

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



Přírodovědecká
fakulta

Katedra biochemie

Mechanismy regulace parametrů humorální imunity včel

Analýza hladiny včelích antimikrobiálních peptidů a jejich
biologických souvislostí

Autoreferát disertace k získání vědecké hodnosti doktor

Autor:	Mgr. Jiří Danihlík
Studijní program:	P1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Konzultanti:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr. Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Rok zahájení studia	2011

Uchazeč:

Mgr. Jiří Danihlák

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci Šlechtitelů 27, Olomouc, 783 71, ČR

Školitel:

prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc, 783 71, ČR

Konzultanti:

doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc, 783 71, ČR

Mgr. René Lenobel, Ph.D.

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc, 783 71, ČR

Oponenti:

Prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci 17. listopadu, Olomouc, 771 46, ČR

Prof. Ing. Ivan Mikšík, Dr.Sc.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ČR

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studijního programu P1406 na Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum ve spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2011 – 2015.

Obsah

1	Souhrn	7
2	Summary	9
3	Cíle práce	11
4	Teoretický úvod	11
4.1	Antimikrobiální peptidy	11
4.2	Apidaeciny	12
4.3	Metody analýzy biologicky aktivních peptidů	14
5	Metody	15
5.1	Zpracování vzorků včel	15
5.1.1	Chromatografická předseparace vzorku s využitím sorbentu WCX Oasis™	15
5.2	Odsolení vzorku na C ₈ Stage Tip	15
5.3	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	16
5.4	Nanoprůtoková kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí	16
5.5	Optimalizace měření exprese genů antimikrobiálních peptidů	16
5.5.1	Izolace a přečištění RNA	16
5.5.2	Reverzně transkriptasová reakce přepisu RNA do cDNA	17
5.5.3	Kvantitativní PCR	17
6	Výsledky	17
6.1	Derivatizace apidaecinu 1A malondialdehydem	18
6.2	Optimalizace chromatografické purifikace apidaecinu 1 z komplexní matrice vzorku	19
6.3	Separace a kvantifikace isoform apidaecinu 1 metodou nLC-MS	20
6.4	Validace metody	20
6.5	Kvantifikace relativní exprese genů pro apidaeciny a abaecin	21
6.6	Aplikace optimalizovaných metod k analýze experimentálních vzorků včel	22
7	Diskuse	23
8	Závěr	24
9	Seznam zkratk	25
11	Seznam literatury	27
12	Životopis	31
12.1	Vzdělání	31
12.2	Zahraniční stáže	31
13	Seznam publikací a odborných konferencí	31

13.1	Články v impaktovaných časopisech	31
13.2	Článek v recenzovaném časopise.....	32
13.3	Článek v přípravě.....	32
13.4	Příspěvky na konferencích	32
13.4.1	Přednášky.....	32
13.4.2	Plakátová sdělení.....	33
13.5	Ocenění	34
13.6	Seznam ostatních, neimpaktovaných článků	34

1 Souhrn

U hmyzu, stejně jako i u jiných organismů, se vyvinul imunitní systém, jehož cílem je chránit jedince před nepříznivými vlivy z prostředí, kde jsou vystaveny tlaku patogenů. Imunitní systém sestává ze tří úrovní individuální ochrany: 1) fyzikální bariéry, 2) buněčná imunita, 3) humorální imunita, u sociálního hmyzu, ke kterému patří i včela medonosná (*Apis mellifera*) pak i sociální imunita.

Antimikrobiální peptidy jsou významnou součástí humorální složky imunitního systému, protože potlačují růst mikroorganismů, nacházejí se v hemolymfě včel, jedu, v mateří kašičce i v medu. Antimikrobiální peptidy jsou produkovány hlavně tukovým tělesem, dále pak hemocyty a buňkami střeva. Mezi jejich zástupce patří apidaeciny produkové právě do hemolymfy.

Produkce apidaecinů je silně stimulována bakteriálními infekcemi. Dosud provedené studie vlivu jak patogenů, tak i dalších případných modulátorů tvorby apidaecinů, např. pesticidů, byly sledovány pouze na úrovni exprese genů pomocí molekulárně biologických metod, avšak metoda pro absolutní kvantifikaci samotného aktivního peptidu v tělech nebo dílčích tkáních včel dosud nebyla popsána.

Pro kvantifikaci apidaecinů bylo potřeba vyvinout citlivou analytickou metodu a současně vyřešit problém rychlých ztrát silně bazických apidaecinů během zpracování vzorků i práce se standardy. Optimalizovaný protokol zahrnuje zpracování vzorků včel nebo jejich tkání homogenizací a tepelnou denaturaci balastních proteinů přítomných v homogenátu. Purifikace apidaecinů využívá iontoměničové chromatografie na slabém katexu v laboratorně připravených kolonkách z GELoader špiček a vhodného chromatografického sorbentu. Frakce obsahující isoformy apidaecinu 1 je dále přečištěna a odsolena v tzv. Stage Tip kolonkách s reverzní fází typu C₈. Purifikovaná frakce isoformem apidaecinu 1 je dělena nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií na koloně s reverzní fází (C₄) ve spojení s detekcí vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. Optimalizovaná metoda má návratnost ~45%, a přesnost <10 % při hladině peptidu 0,1 pmol. Kalibrace vykazuje lineární rozsah v rozmezí 0 – 5 pmol, limit detekce je ~50 fmol, limit kvantifikace pak 0,1 pmol. Metoda využívá kvantifikace s interním standardem, kterým je [¹³C₆¹⁵N₄] apidaecin 1A značený na C-koncovém argininu. Koncentrace isoformem apidaecinu 1 v hemolymfě jednotlivých zdravých včel byla 13,0 ng/μl (95% konfidenční interval, CI: 7,5 – 18,6 ng/μl). Hrudníky zdravých

úlových včel obsahovaly 36,2 ng/hrudník (95% CI: 18,9–53,6 ng/hrudník) a hlavy 12,9 ng/hlavu (95% CI: 9,1–16,7 ng/hlavu).

Pro měření relativní exprese genů kódujících apidaeciny a abaecin byla zavedena a optimalizována metoda kvantitativní PCR ve vzorcích včel. Metoda zahrnuje izolaci celkové RNA, přepis do cDNA a samotnou qPCR reakci pro stanovení relativní exprese. Byly validovány vybrané provozní geny (*Arp1*, *EF1a-F2*) a použity pro stanovení relativní exprese genů apidaecinů a abaecinu.

Zavedené metody kvantifikace hladiny isoformu apidaecinu 1 a exprese genů pro apidaeciny a abaecin byly využity pro studium vlivu složení potravy na tyto faktory humorálního imunitního systému. Výsledky studie ukazují, že proteinová výživa je nutná pro vývoj hrudníku i pro produkci isoformu apidaecinu 1. Medián koncentrace isoformu apidaecinu 1 byl 0,2 ng/mg hrudníku (95% CI: 0 – 0,4 ng/mg) u včel krmených 18 dní neproteinovou výživou, zatímco v hrudnících včel krmených proteinovou výživou byl medián koncentrace peptidu 2,2 ng/mg (95% CI: 1,8 – 2,6 ng/mg). Krmení včel různou proteinovou výživou, případně pylem jako hlavním zdrojem proteinů ve výživě včel, však indukuje i rozdílnou expresi genů apidaecinů i abaecinu v tkáni zadečku dospělých včel, kde se nacházejí buňky tukových těles.

Optimalizovaná metoda kvantifikace isoformu apidaecinu 1 může být využita při výzkumu imunity včel a zároveň může posloužit jako modelová strategie kvantifikace jiných silně bazických peptidů.

2 Summary

Insects, as well as other organisms, have immune systems to survive in the environment, and to defend themselves from pathogens. Honey bee innate immunity consists of three levels of individual responses: 1) physical barriers, 2) cellular immunity, 3) humoral immunity, and because honey bees are social insects, they have developed also social immunity level.

Antimicrobial peptides are important part of humoral immunity, because they are able to suppress bacterial growth. They were detected in the hemolymph, sting, royal jelly and honey. Antimicrobial peptides are produced mainly in fat bodies and also in hemocytes and intestine cells. Apidaecins belong to the antimicrobial peptide family and are secreted into the hemolymph.

Production of apidaecins is stimulated by bacterial challenges. The effects of pathogens, pesticides or other possible immune modulators have been studied only by molecular biology methods so far, whereas a method for the absolute quantification of apidaecins in bee bodies or tissues has been missing.

It was necessary to develop a sensitive analytical method for quantification and in parallel to solve problems with rapid losses of highly basic apidaecins occurring during sample preparation. The optimized protocol comprises of bee samples preparation by homogenization and heat denaturation of ballastproteins present in the homogenate. The purification of apidaecin is based on ion-exchange chromatography on weak cation exchanger in lab-made columns from GELoader tips filled with a chromatographic sorbent. The enriched apidaecin 1 isoforms fraction is purified and desalted on C₈ Stage Tips. The purified fraction is separated by a nanoliquid chromatography on C₄ reverse phase column connected on line with a high-resolution mass spectrometer. The recovery of the method is ~45%, precision <10 % at 0.1 pmol level. Calibration is linear in range 0 – 5 pmol. The limit of detection is ~50 fmol, limit of quantification 0.1 pmol. Internal standard [¹³C₆¹⁵N₄] apidaecin 1A labeled on arginine at C-end is used as internal standard. The concentration of apidaecin 1 isoforms is 13.0 ng/μl (95% confidence interval, CI: 7.5 – 18.6 ng/μl) in hemolymph. Thoraces contain 36.2 ng/unit (95% CI: 18.9–53.6 ng/unit) and heads 12.9 ng/unit (95% CI: 9.1–16.7 ng/unit).

A quantitative PCR protocol was optimized for measuring the relative expression of genes coding apidaecins and abaecin in bee samples. The method includes RNA isolation, reverse transcriptase reaction for cDNA synthesis and finally the qPCR for determination of

relative gene expression. Housekeeping genes (*Arp1*, *EF1a-F2*) were validated and then used for relative quantification of gene expressions of apidaecins and abaecin.

Validated method for apidaecin 1 isoforms and relative expression of genes for apidaecins and abaecin were employed in the research of bee nutrition and its' effect on humoral immunity. The obtained results confirmed that protein diet is important for thorax development and for production of apidaecin 1 isoforms. Honey bees fed sugar only for 18 days had median of apidaecin 1 isoforms 0.2 ng/mg of thorax (95% CI: 0 – 0.4 ng/mg), whereas thoraces of bees fed protein diet had median 2.2 ng/mg (95% CI: 1,8 – 2.6 ng/mg). Various pollen diets as a natural source of protein or protein supplement induce different gene expressions of genes for apidaecins and abaecin in bee abdomens, where fat bodies produce them.

The optimized method for apidaecin 1 isoforms quantification will be applied in honey bee research and can be considered as a proof of concept for quantification of other highly basic peptides.

3 Cíle práce

- Příprava literární rešerše zadané problematiky a její shrnutí formou přehledných článků
- Osvojení a zavedení metod kvalitativní a kvantitativní analýzy genové exprese a hladiny včelích antimikrobiálních peptidů
- Studium genové exprese, hladiny a funkce vybraných včelích AmP účastníků se imunitní odpovědi včel na infekci patogeny
- Studium vztahu vybraných parametrů humorální imunity včel a tolerance/odolnosti včel na nákazu významnými včelími patogeny a parazity

4 Teoretický úvod

Kolapsy včelstev, které jsou v poslední době zaznamenávány v Evropě i Americe, vedou k tomu, že se zdraví včel dostává do popředí zájmů vědců. Sami včelaři mají zájem na tom, aby jejich včelstva byla zdravá a vitální, ovšem zdraví včelstev ovlivňuje mnoho faktorů životního prostředí, choroby včel i samotné zásahy včelařů. Před patogeny chrání včely jejich vlastní imunitní systém skládající se z několika úrovní ochrany: 1) fyzikální bariéry, 2) buněčná imunita, 3) humorální imunita (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi eusociální hmyz žijící v početných koloniích. Množství jednotlivců (včel) v hnízdě vede nutně k zvýšenému riziku přenosu chorob, a proto si včelstva vyvinula další úroveň imunity - sociální imunitu. K té patří hlavně hygienické chování včelstva, obrana česna, hynutí starých a nemocných včel mimo prostory úlu apod. Hlavním cílem sociální imunity je snižování infekčního tlaku ve včelstvu (Cremer *et al.*, 2007).

Faktory ovlivňující zdraví včelstev lze hodnotit jednak na úrovni zootechnické, kdy zkušený včelař pozná vitalitu i vliv chorob na zdraví včel přímo na včelnici, tak i na úrovni laboratorní, kde se sledují vlivy na jednotlivé včely nebo skupiny včel v *in vitro* pokusech. Mezi nejčastěji sledované parametry patří změny v expresi, tvorbě či aktivitě molekul účastníků se humorální imunitní odpovědi. Mezi tyto parametry patří lektiny, enzym fenoloxidasa a významná skupina antimikrobiálních peptidů (Evans *et al.*, 2006).

4.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AmP) včel se vyskytují v hemolyfě (apidaeciny, abaecin, defensin-1), tam se nachází i malý antimikrobiální protein hymenoptaecin, dále pak v mateří kašičce (royalisin, jelleiny) i jedu a na kutikule (melittin, apamin) (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Klaudiny *et al.*, 2005). AmP

vykazují aktivitu proti širokému spektru bakterií i hub, přičemž jejich specifita se vzájemně doplňuje, např. apidaeciny jsou více aktivní vůči Gramnegativním (G^-) bakteriím, naopak na abaecin jsou citlivější Grampozitivní bakterie (G^+). Jejich účinek spočívá v elektrostatické interakci peptidu s buněčnou stěnou bakterie, skrze kterou mohou projít do cytosolu buňky a navázat se na „heat shock“ protein DnaK nebo na chaperoninový komplex GroEL-GroES, čímž je zabráněno skládání nově syntetizovaných proteinů (Hancock & Chapple, 1999; Otvos *et al.*, 2000). Tvorba antimikrobiálních peptidů je řízena signální dráhou Toll a IMD, které reagují po interakci receptorových proteinů na povrchu buněk s lipopolysacharidy z bakteriálních buněčných stěn, nebo s β -1,3-glukany typickými pro buněčné stěny hub (Evans *et al.*, 2006). Právě po nákaze včely patogenem dochází ke zvýšené expresi peptidů a jejich zvýšené hladině v hemolymfě včel. Syntéza peptidů probíhá především v tukovém tělese včel nacházejícím se v zadečku a dále pak v hemocytech nebo buňkách střeva, peptidy jsou produkovány do hemolymfy, kde také reagují s patogenními mikroorganismy (Vilmos & Kurucz, 1998). Mohou být produkovány přímo do mateří kašičky z hltanových žláz dělnic (jelleiny, royalisin) nebo v jedové žláze (melittin, apamin), kde se pak stávají složkou včelího jedu.

4.2 Apidaeciny

Apidaeciny patří do skupiny silně bazických peptidů ($pI \sim 11$) bohatých na prolin, skládají se z 18 aminokyselin. Jejich aktivní forma je proteolyticky odštěpena z prekurzorového proteinu, jenž obsahuje několik kopií isoform peptidu. Na základě analýzy cDNA byly detekovány tři varianty genů apidaecinů: *Apid14*, *Apid22* a *Apid73* (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

Tab. č. 1: Přehled isoform aktivních apidaecinů se zvýrazněním odlišností v aminokyselinových sekvencích (tučně) (Casteels *et al.*, 1989; Casteels-Josson *et al.*, 1993).

Název isoformy	Sekvence	Uniprot číslo	Název genu	Počet kopií/gen
Apidaecin 1A	GNNRPFVYIPQPRPPHPRI	Q06601	<i>Apid14</i>	1
		P35581	<i>Apid22</i>	1
		Q06602	<i>Apid73</i>	1
Apidaecin 1B	GNNRPFVYIPQPRPPHPRL	Q06601	<i>Apid14</i>	2
		P35581	<i>Apid22</i>	3
		Q06602	<i>Apid73</i>	6
Apidaecin 2	GNNRPIYIPQPRPPHPRL	Q06601	<i>Apid14</i>	2
Apidaecin*	GNNRPFVYISQPRPPHPRL	Q06602	<i>Apid73</i>	2

*predikovaný peptid

Produkce aktivních apidaecinů pravděpodobně probíhá ve třech krocích, kdy je prekurzorový protein obsahující několik kopií aktivních isoform apidaecinů (viz. Obr. č. 1) sestřižen na propeptidy, u kterých samotnou sekvenci aktivního peptidu předchází 6-8 aminokyselin dlouhá prekurzorová sekvence. Tu pro aktivaci peptidů odstraní dipeptidylaminopeptidasa (Casteels-Josson *et al.*, 1993). Přítomnost tohoto enzymu již byla u včel popsána v souvislosti se sestřihem peptidu melittinu (Kreil *et al.*, 1980).

```

      10      20      30      40      50
MKNFALAILV VTFVVAVFGN TNLDPPTSPA RLRREAKPEA EP GNNRPIYI
      60      70      80      90     100
PQPRPPHPRL RREAEPKAEP GNNRPIYIPQ PRPPHPRLRR EAESEAEPEGN
     110     120     130     140     150
NRPFVYIPQPR PPHPRLRREP EAEFGNNRPFV YIPQPRPPHP RLRRPEAEPE
     160
GNNRPFVYIPQ PRPPHPRI

```

Obr. č. 1: Předpovězená sekvence prekurzorového proteinu, který je kódován genem *Apid14* s vyznačením signální sekvence (žlutě), propeptidů (červeně) a dvojic argininů, které jsou odštěpeny z C-konce aktivních peptidů (modře). Aktivní isoformy apidaecinu jsou zvýrazněny tučně a podtrženy (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

4.3 Metody analýzy biologicky aktivních peptidů

Vyhledávání, identifikace a testování biologicky aktivních peptidů bez ohledu na experimentální přístup je výzvou pro každý výzkumný tým, který se touto problematikou zabývá. Příprava vzorku klade požadavky na minimální ztráty analytu, účinné odstranění nežádoucích látek a kontaminantů, celý analytický proces by měl být rychlý, efektivní a s nízkými náklady (Kataoka, 2003). Analytická separace a následná identifikace či kvantifikace peptidů zahrnuje elektromigrační nebo chromatografické metody s hmotnostní detekcí (MS), z nichž právě kapalinová chromatografie v přímém nebo nepřímém spojení s MS detekcí je dnes nejčastěji využívanou strategií. Vývojový posun v rychlosti, přesnosti a snadnosti použití hmotnostních analyzátorů a také ve zdokonalování separačních technik vede k posunu od prosté identifikace ke kvantifikaci peptidů a proteinů v biologických vzorcích.

V rámci dosavadního výzkumu v jiných laboratořích byly antimikrobiální peptidy včel (apidaeciny, abaecin, defensin-1) izolovány z jedinců laboratorně infikovaných bakterií *E. coli* (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1990). Hemolymfa včel byla sbírána, precipitována pomocí 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) a následně tepelně denaturována. K separaci byla použita chromatografie na reverzní fázi s následnou UV-Vis detekcí (HPLC-UV-Vis). Aminokyselinová sekvence peptidů byla zjištěna pomocí Edmanovy degradace (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993). Metoda MALDI-TOF MS byla využita pro detekci peptidů melittinu a apaminu na kutikulách včel, kde pravděpodobně zastávají imunitní funkci. MALDI-TOF detekce v „off-line“ kombinaci s kapalinovou chromatografií byla využita pro detekci peptidů z orgánů *corpora cardiaca* a *corpora allata* (Audsley & Weaver, 2006). Peptidy royalisin a defensin z mateří kašičky nebo homogenátů hrudníků nebo hlav včel byly izolovány pomocí klasické gelové chromatografie následovanou identifikací pomocí enzymového štěpení (Fujiwara *et al.*, 1990). Většina vědeckých prací zaměřená na sledování změn ve tvorbě antimikrobiálních peptidů včel využívá metod molekulární biologie. Metody kvantitativní PCR a její modifikace jsou využívány ke stanovení exprese genů antimikrobiálních peptidů (Chaimanee *et al.*, 2012; Siede *et al.*, 2012; Jefferson *et al.*, 2013). Znalost míry exprese je důležitá pro porozumění humorálnímu imunitnímu systému a jeho reakcím na možné vlivy, avšak je obecně známo, že samotná hladina mRNA peptidu nemusí nutně korelovat s koncentrací peptidů v konkrétní tkáni nebo celém organismu. Vhodná a citlivá metoda pro kvantifikaci antimikrobiálních peptidů v tkáních nebo tělech celých včel doposud chyběla.

5 Metody

5.1 Zpracování vzorků včel

Při zpracování vzorků včel a hemolymfy byl použit protokol založený na vysrážení nežádoucích proteinů 0,1% trifluoroctovou kyselinou (TFA) a následné denaturaci nežádoucích proteinů varem (Casteels *et al.*, 1989). Hemolymfa nebo tělní části byly homogenizovány v kulovém mlýnku FastPrep FP120 homogenizer při intenzitě 5 m/s po dobu 20 s. Homogenát byl následně centrifugován ($15000 \times g$, 10 min), inkubován při 100 °C po dobu 10 min a po ochlazení znova centrifugován stejně jako v předchozím kroku. Supernatant vzorku byl zamražen a lyofilizován.

5.1.1 Chromatografická předseparace vzorku s využitím sorbentu WCX OasisTM

Sorbent WCX OasisTM (Waters, UK) se používá pro dělení bazických látek jako slabý kationtoměnič kombinovaný s reverzní fází. Zdrojem sorbentu byly SPE kolony, které byly rozebrány a sorbent byl následně nanesen do špiček GELoader (Eppendorf) v navážce 5 mg/špička.

Tab. č. 2: Optimalizovaný postup purifikace apidaecinu 1.

	WCX Oasis TM
Ekvilibrace	methanol ($4 \times 50 \mu\text{l}$)
	voda ($2 \times 50 \mu\text{l}$)
	<i>nanesení 50 μl vzorku</i>
Promytí	NH ₄ HCO ₃ , pH 9 ($2 \times 50 \mu\text{l}$)
	methanol ($2 \times 50 \mu\text{l}$)
Eluce	50% v/v acetonitril + 5% v/v FA ($2 \times 50 \mu\text{l}$)

5.2 Odsolení vzorku na C₈ Stage Tip

Vzorky byly po přečištění na WCX OasisTM sorbentu odsoleny s využitím sorbentu z C₈ extrakčních disků plněných do 200 μl špiček (Rappsilber *et al.*, 2007). Vždy 2 kusy sorbentu vykrojených ocelovou jehlou z extrakčních disků byly plněny do koncové části 200 μl špiček. Jednotlivé mobilní fáze byly přes sorbent protlačeny odstředivou silou při centrifugaci ($1000 \times g$, 5 min) špičky zasazené v plastové mikrozkuhavce.

Tab. č. 3: Postup odsolení vzorků na C₈ sorbentu z extrakčních disků.

	C ₈
	isopropanol (50 µl)
Ekvilibrace	5% v/v FA (2 × 50 µl)
	<i>nanesení 50 µL vzorku</i>
Promytí	5% v/v FA (2 × 50 µl)
Eluce	50% v/v acetonitril (2 × 50 µl)

5.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Metoda MALDI-TOF MS byla využita pro kontrolu průběhu reakce přichemické derivatizaci standardů peptidů a také pro optimalizaci postupu purifikace na iontoměničích. K měření byl použit přístroj Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo) vybavený iontovým zdrojem microScout s dusíkovým laserem 337 nm o frekvenci 60 Hz. Jako matrice byla použita α -kyano-4-hydroxy-skořicová kyselina (CHCA) v koncentraci 5 mg/ml v 60% (v/v) acetonitrilu obsahujícím 0,1% TFA (v/v). Před samotným měřením byly vzorky odsoleny pomocí C₈ Stage Tip. Před smísením s matricí byly vzorky rozpuštěny v 0,1% TFA, poté bylo 0,6 µl vzorku a 0,6 µl matrice nanášeno na destičku MSP AnchorChip™ 600/96.

5.4 Nanoprůtoková kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Identifikace a kvantifikace peptidů byla provedena na hmotnostním spektrometru UHR-QTOF maXis v přímém spojení s nanoprůtokovým chromatografem nanoEASY (oba přístroje od firmy Bruker Daltonik, Německo). Podrobný popis nastavení a separace studovaných peptidů je uveden v článku Danihlík *et al.* (2014).

5.5 Optimalizace měření exprese genů antimikrobiálních peptidů

5.5.1 Izolace a přečištění RNA

Vzorky včel připravené pro kvantifikaci exprese genů antimikrobiálních peptidů byly před zpracováním zmrazeny při -80 °C. Ke kvantifikaci genové exprese byly použity zadečky

včel, které byly homogenizovány v kuličkovém mlýnku v prostředí guanidium thiokyanátového pufru (GITC pufr) v množství 300 μ l pufru/zadeček. GITC pufr obsahuje: 5,25 M guanidium thiokyanát, 50 mM Tris-HCl (pH 6,4), 20 mM EDTA, 1,3% Triton X-100, 1% β -merkaptoethanol (Evans *et al.*, 2013). Vzorek 100 μ l homogenátu byl smíchán s 350 μ l RNA pufru. K izolaci celkové RNA byl použit kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), postup izolace byl totožný s návodem výrobce kitu. Kontaminující DNA byla z izolátů RNA odstraněna DNAsou Turbo DNase (Ambion). Okamžitě po ošetření vzorků DNAsou byla RNA izolována magnetickými kuličkami pomocí kitu Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter). Integrita izolované RNA byla testována separací horizontální agarosovou elektroforézou: 1,1% w/v agarosa byla za horka rozpuštěna v TRIS-acetátovém-EDTA pufru, k vizualizaci RNA byl použit bromid ethidia, elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V. Jako standard velikosti (50 – 1000 bp) produktů na agarosovém gelu byla použita sada PCR Markers (Promega).

5.5.2 Reverzně transkriptasová reakce přepisu RNA do cDNA

RNA byla za využití reverzní transkriptasy přepsána do cDNA. K přepisu byl použit Transcriptor High Fidelity kit (Roche). Bylo přepisováno maximální množství RNA během jedné reakce. Reakční objemy jednotlivých komponent a nastavení reakce byly zachovány dle návodu výrobce. Kontrola přepisu RNA do cDNA a také kontrola odstranění kontaminující DNA ze vzorků RNA byly prováděny pomocí PCR a následnou vizualizací produktů reakce na 3% w/v agarosovém gelu barveném bromidem ethidia.

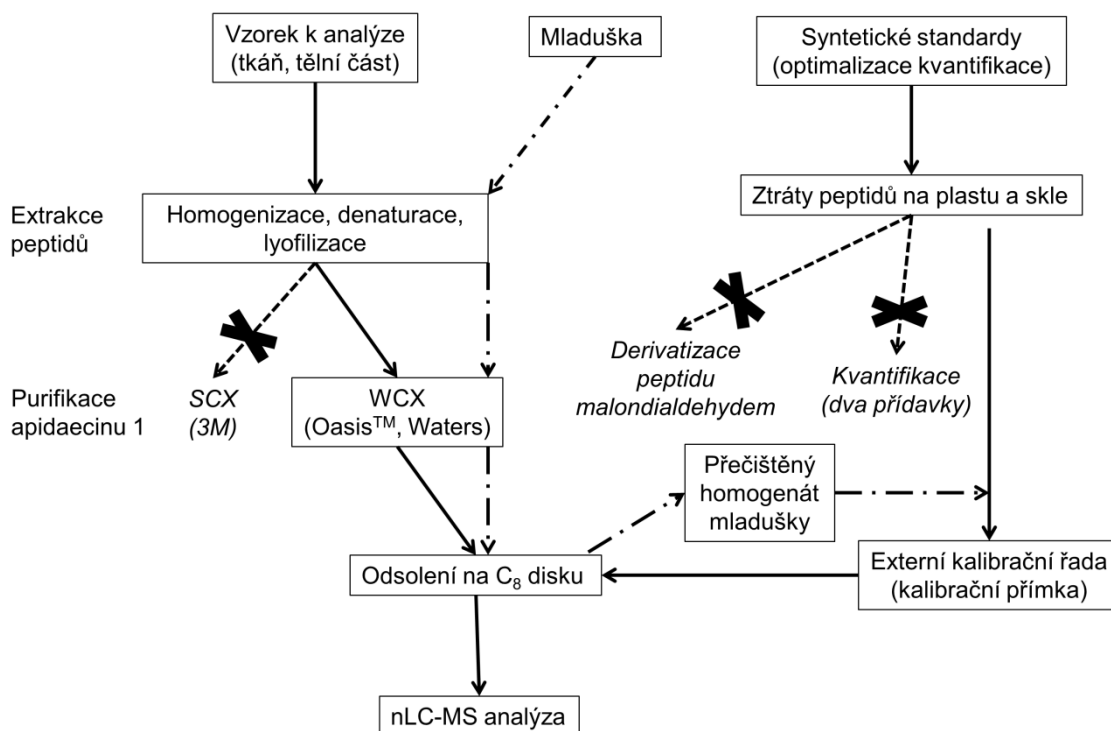
5.5.3 Kvantitativní PCR

Experimenty qPCR byly provedeny s kitem Syber Select Master Mix (Life Technologies) v reakčním objemu 5 μ l: 2,5 μ l 2x SyberSelect[®] Master Mix, 0,45 μ l 3,3 μ M kódující primer, 0,45 μ l 3,3 μ M antikódující primer, 1,6 μ l templátu. Pro qPCR měření byl využit přístroj CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). Nastavení reakce: 95 °C - 10 min, 40×[95 °C - 15 s, 60 °C - 60 s] disociační křivka 60 – 95 °C, 0,5°C - 10 s, 4 °C.

6 Výsledky

Vývoj metody kvantifikace peptidu isoformem apidaecinu 1 ve vzorcích ze včel byl doprovázen řadou komplikací. Těmi hlavními byly vysoké ztráty silně bazického peptidu na povrchu plastů nebo skla a dále pak zdoluhavý vývoj a optimalizace iontoměničové

chromatografie sloužící k purifikaci peptidu z extraktů tkání. Níže uvedený obrázek nastiňuje vývoj celé metody včetně zkoušených neúspěšných postupů, které nevedly ke kýženému výsledku.



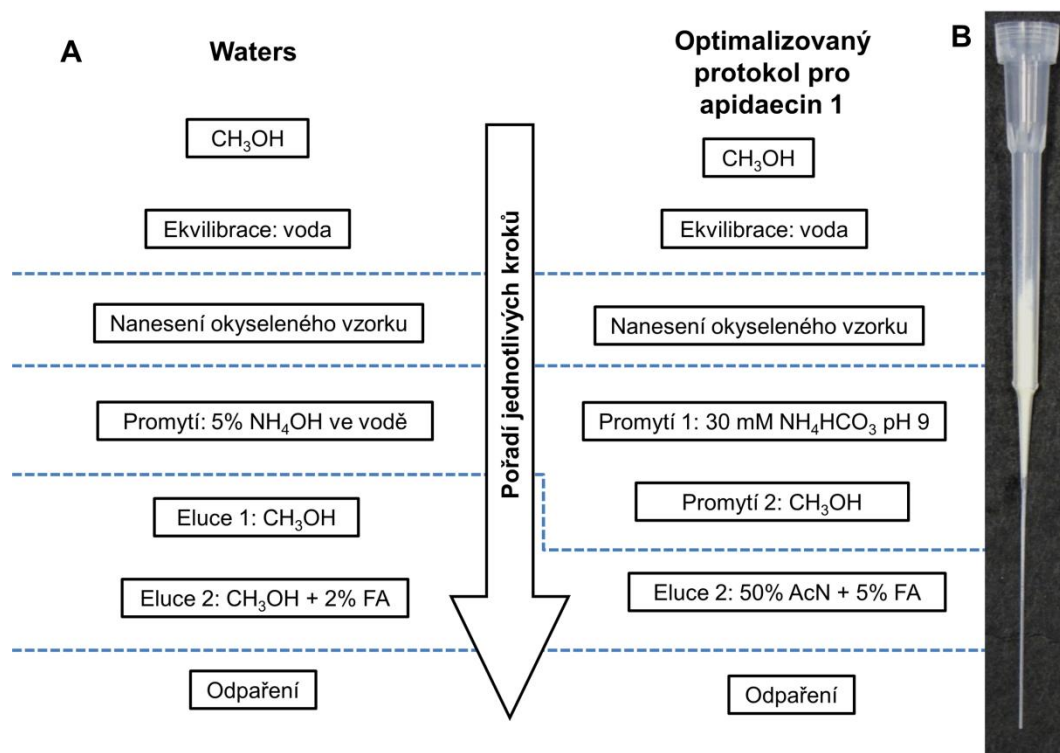
Obr. č. 2: Vývoj metody izolace a kvantifikace isoform apidaecinu 1 s uvedením různých přístupů vývoje metody.

6.1 Derivatizace apidaecinu 1A malondialdehydem

Postup zpracování vzorků včel a hemolymfy byl odvozen od původních prací (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990). Jelikož jde o silně bazický peptid, bylo snahou jeho bazicitu snížit chemickou derivatizací. Pro snížení bazicity byl zkoušen protokol pro derivatizaci s využitím malondialdehydu, který reaguje s postranními řetězci argininů za vzniku 2-pyrimidylargininu. Metoda derivatizace byla vyvíjena na standardu apidaecinu 1A. Při derivatizaci však vzniká více produktů reakce, které komplikují absolutní kvantifikaci. Cesta chemické modifikace peptidu vedoucí ke snížení bazicity a zlepšení jeho chromatografického chování byla opuštěna a vývoj metody směřoval k využití iontoměničové chromatografie.

6.2 Optimalizace chromatografické purifikace apidaecinu 1 z komplexní matrice vzorku

Následná strategie vývoje metody se obrátila k využití silně bazických vlastností peptidu. Nejprve byly testovány vhodné chromatografické sorbenty – anexy i katexy pro purifikaci silně bazických peptidů z komplexní matrice. Pro iontoměničovou purifikaci apidaecinu 1 byla nejprve optimalizována metoda s použitím částí SCX extrakčních disků (3M) plněných do 200 μ l špiček (Rappsilber *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že apidaecin 1 je silně bazický peptid, který se velmi obtížně uvolňuje ze silného katexu, byla následně testována možnost použití slabého katexu. Použitý sorbent WCX OasisTM (Waters) je částicovým sorbentem, jehož plnění je možné do SPE kolonek nebo 20 μ l GELoader špiček (Eppendorf). Použité složení roztoků pro purifikaci apidaecinu 1 vychází z postupu navrženého výrobcem (Waters, 2005).



Obr. č. 3: A: Porovnání doporučeného a optimalizovaného purifikačního postupu silně bazických látek na sorbentu WCX OasisTM; upraveno dle doporučeného postupu výrobce (Waters, (2005); B: GELoader špička plněná sorbentem WCX OasisTM.

6.3 Separace a kvantifikace isoform apidaecinu 1 metodou nLC-MS

V další fázi vývoje bylo přistoupeno k nanoprůtokové chromatografii na reverzní fázi pro dělení směsi peptidů a následné detekci a kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Výpočet koncentrace nebo množství peptidu využívá kalibrační přímky s lineární závislostí. Kalibrační řada byla připravena naředěním syntetického standardu apidaecinu 1A spolu s konstantním přídatkem izotopově značeného [$^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$]apidaecinu 1A, který sloužil jako interní standard (IS). Pro přípravu kalibrační řady syntetických peptidů není možné použít jednoduchého rozpuštění peptidů, protože během několika minut dochází k jejich ztrátě na stěně skla či plastu, což se projevuje zvláště u malých koncentrací (pod 1 pmol/30 μl rozpouštědla). Kalibrační řada se proto připravuje s použitím přečištěného homogenátu mladušky, čerstvě vylíhnuté včely, jako matrice pro přípravu vzorků. Tyto včely mají koncentraci isoform apidaecinu 1 pod limitem detekce, takže nehrozí zkreslení kalibrace. Tento postup zabráňuje ztrátám peptidů, proto umožňuje vytvoření kalibrační přímky. Během optimalizace výběru použitých koncentrací peptidu pro určení kalibrační závislosti bylo zjištěno, že závislost mezi koncentrací peptidu a měřenými signálem vykazuje lineární charakter v rozmezí od 0,1 do 5 pmol přidaných do kalibračního roztoku, nedochází ke ztrátám peptidů na stěnách zkumavek a intenzita signálu jednoho vzorku je stabilní po několik dní.

6.4 Validace metody

Návratnost metody purifikace byla hodnocena jednak na základě výpočtu poměru ploch signálů (píků) standardu přidaného před a po purifikaci, ale i s přepočtem návratnosti na známé množství přidaného interního standardu. Návratnost apidaecinu 1A vypočtená bez normalizace na IS se pohybovala od $40 \pm 3,9\%$ do $55 \pm 6,6\%$. Podobná návratnost byla získána i pro IS, která se pohybovala od $40 \pm 2,5\%$ do $48 \pm 4,6\%$. Návratnost normalizovaná na IS byla od $85 \pm 5,7\%$ do $100 \pm 7,1\%$.

Po optimalizaci přípravy kalibrační přímky a stanovení návratnosti celého postupu purifikace bylo testována správnost měřených koncentrací. Jelikož počet měření je menší než 20, byl pro výpočet intervalů spolehlivosti měření aplikován Hornův postup pivotů (Meloun & Militký, 2012). Uvedené množství syntetického standardu bylo přečištěno spolu s biologickou matricí (hemolymfa nebo homogenát mladušky) a následně přečištěno optimalizovaným protokolem. Testování správnosti stanovení standardu apidaecinu 1A bylo

provedeno intervalem spolehlivosti (Hornův postup pivotů). Intervaly spolehlivosti byly stanoveny pro množství 0,1 pmol, 0,2 pmol, 1,0 pmol, a 2,0 pmol, ve všech testovaných koncentracích bylo stanoveno správné množství ve vzorku.

Spodní limit kvantifikace (LLOQ) byl stanoven na 0,1 pmol dávající poměr signálu k šumu (S/N) v hodnotě 1604. Tato mez má ještě dostatečnou správnost stanovení, nižší hodnoty nevyhovují podmínce správnosti stanovení na hladině $\alpha = 0,05$.

Metoda zahrnující přípravu a zpracování vzorku, purifikaci isoform apidaecinu 1, detekci a kvantifikaci byla úspěšně vyvinuta a otestována. Metoda je vysoce citlivá, neboť umožňuje měřit hladiny isoform apidaecinu 1 v hemolymfě nebo hrudnicích jednotlivých dospělých včel. Isoformy apidaecinu 1A a 1B jsou isobarické, za daných chromatografických podmínek se však nepodařilo rozlišit zastoupení jednotlivých isoform 1A a 1B, protože se eluují ve stejném čase.

6.5 Kvantifikace relativní exprese genů pro apidaeciny a abaecin

Metoda měření exprese genů kódujících apidaeciny a abaecin byla zavedena pro rozšíření sledování změn parametrů imunitního systému včel. Exprese byla sledována v tělních částech - zadečcích včely.

Primery pro provozní geny („housekeeping genes“) byly navrženy dle literatury (Lourenço *et al.*, 2008). Jako provozní byly zvoleny geny pro aktin (AB023025) a EF-1 α (NM_001014993) (Lourenço *et al.*, 2008). Vhodnost použití těchto provozních genů byla ověřována aplikací BestKeeper určené pro Excel (Pfaffl *et al.*, 2004). Na základě porovnání hodnot C_q (hodnota, při níž dochází k nárůstu fluorescence nad práh šumu) provozních genů pro vzorky cDNA ze zpracovaných zadečků včel bylo zjištěno, že hodnoty C_q obou genů mezi sebou navzájem korelují (Pearsonův korelační koeficient) $R = 0,719$ ($p = 0,001$), regresní analýza použité aplikace ukazuje, že Pearsonův párový korelační koeficient $R = 0,92$ pro gen kódující EF-1 α a $R = 0,94$ pro gen kódující aktin. Oba geny jsou vhodnými provozními geny, neboť nedochází ke změně jejich exprese za různých podmínek a současně exprese obou genů vzájemně koreluje.

Primery pro peptid abaecin byly navrženy podle publikace Evans (2006) a primery pro gen *Apid14* dle publikace Simone *et al.* (2009). Primery navržené ve zmíněném článku jsou cíleny na gen *Apid14*, jsou však univerzální pro všechny tři varianty genů pro apidaeciny

Apid14, *Apid22*, *Apid73*. Při použití těchto primerů vzniká pouze jeden amplikon PCR, který reprezentuje sumární expresi všech tří genů apidaecinu.

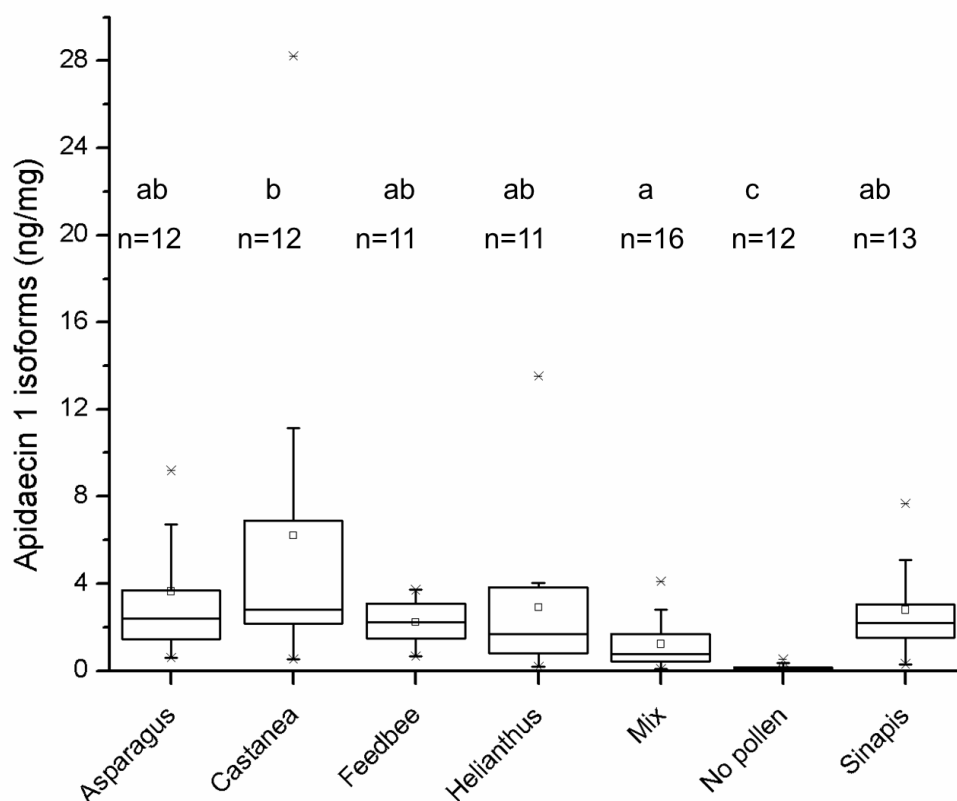
6.6 Aplikace optimalizovaných metod k analýze experimentálních vzorků včel

Dospělé včely medonosné kraňského plemene (*Apis mellifera carnica*) mladší než jeden den byly získány vylíhnutím plodu za laboratorních podmínek (Williams *et al.*, 2013). Následně byly včely rozděleny do skupin a umístěny do chovných klíček, kde jim byla podávána různá potrava, jejíž vliv byl sledován.

Včely v klíčkách byly krmeny potravou s rozdílným obsahem zdroje proteinů: 50% roztokem sacharosy (w/v), komerčním produktem Feedbee (pylová náhražka) nebo monoflorální rouskovými pyly, které obsahovaly 1) 94,8 % pylu *Helianthus spp.*; 2) 91,2 % pylu *Sinapis sp.*; 3) 70,6 % pylu *Asparagus sp.* nebo 4) 87,6 % pylu *Castanea sativa* (87,6%).

Hrudníky jednotlivých včel byly použity pro kvantifikaci apidaecinu 1 a zadečkové části včel byly zpracovány pro měření relativní exprese genů pro apidaeciny a abaecin. AmP jsou syntetizovány především v tukovém tělese včel, v menší míře pak v hemocytech a buňkách střeva. AmP jsou produkovány do hemolymfy, která koluje celým tělem včetně hrudníku (Vilmos & Kurucz, 1998). Tukové těleso i střevo se nachází právě v zadečku včel, proto byla pro měření exprese genů pro apidaeciny a abaecin vybrána právě zadečková část včel a hrudník pro stanovení koncentrace aktivních isoform apidaecinu 1.

Výsledky potvrzují vliv proteinové výživy na množství isoform apidaecinu 1 v hrudní tkáni včel. U včel krmených proteinovou výživou byla detekována vyšší hladina isoform ve srovnání se skupinou včel krmených pouze cukerným roztokem (Independent-Samples Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$); Obr. č. 4). Rozdíly v hladině isoform apidaecinu 1 byly zaznamenány i mezi jednotlivými skupinami včel krmenými různou proteinovou výživou. Skupina krmená pylem z rostlin *Castanea sativa* měla vyšší koncentraci peptidu než skupina krmená směsí pylů (medián: 31,7 ng/mg, respektive 33,8 ng/mg) (Independent-Samples Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$); Obr. č. 4).



Obr. č. 4: Koncentrace isoformů apidaecinu 1 v hrudnících včel. * značí odlehlé hodnoty.

Krmení včel různou proteinovou výživou, potažmo pylem, indukuje rozdílnou expresi genů pro apidaeciny a abaecin v tkáni zadečku dospělých včel. Zatímco exprese genu *Apid1* je v porovnání se včelami krmenými cukrem snižena jen u skupiny krmené směsí pylů, ostatní pokusné skupiny krmené jednodruhovým pylem nebo komerčním produktem FeedBee mají expresi genu zvýšenou. Rozdílné složení potravy u pokusných skupin ovlivnilo expresi genu druhého sledovaného peptidu abaecinu odlišně než u apidaecinů. Exprese genu abaecinu je zvýšená pouze u včel krmených pylem rostlin z rodu *Castanea* nebo *Asparagus*. Zjištěné výsledky indikují, že výživa výrazně ovlivňuje parametry humorálního imunitního systému na úrovni exprese genů i samotné množství efektorového AmP v tkáních.

7 Diskuse

Během doktorského studia se podařilo shrnout dosavadní poznatky o humorální imunitě včel, především o antimikrobiálních peptidech, jejich funkci a změnách v tvorbě při reakci na určitý podnět. Poznatky z původních prací byly publikovány v jednom zahraničním impaktovaném časopise a jednom českém recenzovaném. Aktuální poznatky o úloze AmP jsou tak přístupné vědecké komunitě i širší odborné veřejnosti.

Výrazná část doktorského studia byla věnována optimalizaci purifikace, detekce a kvantifikace antimikrobiálního peptidu apidaecinu 1. Během optimalizace bylo ověřováno několik strategií práce s tímto silně bazickým peptidem, výsledkem je publikovaná metoda kvantifikace apidaecinu 1 z hemolymfy nebo částí těl jednotlivých včel. Nově vyvinutá metoda umožní rozšířit studie imunitního systému včel o přímou kvantifikaci peptidu, který vykazuje antimikrobiální aktivitu. Díky této metodě bude možné doplnit poznatky z měření genové exprese AmP. Strategie aplikovaná pro vývoj metody kvantifikace apidaecinu 1 je následně dále využitelná pro vývoj metod stanovení dalších včelích antimikrobiálních peptidů. Nová metoda či její modifikace jsou využitelné nejen ve výzkumu imunity včel, podobnou strategii kvantifikace a kalibrace je potenciálně možné aplikovat při studiu jiných bazických peptidů.

Isoformy apidaecinu 1 byly kvantifikovány ve vzorcích včel krmených různou výživou, současně byla sledována exprese genů kódujících apidaeciny i další významný antimikrobiální peptid abaecin. Z hlediska stanovení koncentrace apidaecinu 1 v tkáni včel jde o první známé výsledky, protože dosud se žádná jiná publikovaná práce nezabývala stanovením apidaecinů v jednotlivých včelách nebo studiem změn v jeho obsahu. Výsledky tedy poukazují na potřebu zaměřit se při studiu vlivů na včelí imunitní systém nejen sledováním exprese genů různých parametrů imunitní odpovědi, ale i kvantifikací samotných efektorových molekul, v tomto případě antimikrobiálních peptidů.

8 Závěr

AmP jsou důležitou složkou humorální imunitního systému včel. Mohou být zkoumány na úrovni exprese jejich genů nebo přímo na úrovni hladiny samotných peptidů v tkáních včel. Porozumění vlivu různých faktorů (výživa, stres, patogeny) na humorální imunitní systém pomůže porozumět ztrátám včelstev i omezení vlivu rizikových faktorů, které může člověk svou činností ovlivnit, např. používání agrochemikálií.

Literární rešerše o imunitě včel, antimikrobiálních peptidech a významu výzkumu včelí imunity do včelařské praxe byla zpracována do dvou přehledných článků. Článek s názvem „Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity“ byl přijat k publikování v časopise *Journal of Apicultural Research*, druhý článek určený odborné veterinární a včelařské veřejnosti byl publikován v českém recenzovaném časopise *Veterinářství* s názvem „Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel“.

Tato práce se zaměřuje na kvantifikaci množství antimikrobiálního peptidu apidaecinu 1 ve tkáních včel. Práci s tímto peptidem je silně komplikována jeho vysokou bazicitou a rychlými ztrátami na povrchu laboratorního skla a plastů. Protokol pro kvantifikaci apidaecinu 1 kombinuje iontoměničovou chromatografii pro purifikaci z tkání, s nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Metoda byla publikována v časopisu *Journal of Chromatography A* v článku s názvem „A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry.“

Pro studium relativních změn exprese genů pro apidaeciny a abaecin byla zavedena metoda kvantitativní polymerasové řetězové reakce (qPCR). Metoda zahrnuje izolaci celkové RNA z tkání včel (zadečků), přepis do cDNA a samotnou qPCR reakci pro stanovení relativní exprese. Primery použité pro reakci byly převzaty z literatury. Primery pro provozní geny (*Arp1*, *EFla-F2*) byly validovány a použity pro stanovení relativní exprese genů pro apidaeciny a abaecin.

Výživa včel je jeden z významných faktorů, který může ovlivnit imunokompetenci jednotlivých včel. Zavedené metody kvantifikace hladiny isoform apidaecinu 1 a exprese genů pro apidaeciny a abaecin byly využity pro studium vlivu složení potravy na tyto faktory humorálního imunitního systému. Proteinová výživa je nutná pro vývoj hrudníku i pro produkci isoform apidaecinu 1. Krmení včel různou proteinovou výživou, potažmo pylem, však indukuje i rozdílnou expresi genů pro apidaeciny i abaecin v zadečku dospělých včel. Výsledky této studie jsou prezentovány v připravovaném rukopisu odborného článku s názvem: „Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in honey bee body parts?“

9 Seznam zkratk

AmP – antimikrobiální peptid(y)

Cq – hodnota počtu cyklů, při níž došlo k rozlišení fluorescence od šumu při qPCR

CI – konfidenční interval

bp – „base pair“, páry bází

EDTA – kyselina ethyldiamintetraoctová

FA – kyselina mravenčí

G⁻ Gram-negativní

G⁺ - Gram-pozitivní

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHCA - α -kyano-4-hydroxy-skořicová kyselina

IEC – iontoměničová chromatografie

IS – interní standard

LLOQ – spodní limit kvantifikace

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time-of-Flight, Laserová desorpční ionizace s pomocí matrice – letová hmotnostní spektrometrie

MS – hmotnostní spektrometrie

PCR polymerasová řetězová reakce

pI – isoelektrický bod

qPCR – kvantitativní polymerasová řetězová reakce

R – Pearsonův korelační koeficient

RP-LC – chromatografie na reverzní fázi

S/N - poměr signálu vůči šumu

SCX – silný kationtoměnič

SPE – extrakce na pevné fázi

TFA – trifluoroctová kyselina

Tris - 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

UHR-QTOF – ultravysokorozlišovací kvadrupólový analyzátor doby letu

UV-Vis – ultrafialová – viditelná

WCX – slabý kationtoměnič

11 Seznam literatury

Audsley N., Weaver R.J. (2006) Analysis of Peptides in the Brain and Corpora Cardiac–Corpora Allata of the Honey Bee, *Apis Mellifera* Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Peptides* **27**: 512-520

Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1993) Apidaecin Multipeptide Precursor Structure - a Putative Mechanism for Amplification of the Insect Antibacterial Response. *EMBO Journal* **12**: 1569-1578

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

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989) Apidaecins: Antibacterial Peptides from Honeybees. *EMBO Journal* **8**: 2387-2391

Casteels P., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., 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

Cremer S., Armitage S.A.O., Schmid-Hempel P. (2007) Social Immunity. *Current Biology* **17**: R693-R702

Danihlík J., Šebela M., Petřivalský M., Lenobel R. (2014) A Sensitive Quantification of the Peptide Apidaecin 1 Isoforms in Single Bee Tissues Using a Weak Cation Exchange Pre-Separation and Nanocapillary Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1374**: 134-144

Evans J. (2006) Beepth: An Ordered Quantitative-Pcr Array for Exploring Honey Bee Immunity and Disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**: 135 - 139

Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006) Immune Pathways and Defence Mechanisms in Honey Bees *Apis Mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**: 645-656

Evans J.D., Schwarz R.S., Chen Y.P., Budge G., Cornman R.S., De la Rua P., de Miranda J.R., Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun C.M., Moritz R.F.A., Maleszka R., Munoz I., Pinto M.A. (2013) Standard Methods for Molecular Research in *Apis Mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**

Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990) A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly. Purification and Determination of the Primary Structure of Royalisin. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 11333-11337

Hancock R.E.W., Chapple D.S. (1999) Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1317-1323

Chaimanee V., Chantawannakul P., Chen Y., Evans J.D., Pettis J.S. (2012) Differential Expression of Immune Genes of Adult Honey Bee (*Apis Mellifera*) after Inoculated by *Nosema Ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **58**: 1090-1095

Jefferson J.M., Dolstad H.A., Sivalingam M.D., Snow J.W. (2013) Barrier Immune Effectors Are Maintained During Transition from Nurse to Forager in the Honey Bee. *Plos one* **8**: e54097

Kataoka H. (2003) New Trends in Sample Preparation for Clinical and Pharmaceutical Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**: 232-244

Klaudiny J., Albert T., Bachanova K., Kopernick J., 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

Kreil G., Haiml L., Suchanek G. (1980) Stepwise Cleavage of the Pro Part of Promelittin by Dipeptidylpeptidase IV. *European Journal of Biochemistry* **111**: 49-58

Lourenço A., Pedro, Mackert A., dos Santos Cristino A., Simões Z., Luz Paulino (2008) Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in the Honey Bee, *Apis Mellifera*, by Quantitative Real-Time Rt-Pcr. *Apidologie* **39**: 372-385

Meloun M., Militký J. (2012) Statistická Analýza Jednorozměrných Dat. In *Interaktivní Statistická Analýza Dat*, Milan M. (ed), 3 edn, 3, pp 149-239. Praha: Karolinum

Otvos L., O I., Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M. (2000) Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* **39**: 14150-14159

Pfaffl M., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. (2004) Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: Bestkeeper – Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations. *Biotechnology Letters* **26**: 509-515

Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for Micro-Purification, Enrichment, Pre-Fractionation and Storage of Peptides for Proteomics Using Stagetips. *Nature Protocols* **2**: 1896-1906

Siede R., Meixner M.D., Büchler R. (2012) Comparison of Transcriptional Changes of Immune Genes to Experimental Challenge in the Honey Bee (*Apis Mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **51**: 320-328

Simone M., Evans J.D., Spivak M. (2009) Resin Collection and Social Immunity in Honey Bees. *Evolution* **63**: 3016-3022

Vilmos P., Kurucz É. (1998) Insect Immunity: Evolutionary Roots of the Mammalian Innate Immune System. *Immunology letters* **62**: 59-66

Waters. (2005) New Oasis WCX Spe Products for Strongly Basic Compounds. 720001060EN.

Williams G.R., Alaux C., Costa C., Csaki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fries I., Kuhn R., McMahon D.P., Medrzycki P., Murray T.E., Natsopoulou M.E., Neumann P., Oliver R., Paxton R.J., Pernal S.F., Shutler D., Tanner G., van der Steen J.J.M., Brodschneider R. (2013) Standard Methods for Maintaining Adult *Apis Mellifera* in Cages under in Vitro Laboratory Conditions. *Journal of Apicultural Research* **52**

Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H., Starks P.T. (2009) Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **54**: 405-423

12 Životopis

Jméno a příjmení: **Mgr. Jiří Danihlík**

Mateřský jazyk: český

Mobil: +420 724 758 774

Telefon: +420 585 63 4931

E-mail: jiri.danahlik@upol.cz; j.danahlik@gmail.com

Státní příslušnost: ČR

12.1 Vzdělání

2000 – 2006 Gymnázium Františka Palackého ve Valašském Meziříčí

2006 - 2009 Bakalářské studium oboru Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, školitel: doc. Marek Petřivalský

2009 – 2011 Navazující magisterské studium oboru Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, školitel: doc. Marek Petřivalský

od roku 2011 Doktorské studium oboru Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, školitel: prof. Marek Šebela

Název bakalářské práce: Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel (2009)

Název diplomové práce: Analýza parametrů humorální imunity včel (2011)

12.2 Zahraniční stáže

- 1) 2012 únor - březen (4 týdny) stáž na Sveriges Lantbruksuniversitet v Uppsale, pracoviště Dr. Joachima de Mirandy – PCR metody detekce včelích viróz
- 2) 2013 únor – duben (8 týdnů) stáž na Lund Univesity, Medical Microbiology, pracoviště Dr. Alejandry Vásquez – purifikace antimikrobiálních peptidů produkovaných symbiotickými laktobacily včel
- 3) 2015 srpen (2 týdny) stáž na University of Graz, Institute of Zoology, Rakousko vztah výživy a imunokompetence včel, hodnocení ztrát včelstev

13 Seznam publikací a odborných konferencí

13.1 Články v impaktovaných časopisech

- Danihlík, J., Aronstein, K. & Petřivalský, M. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. Journal of Apicultural Research, *v tisku*.

- Danihlík, J., Šebela, M., Petřivalský, M. & Lenobel, R. (2014) A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*; 1374(0): 134-144.

13.2 Článek v recenzovaném časopise

- Danihlík, J., Petřivalský, M. (2015) Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel, *Veterinářství*; 6

13.3 Článek v přípravě

- Danihlík, J., Šmehilová M., Lenobel R., Šebela M., Omar, E., Petřivalský M., Crailsheim K., Brodschneider R: *pracovní název*: Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in honey bee body parts?

13.4 Příspěvky na konferencích

13.4.1 Přednášky

- Včelařský výzkum v době Mendela a dnes, Brno říjen 2011, Mendelova společnost pro včelařský výzkum, Imunita včel, přednáška
- Věda a výzkum včelařské praxe, Olomouc, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Mendelova společnost pro včelařský výzkum, říjen 2012, Zprávy z konference v Halle, přednáška
- Neformální proteomické setkání (2nd Informal Proteomic Meeting), 30th November – 1st December 2012, Olomouc, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. Book of Abstracts, p. 2; přednáška
- Tradiční VI. setkání uživatelů a příznivců VMS, Brno, leden 2015, Pracovní společnost nástavkových včelařů, Vyhodnocení prvního ročníku monitoringu ztrát včelstev, přednáška
- University of Graz, Institute of Zoology, Rakousko, květen 2015, Honey Bee Immunity: A Trendy Science, přednáška
- 16. Škola hmotnostní spektrometrie aneb Naše spektrometrie, Frymburk, září 2015, Citlivá kvantifikace isoformů apidaecinu pomocí nanoLC-MS, přednáška

13.4.2 Plakátová sdělení

- Danihlík J., Šebela M., Lenobel L., Petřivalský M. (2010) Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel, XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno; poster
- Danihlík J., Šebela M., Lenobel L., Petřivalský M. (2011) Analýza parametrů humorální imunity včel, XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno; poster
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2012) Analysis of bee antimicrobial peptides by mass spectrometry methods. 23rd Joint Congress of the Czech and Slovak Societies for Biochemistry and Molecular Biology, Masaryk University, Brno; poster
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2012) Analysis of bee antimicrobial peptides by mass spectrometry methods, Eurbee, Halle an der Saale, Německo; poster
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2013) Detection of Bee Antimicrobial Peptides by Mass Spectrometry Method, Apimodia, Kyjev, Ukrajina; poster
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2014) Quantification of Peptide Apidaecin in Honey Bee Bodies or Tissues, Eurbee, Murcia, Španělsko; poster
- Brodschneider R., Danihlík J., Klíma Z., Tichý Z., Kobza R., Crailsheim K. (2014) Comparison of apiculture and winter losses of honey bee colonies in Austria and Czech Republic, Eurbee, Murcia, Španělsko; poster
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2015) Detekce a kvantifikace isoform silně bazického antimikrobiálního peptidu apidaecinu 1 a jeho fyziologický význam v humorální imunitě včel, XV. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a biologů, Milovy, abstrakt: Czech Chemical Symposium Series 13(1), p. 8
- Danihlík J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2015) Purification and quantification of basic antimicrobial peptide apidaecin in honey bee bodies or tissues, Plant for Biotech, Olomouc, poster

- Brodschneider R., Danihlík J., Kobza R., Crailsheim K. (2015) Winter losses of honey bee colonies and renewal of livestock in Austria and the Czech Republic, COLOSS conference, Ljubljana, Slovinsko, poster
- Dostálková S., Danihlík J., Bzdil J., Petřivalský M. (2015) Jelleines – a group of peptides with antimicrobial functions with potential anti-American foulbrood properties, COLOSS conference, Ljubljana, Slovinsko, poster

13.5 Ocenění

- Cena ředitele Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za vědeckou publikaci (2014)
- Cena ředitele Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za získání vědeckého projektu (2014)

13.6 Seznam ostatních, neimpaktovaných článků

- Danihlík J. (2008) Imunita včel, Moderní včelař 3, 17-19
- Danihlík J. (2008) Kyselina mravenčí a šťavelová v chovu včel, Moderní včelař 6, 27-28
- Vondráčková H., Danihlík J. (2010) První krok k očkování včel pro roztoči *Varroa destructor*, Moderní včelař 2, 41-42
- Danihlík J., Pavelová J. (2010) Včela a kleštík, Moderní včelař 3, 105 – 107 překlad původního článku: Dettli M. (2009) Bienen und Milben – eine höchst komplexe Beziehung, Schweizerische Bienen-Zeitung 12, 26-30
- Danihlík J., Čermák K. (2010) Objevena příčina CCD? Moderní včelař 6, 190
- Danihlík J. (2011) Antimikrobiální peptidy, Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Bulletin 2
- Danihlík J. (2011) Imunita včel, Moderní včelař 5, příloha - sborník z I. konference Mendelovy společnosti pro včelařský výzkum
- Danihlík J. (2012) Jak se včely a včelstvo brání onemocnění morem včelího plodu? Moderní včelař 2, 55-56
- Danihlík J. (2012) S prof. Ingemarem Friesem o moru včelího plodu, Moderní včelař 4, 119-120
- Danihlík J. (2012) Konference EurBee, Moderní včelař 5

- Danihlík J. (2012) RNAi – Nová strategie léčby včelích viróz, Moderní včelař 6; 205-207
- Danihlík J. (2013) Rozhovor a Alejandrou Vásquez o objevu a významu symbiotických mikroorganismů včel, Moderní včelař 2; 20-25
- Danihlík J. (2013) Varroóza, varroatolerance a šlechtění včelstev, Moderní včelař 3; 18-21
- Danihlík J., Kobza R., Klíma Z. (2014) COLOSS: Vyhodnocení prvního českého monitoringu zimních ztrát včelstev, Moderní včelař 6; 8-13
- Danihlík J. (2015) Cesta na sever aneb vědecká konference včelařů ze Skandinávie a Pobaltí. Moderní včelař 2; 24-25
- Danihlík J. (2015) COLOSS: ze zákulisí přípravy dotazníku. Moderní včelař 2; 26-27