bonetti, A.M. and Ueira-Vieira, C. (2010) Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, **41**, 123-129.
- Andreu, D. and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, **47**, 415-433.
- Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M. and Zunino, P. (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*, **131**, 324-331.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. and Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, **11**, 2284-2290.
- Audsley, N. and Weaver, R.J. (2006) Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca-corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Peptides*, **27**, 512-520.
- Bachanova, K., Klaudiny, J., Kopernicky, J. and Simuth, J. (2002) Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*, **33**, 259-269.
- Bedick, J.C., Tunaz, H., Nor Aliza, A.R., Putnam, S.M., Ellis, M.D. and Stanley, D.W. (2001) Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **130**, 107-117.
- Benincasa, M., Pacor, S., Gennaro, R. and Scocchi, M. (2009) Rapid and Reliable Detection of Antimicrobial Peptide Penetration into Gram-Negative Bacteria Based on Fluorescence Quenching. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 3501-3504.
- Beutler, B. and Hoffmann, J. (2004) Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **16**, 1-3.
- Bitondi, M.M.G., Mora, I.M., Simões, Z.L.P. and Figueiredo, V.L.C. (1998) The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 499-507.
- Boerjan, B., Cardoen, D., Bogaerts, A., Landuyt, B., Schoofs, L. and Verleyen, P. (2010) Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*. *Neuropharmacology Neuropeptides*, **58**, 248-258.
- Boutros, M., Agaisse, H. and Perrimon, N. (2002) Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Developmental Cell*, **3**, 711-722.
- Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P. and Tempst, P. (1993) Apidaecin Multipetide Precursor Structure - a Putative Mechanism for Amplification of the Insect Antibacterial Response. *Embo Journal*, **12**, 1569-1578.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P. and Tempst, P. (1994) Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Posttranslational Conversion of the Precursor Structures. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 28569-28575.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. (1989) Apidaecins - Anti-

bacterial Peptides from Honeybees. *Embo Journal*, **8**, 2387-2391.

Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Vandamme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F. and Tempst, P. (1990) Isolation and Characterization of Abaecin, a Major Antibacterial Response Peptide in the Honeybee (*Apis-Mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, **187**, 381-386.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F. and Tempst, P. (1993) Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-Inducible in the Honeybee (*Apis-Mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 7044-7054.

Casteels, P. and Tempst, P. (1994a) Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Non-Poreforming Mechanism Involving Stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **199**, 339-345.

Casteels, P., Romagnolo, J., Castle, M., Casteels-Josson, K., Erdjument-Bromage, H. and Tempst, P. (1994b) Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum and combating acquired resistance. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26107-26115.

Cerenius, L. and Soderhall, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 116-126.

Cerovsky, V., Pohl, J., Yang, Z.H., Alam, N. and Attygalle, A.B. (2007) Identification of three novel peptides isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polistes major major*. *Journal of Peptide Science*, **13**, 445-450.

Cerovský, V., Slaninová, J., Fucík, V., Hulacová, H., Borovicková, L., Jezek, R. and Bednářová, L. (2008a,) New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptides*, **29**, 992-1003.

Cerovsky, V., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Bednarova, L., Borovickova, L., Slaninova, J. and Fucik, V. (2008b) Melectin: A Novel Antimicrobial Peptide from the Venom of the Cleptoparasitic Bee *Melecta albifrons*. *Chembiochem*, **9**, 2815-2821.

Chan, Q., Melathopoulos, A., Pernal, S. and Foster, L. (2009) The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics*, **10**, 387.

Chen, Y., Evans, J. and Feldlaufer, M. (2006) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, **92**, 152 - 159.

Chen, Y.P. and Siede, R. (2007) Honey Bee Viruses Advances in Virus Research. In Karl Maramorosch, A.J.S.a.F.A.M. (ed.). Academic Press, pp. 33-80.

Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B. and Poste, G. (1997) The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 497-503.

Cooper, E.L. (2006) Comparative immunology. *Integrative zoology*, **1**, 32-43.

Czihal, P. and Hoffmann, R. (2009) Mapping of Apidaecin Regions Relevant for Antimicrobial Activity and Bacterial Internalization. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **15**, 157-164.

de Miranda, J.R. and Genersch, E. (2010) Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S48-S61.

Danihlík, J. (2009) Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel, PŘF UP v Olomouci, bakalářská práce.

Decanini, L.I., Collins, A.M. and Evans, J.D. (2007) Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *Journal of Heredity*, **98**, 195-201.

- Dutta, R.C., Nagpal, S. and Salunke, D.M. (2008) Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**, 1005-1015.
- Evans, J. (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol*, **85**, 105 - 111.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z. and Hultmark, D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, **15**, 645-656.
- Evans, J.D. and Spivak, M. (2010) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S62-S72.
- Fontana, R., Mendes, M.A., Souza, B.M.d., Konno, K., César, L.M.M., Malaspina, O. and Palma, M.S. (2004) Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, **25**, 919-928.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. and Kobayashi, K. (1990) A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly - Purification and Determination of the Primary Structure of Royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 11333-11337.
- Garwood J. (2010) One Big Sticky Mess, *Lab Times*, **6**, 30 - 35
- Glinski Z., Jarosz J. (1993) Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta*, **28**, 69-78.
- Gomes, V.M., Carvalho, A.O., Da Cunha, M., Keller, M.N., Bloch, J., C., Deolindo, P. and Alves, E.W. (2005) Purification and characterization of a novel peptide with anti-fungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **45**, 817-827.
- Gregory, P.G., Evans, J.D., Rinderer, T. and de Guzman, L. (2005) Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science*, **5**.
- Götz P., Boman HG (1985) Insect immunity. *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **3**, 453 - 485
- Hancock, R.E.W. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet*, **349**, 418-422.
- Hara, S. and Yamakawa, M. (1995) A Novel Antibacterial Peptide Family Isolated from the Silkworm, *Bombyx-Mori*. *Biochemical Journal*, **310**, 651-656.
- Harbo, J.R. and Harris, J.W. (2009) Responses to *Varroa* by honey bees with different levels of *Varroa* Sensitive Hygiene. *Journal of Apicultural Research*, **48**, 156-161.
- Hultmark, D. (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, **15**, 12-19.
- Ingham, A.B. and Moore, R.J. (2007) Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **47**, 1-9.
- Jin, F.-l., Xu, X.-x., Yu, X.-q. and Ren, S.-x. (2009) Expression and characterization of antimicrobial peptide CecropinAD in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, **44**, 11-16.
- Jing, X.L., Luo, X.G., Tian, W.J., Lv, L.H., Jiang, Y., Wang, N. and Zhang, T.C. (2010) High-Level Expression of the Antimicrobial Peptide Plectasin in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, **61**, 197-202.
- Kanbar, G. and Engels, W. (2004) Visualisation by vital staining with trypan blue of wounds punctured by *Varroa destructor* mites in pupae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **35**, 25-29.

- Kanost, M.R. and Gorman, M.J. (2008) Phenoloxidases in Insect Immunity Insect Immunology. In. Academic Press, San Diego, pp. 69-96.
- Klaudiny, J., Albert, T., Bachanova, K., Kopernick, J. and Simuth, 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.
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R. and Otvos, L. (2001) The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**, 3016-3026.
- Lavine, M.D. and Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Li, W.F., Ma, G.X. and Zhou, X.X. (2006) Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides*, **27**, 2350-2359.
- Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N. and Scocchi, M. (2007) Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology*, **66**, 151-163.
- Nappi, A.J. and Ottaviani, E. (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, **22**, 469-480.
- Otvos, L. (2000a) Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science*, **6**, 497-511.
- Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S., Bulet, P. and Blaszczyk-Thurin, M. (2000b) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, **39**, 14150-14159.
- Papagianni, M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, **21**, 465-499.
- Parker, J.S., Mizuguchi, K. and Gay, N.J. (2001) A family of proteins related to Spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome. *Proteins-Structure Function and Genetics*, **45**, 71-80.
- Piantavigna, S., Czihal, P., Mechler, A., Richter, M., Hoffmann, R. and Martin, L.L. (2009) Cell Penetrating Apidaecin Peptide Interactions with Biomimetic Phospholipid Membranes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **15**, 139-146.
- Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, **2**, 1896-1906.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D. and Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**, 536-547.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. (2002) Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, **84**, 357-364.
- Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R.C., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., Pedone, C. and Capparelli, R. (2010) Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science*, **17**, 348-352
- Rozsypal, S. a kol. (2003) Nový přehled biologie, pp 454-455, Scientia, Praha, ČR
- Salt, G. (1970) Experimental Studies in Insect Parasitism .15. Means of Resistance of a Parasitoid Larva. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **176**, 105-114



- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.
- Schägger H. (2006) Tricine SDS-PAGE, *Nature Protocols*, **1**, 16 - 23
- Schönfeld A. (1955) Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné, pp. 9 – 11, SZN Praha, ČSR
- Schlüns H., Crozier H. (2007) Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*, **16**, 753-759.
- Schmid M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W.W., Stanley, D.W. and Tautz, J. (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 439-444.
- Scocchi, M., Luthy, C., Decarli, P., Mignogna, G., Christen, P. and Gennaro, R. (2009) The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits in vitro the Molecular Chaperone DnaK. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **15**, 147-155.
- Shen, X., Ye, G., Cheng, X., Yu, C., Altosaar, I. and Hu, C. (2010) Characterization of an abaecin-like antimicrobial peptide identified from a *Pteromalus puparum* cDNA clone. *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**, 24-29.
- Simone, M., Evans, J.D. and Spivak, M. (2009) Resin Collection and Social Immunity in Honey Bees. *Evolution*, **63**, 3016-3022.
- Thomas H., H.J., Peychl J., Schevchenko A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChip<sup>TM</sup> 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*, **923**.
- Turner, R.J. (1994) Immunology - A comparative Approach.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y.P., Underwood, R., Tarpy, D.R. and Pettis, J.S. (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *Plos One*, **4**.
- Wang, L. and Ligoxygakis, P. (2006) Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology*, **211**, 251-261.
- Westermeier, R. (2006) Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue Staining of polyacrylamide gels. *Proteomics*, 61-64.
- Whitfield, C., Cziko, A. and Robinson, G. (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, **302**, 296 - 299.
- Wilson-Rich, N., Dres, S.T. and Starks, P.T. (2008) The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, **54**, 1392-1399.
- Wimley, W.C. and Hristova, K. (2011) Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. *Journal of Membrane Biology*, **239**, 27-34.
- Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C.A.E., Seow, S.V., Zhang, S.G. and Yang, Y.Y. (2011) Synthetic cationic amphiphilic alpha-helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, **32**, 2204-2212.
- Yoon, H.J., Sohn, M.R., Choo, Y.M., Li, J., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2009) Defensin gene sequences of three different bumblebees, *Bombus* spp. *Journal of*
- Zhou, Q.F., Luo, X.G., Ye, L. and Xi, T. (2007) High-level production of a novel anti-

microbial peptide perinerin in Escherichia coli by fusion expression. *Current Microbiology*, **54**, 366-370.

Zufelato, M.S., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P. and Hartfelder, K. (2000) The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod Structure & Development*, **29**, 111-119.

## 10 Seznam zkratek

- AcN – acetonitril  
AK – aminokyselina  
CHCA – kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová  
Da – jednotka Dalton  
DEAE – diethylaminoethyl  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
DnaK – typ chaperonu  
dsRNA – dvouvláknová RNA  
FA – kyselina mravenčí  
G+ - gram pozitivní  
G- - gram negativní  
GroEL – typ chaperonu  
I $\kappa$ B – inhibitor NF- $\kappa$ B  
IEC – iontoměničová chromatografie  
IMP – imunopeptid  
LC – kapalinová chromatografie  
LPS - lipopolysacharid  
MALDI-TOF – desorpční ionizace laserem za účasti matrice – analyzátor doby letu  
MS – hmotnostní spektrometrie  
nanoLC-MS – nanokapilární kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí  
NC - nitrocelulóza  
NF- $\kappa$ B – typ transkripčního faktoru  
PCA – analýza hlavních komponent  
PGRP - peptidoglykan rozponávající proteiny  
pI – izoelektrický bod  
PO - fenoloxidasa  
proPO - profenoloxidasa  
proPO-AS – komplex aktivující profenoloxidasu  
PVDF – polyvinilidendifluorid  
RNA – ribonukleová kyselina  
SAX – silný aniontoměnič  
SCX – silný kationtoměnič  
SDS – dodecylsulfát sodný.  
SDS-PAGE – polyakrylamidová elektroforéza s použitím SDS

SPE – extrakce na pevné fázi

TEAE – triethylaminoethyl

TNF – faktor nekrózy tumorů

TFA – trifluoroctová kyselina