

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vývoj metody pro purifikaci a kvantifikaci silně bazického  
peptidu apidaecinu

Analýza hladiny včelích antimikrobiálních peptidů a jejich biologických  
souvislostí

Disertační práce

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.
Termín odevzdání práce:	

Abys dosáhl toho, co nevíš,  
musíš projít tím, kde nyní nevíš nic.

*sv. JAN OD KŘÍŽE, Výstup na horu Karmel I,13,11*

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

V Olomouci dne

## Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. Markovi Šebelovi za odborné vedení během mého doktorského studia, za konzultace laboratorní činnosti i diskuse při sepisování této práce a v neposlední řadě i za možnost působit na pracovišti Oddělení biochemie proteinů a proteomiky CRH. Poděkování rovněž patří konzultantovi mé disertační práce Dr. Renému Lenobelovi za pomoc při vývoji chromatografických metod a hmotnostně spektromerické detekci a kvantifikaci sledovaných peptidů. Chtěl bych poděkovat svému konzultantovi doc. Markovi Petřivalskému, že mi již v bakalářském studiu umožnil věnovat se výzkumu imunity včel, že mi od té doby poskytl mnoho rad, předal nemálo svých zkušeností a kdykoliv mi byl ochoten pomoci nebo poradit v problémech týkajících se nejen výzkumu, ale i vedení studentů, přípravě přednášek, psaní projektů a mnoha dalších. Dr. Márii Šmehilové děkuji za pomoc při optimalizaci molekulárně-biologických metod.

Doc. Lence Luhové děkuji za podporu mé činnosti a také za možnosti, které mi Katedra biochemie PřF poskytuje, ale i za možnost strávit své dvě zahraniční stáže ve Švédsku. Děkuji doc. Joachimovi de Mirandovi z Uppsaly a Dr. Alejandře Vásquez z Lundu za čas, který mi věnovali při práci na jejich pracovištích. Děkuji také Dr. Robertovi Brodschneiderovi ze Štýrského Hradce za spolupráci v oblasti výzkumu zdraví a fyziologie včel.

Poděkování patří i celému kolektivu Katedry biochemie PřF UP v Olomouci a Oddělení biochemie proteinů a proteomiky CRH za příjemné pracovní prostředí během mého studia. Děkuji také sekretářce Janě Petřivalské Vaculové za ochotu s čímkoliv a kdykoliv pomoci.

Poděkovat bych chtěl i své studentce Bc. Silvii Dostálkové za spolupráci při studiu imunitního systému včel.

Velký dík patří mé rodině za všestrannou lásku, kterou mě obdarovává. Děkuji i svým mnoha přátelům za pochopení a povzbuzování.

Děkuji i včelařům, že inspirují a stimulují k další práci.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Mgr. Jiří Danihlík
Název práce	Vývoj metody pro purifikaci a kvantifikaci silně bazického peptidu apidaecinu. Analýza hladiny včelích antimikrobiálních peptidů a jejich biologických souvislostí.
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum; Katedra biochemie PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>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 (<i>Apis mellifera</i>) pak i sociální imunita.</p> <p>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 produkované právě do hemolymfy.</p> <p>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.</p> <p>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</p>

apidaecinu 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 C<sub>8</sub>. Purifikovaná frakce isoformem apidaecinu 1 je dělena nanoprůtokovou kapalinovou chromatografií na koloně s reverzní fází (C<sub>4</sub>) 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 [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>] 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 apidaecinu a abaecinu.

Zavedené metody kvantifikace hladiny isoformem 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 isoformem apidaecinu 1. Medián koncentrace isoformem 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 apidaecinu i abaecinu v tkáni zadečku dospělých včel, kde se nacházejí buňky tukových těles.

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

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, včela medonosná, vrozená imunita, apidaecin, abaecin, výživa včel
Počet stran	102
Počet příloh	7
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's name surname	first and Jiří Danihlák
Title	Development of purification and quantification method for strong basic peptide apidaecin. Analysis of the level of antimicrobial peptides and their biological significance
Type of thesis	Doctoral
Department	Department of Proten Biochemistry and Proteomics, Department of Biochemistry, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Prof. Marek Šebela
Consultants	Dr. René Lenobel, Dr. Marek Petřivalský
The year of presentation	2015
Abstract	<p>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.</p> <p>Antimicrobial peptides are important part of humoral immunity, because they are able to supress 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.</p> <p>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 ballast proteins present in the homogenate. The purification of apidaecin is based on ion-exchange chromatography on weak cation exchanger in lab-made</p>

columns from GELoader tips filled with a chromatographic sorbent. The enriched apidaecin 1 isoforms fraction is purified and desalted on C<sub>8</sub> Stage Tips. The purified fraction is separated by a nanoliquid chromatography on C<sub>4</sub> 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 [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>] 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.

Keywords	Antimicrobial peptides, honey bee, innate immunity, apidaecin, abaecin, honey bee nutrition
Number of pages	102
Number of appendices	7
Language	Czech



## **OBSAH**

<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>11</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Úvod do problematiky .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Imunita včel .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Sociální imunita .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Individuální imunita .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Fyzikální bariéry a buněčná imunita.....	16
1.4.2 Humorální imunita.....	16
<b>1.5 Antimikrobiální peptidy .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Rozdělení antimikrobiálních peptidů.....</b>	<b>18</b>
1.6.1 Kationtové antimikrobiální peptidy .....	19
1.6.2 Aniontové antimikrobiální peptidy .....	20
1.6.3 Aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vážící kyslík .....	20
<b>1.7 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů .....</b>	<b>20</b>
<b>1.8 Antimikrobiální peptidy včel.....</b>	<b>23</b>
1.8.1 Apidaeciny .....	24
<b>1.9 Význam studia antimikrobiálních peptidů .....</b>	<b>26</b>
<b>1.10 Metody analýzy biologicky aktivních peptidů .....</b>	<b>27</b>
<b>1.11 Příprava vzorku pro purifikaci peptidů .....</b>	<b>28</b>
<b>1.12 Extrakce na pevné fázi.....</b>	<b>28</b>
<b>1.13 Chromatografické techniky pro purifikaci antimikrobiálních peptidů .....</b>	<b>29</b>
<b>1.14 Využití iontoměničové chromatografie .....</b>	<b>30</b>
1.14.1 Iontoměničová chromatografie na anexech .....	30
1.14.2 Iontoměničová chromatografie na katexech .....	30
1.14.3 Chromatografie na reverzní fázi .....	32
<b>1.15 Využití hmotnostní spektrometrie pro kvantifikaci peptidů.....</b>	<b>32</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>3 METODY.....</b>	<b>35</b>

<b>3.1</b>	<b>Syntetické standardy peptidů.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Zpracování vzorků včel .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Chromatografická předseparace vzorku s využitím sorbentu WCX Oasis <sup>TM</sup> .....	36
<b>3.3</b>	<b>Odsolení vzorku na C<sub>8</sub> Stage Tip .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Nanoprůtoková kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (nLC-MS).....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>OPTIMALIZACE MĚŘENÍ EXPRESE GENŮ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ .....</b>	<b>37</b>
4.1	Izolace a přečištění RNA .....	37
4.2	Reverzně transkriptasová reakce přepisu RNA do cDNA .....	38
4.3	Kvantitativní PCR .....	39
4.4	Software použitý pro vyhodnocení dat .....	40
4.5	Statistické vyhodnocení dat .....	40
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>41</b>
5.1	Stabilita syntetického standardu peptidu v roztoku .....	41
5.2	Optimalizace chromatografické purifikace apidaecinu 1 z komplexní matrice vzorku.....	44
5.2.1	Použití chromatografického sorbentu WCX Oasis <sup>TM</sup> pro purifikaci apidaecinu .....	44
5.3	Kvantifikace hladiny peptidu metodou nLC-MS .....	47
5.3.1	Stanovení kapacity sorbentu pro analýzu isoform apidaecinu 1 .....	47
5.3.2	Kvantifikace isoform apidaecinu 1 metodou dvou standardních přídavek .....	48
5.3.3	Kvantifikace isoform apidaecinu 1 metodou kalibrační přímky .....	49
5.4	Hodnocení návratnosti metody purifikace.....	50
5.4.1	Validace metody .....	52

<b>6</b>	<b>OPTIMALIZACE MĚŘENÍ EXPRESE GENŮ PEPTIDŮ ABAECINU A ISOFOREM APIDAECINU .....</b>	<b>54</b>
6.1.1	Validace primerů pro provozní geny .....	55
6.1.2	Testování primerů pro sledované geny abaecinu a isoformy apidaecinu .	56
<b>7</b>	<b>APLIKACE OPTIMALIZOVANÝCH METOD K ANALÝZE EXPERIMENTÁLNÍCH VZORKŮ VČEL .....</b>	<b>59</b>
7.1	Výsledky sledování obsahu isoform apidaecinu 1 v tkáních včel a relativní kvantifikace exprese genů pro apidaeciny a abaecin .....	60
7.2	Závěr .....	62
<b>8</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>64</b>
8.1	Vzdělání.....	64
8.2	Zahraniční stáže.....	64
8.3	Pracovní zkušenosti .....	65
8.4	Projekty .....	65
8.5	Pedagogická činnost.....	65
8.6	Členství v organizacích a spolcích.....	66
8.7	Příspěvky na konferencích .....	66
8.7.1	Přednášky .....	66
8.7.2	Plakátová sdělení .....	66
8.8	Ocenění.....	68
8.9	Seznam ostatních, neimpaktovaných článků .....	68
<b>9</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>72</b>

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Daníhlík 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

Příloha 2: Derivatizace apidaecinu 1A malondialdehydem

Příloha 3: Chromatografická předseparace vzorku metodou StageTip s využitím SCX disků

Příloha 4: Sekvence primerů navržených k rozlišení peptidových preproteinů apidaecinu

Příloha 5: Daníhlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (*in press*) Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*

Příloha 6: Daníhlík J., Petřivalský M. (2015) Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* 65: 434-431

Příloha 7: Does the pollen diet influence the expression and production of antimicrobial peptides in honey bee body parts? (manuskript článku)

# 1 Úvod

## 1.1 Úvod do problematiky

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi eusociální hmyz, žije ve společenstvích čítajících v letním období až několik desítek tisíc jedinců (~ 50 tisíc). Početnost populace včel v hnízdě se mění v závislosti na ročním období, v zimě tvoří včelstvo pouze 15 – 20 tisíc včel. Včelstvo je dynamický organismus, jehož síla a vitalita se může během roku významně měnit. V každém včelstvu se nachází jedna matka, která jako jediná ve včelstvu klade vajíčka. Řádově stovky trubců se ve včelstvu nacházejí od jara do podzimu, jejich hlavní funkcí je oplodnit mladé matky, vylíhnuté v dané sezóně. K dalším jejich činnostem patří i zahřívání plodu v době, kdy se většina dělnic věnuje sběru vody, pylu, nektaru, medovice i propolisu.

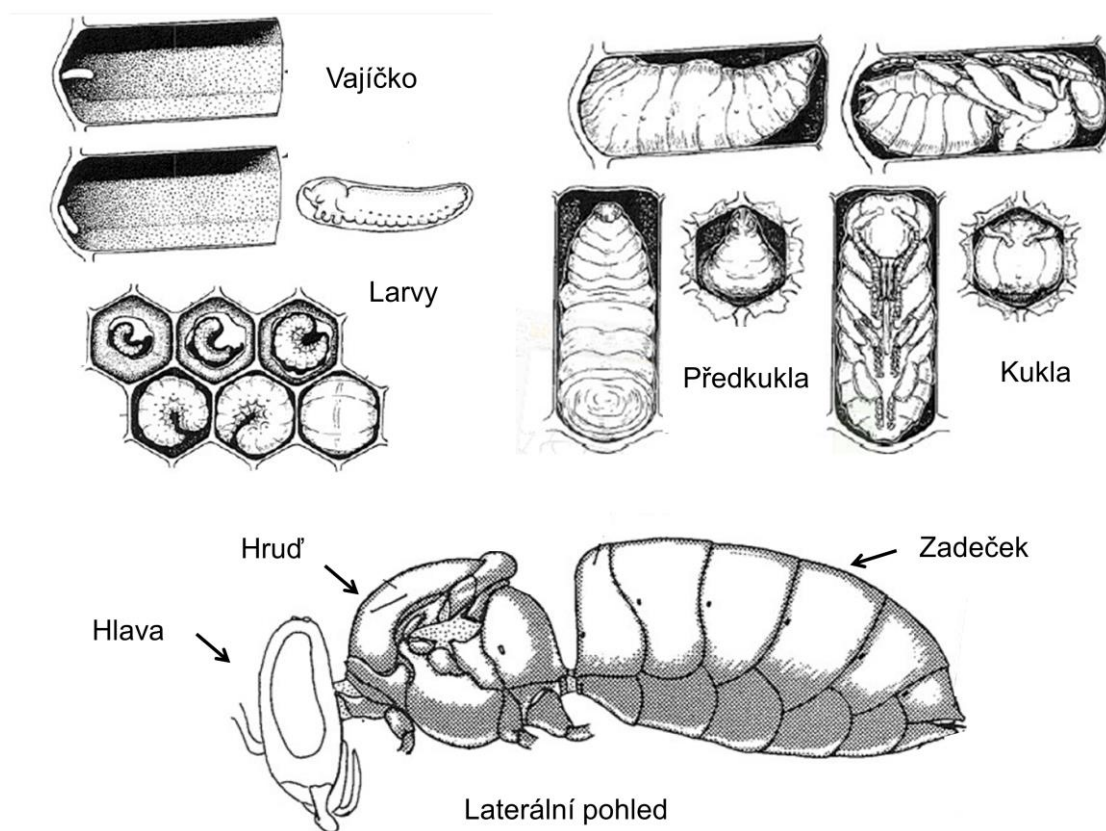
Rod včel je celosvětově rozšířený, v Evropě, Americe i Africe se vykytuje včela medonosná (*Apis mellifera*), v Asii pak včela východní (*Apis cerana*). Včela medonosná není pro člověka důležitá jen kvůli produkci včelích produktů, jako je obecně známý med či propolis, vosk, jed nebo mateří kašička. Opylovací činnost, kterou včely přirozeně provádějí, je nezbytná pro zajištění dobré hospodářské výnosnosti mnoha kulturních plodin, současně je opylování neméně důležité pro hmyzosnubné rostliny nacházejícími se volně v přírodě. Více než třetina vyprodukovaných potravin je přímo nebo nepřímo závislá na dostatečném opylení (Klein *et al.*, 2007). Odhaduje se, že celosvětový přínos hmyzích opylovatelů je kolem 215 miliard USD (Gallai *et al.*, 2009).

Včela medonosná je velmi cenný opylovatel, kterého lze navíc vcelku snadno chovat a přisouvat k plodinám, u nichž je opylení žádoucí. Bohužel počty včelstev hlavně v euroamerickém prostoru klesají. Ztráty včelstev jsou zaznamenávány jak v Evropě, kde za posledních 30 let klesly počty včelstev o přibližně 25 %, tak i v Severní Americe, kde se stavy včelstev dokonce snížily od roku 1947 o 59 %. Na druhou stranu v Číně a Argentině narostly počty včelstev v posledních 50 letech o 45 % (Goulson *et al.*, 2015).

Problematika úhynů včelstev je intenzivně sledována a zkoumána. Od roku 2007 mezinárodní asociace COLOSS systematicky monitoruje ztráty včelstev v několika evropských i mimoevropských zemích (van der Zee *et al.*, 2012; van der Zee *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014), od roku 2014 probíhá monitoring i v ČR. Ukazuje se, že na zdraví včelstev nepůsobí pouze jeden faktor, ale jde o kombinaci mnoha stresových faktorů, například kombinace parazitózy, virózy a špatné výživy.

Pro zajištění vitality a kondice včelstev je bezesporu nutný jejich vlastní imunitní systém. Imunita včel se dostává do popředí zájmu vědců, neboť její popis a pochopení funkcí jednotlivých složek v imunitním systému nám může pomoci lépe porozumět vztahům parazit – hostitel, ale také usnadnit odhalení skrytých rizik v chemických látkách používaných v zemědělství.

Včela během svého vývoje prochází metamorfózou, kdy se z vajíčka vylíhne larva, ta se následně zakuklí, až nakonec vznikne dospělec. Larvy jsou během svého vývoje krmeny dospělými včelami, které zajišťují chod včelstva jakožto společenství. Potrava včel sestává hlavně z medu, který je zdrojem cukrů a pylu jakožto zdroje proteinů a tuků.



Obr. č. 1: Vývojová stádia včel a laterální pohled na dospělé s vyznačením hlavních tělních částí. Schéma upraveno dle Carreck *et al.* (2013).

## 1.2 Imunita včel

Imunitní systém hmyzu je jednodušší než imunitní systém obratlovců. Obratlovci využívají ke svému přežití vrozený i získaný imunitní systém, hmyz si však vystačí jen s vrozenou imunitou, přesto je hmyzí imunitní systém účinný a efektivní. Imunitní

reakce hmyzu jsou založeny na nespecifické reakci vůči patogenům. Imunita jedince má tři úrovně: 1) fyzikální bariéry, 2) buněčná imunita, 3) humorální imunita. Včely si navíc vyvinuly sociální úroveň imunity.

Včely jsou ohrožovány mnoha mikroorganismy, z nichž některé mohou být pro včely patogenní. Velmi nebezpečné jsou bakterie způsobující mor a hnilobu včelího plodu (*Paenibacillus larvae*, *Mellisoccocus plutonius*, *Paenibacillus alvei*), ve včelstvech se také často vyskytují původci houbových onemocnění jako je *Ascosphaera apis* nebo *Nosema spp.* Kromě toho bylo popsáno mnoho viróz, které například ve spojení s roztočem kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) mohou způsobit nemalé škody (Přidal & Čermák, 2005; Chen & Siede, 2007). Včely se pohybují po úlu, kde je vysoká koncentrace jedinců na malém prostoru. V úlu je relativně vysoká vlhkost a teplota kolem 35 °C, což napomáhá rozvoji mikrobiálních chorob a výskytu plísní. Dospělé včely jsou navíc v kontaktu s vnějším prostředím, protože se věnují sběru potravy, vody i propolisu. Včely si proto vyvinuly několik úrovní imunitního systému, který chrání jak jednotlivé včely (individuální imunita), tak i celá včelstva (sociální imunita) (Wilson-Rich *et al.*, 2009).

### 1.3 Sociální imunita

Sociální hmyz si vyvinul obranyschopnost, která je založena na spolupráci mezi jednotlivci v hnízdě vedoucí ke snižování infekčního tlaku z okolí (Cremer *et al.*, 2007). Mezi důležité prvky sociální imunity včelstva patří hygienické chování, „Varroa Sensitive Hygiene“ (VSH), které se projevuje odstraňováním plodu napadeného kleštíkem včelím, dále tzv. „grooming“, při němž dělnice strhávají jiným dělnicím roztoče z těla, a péče o hnízdo při sběru propolisu či sociální horečka (Evans & Spivak, 2010). Hygienické chování včelstva se projevuje jako vyklízení uhynulého nebo nemocného plodu (larev, kukel) z hnízda (Panasiuk *et al.*, 2010). Včely uhynulý plod zkonzumují nebo vynesou z úlu ven. Toto chování má význam především pro snižování tlaku pro včely patogenních i nepatogenních bakterií, neboť rozkládající se tkáně jsou potenciálním rizikem pro celé včelstvo. Včasné odklizení bakteriálně napadených jedinců může omezit šíření sporulující bakterie *Paenibacillus larvae*, původce moru včelího plodu či houby *Ascosphaera apis* (zvápenatění plodu) (Spivak & Reuter, 2001; Palacio *et al.*, 2010).

Jako VSH chování se označuje čištění buněk napadených kleštíkem včelím (*Varroa destructor*). Včelstva odolná k této parazitóze se označují jako varroatolerantní,

jako možný mechanismus přežití se u těchto včelstev uvádí schopnost rozpoznat a odstranit kukly napadené roztočem (Rosenkranz *et al.*, 2010). Byly popsány populace včelstev, které přežívají i vysoké napadení roztočů, nacházejí se na ostrově Gotland ve Švédsku nebo i ve Francii (Le Conte *et al.*, 2007; Locke & Fries, 2011). Další vlastností, která se podílí na snižování populace roztočů ve včelstvech je „grooming“, tedy vzájemné čištění včel od roztočů na jejich tělech (Evans & Spivak, 2010).

Pro potlačování rozvoje bakterií má ještě význam sběr propolisu, což je velmi proměnlivá směs původem z rostlin se silně antibiotickými účinky. Včely používají propolis k lakování prostor úlu i plástů (Simone *et al.*, 2009; Bilikova *et al.*, 2013). Jako sociální horečka se označuje zvýšení teploty uvnitř úlu, která vede k potlačování růstu na teplo citlivé houby *Ascosphaera apis* (Starks *et al.*, 2000).

## **1.4 Individuální imunita**

### **1.4.1 Fyzikální bariéry a buněčná imunita**

Jednotlivé včely mají svůj vlastní imunitní systém, který sestává z fyzikálních bariér, buněčné a humorální imunity. Fyzikální bariéry tvoří základní úroveň ochrany jednotlivých včel a larviček, protože brání vstupu mikroorganismů do těla hostitele. Porušením kutikuly parazitickým roztočem kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) se otvírá prostor pro vstup virů a bakterií do těla vyvíjejících se kulek (Kanbar & Engels, 2004). Jakmile mikroorganismus prostoupí skrz fyzikální bariéry, dochází k aktivaci buněčné imunitní odpovědi, ta je úzce spjata s imunitou humorální. Buněčnou imunitní odpověď zajišťují imunitní buňky – hemocyty. V hemolymfě hmyzu se nejčastěji vyskytují prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, sferulocyty a oenocyty (Lavine & Strand, 2002). Hemocyty se účastní fagocytózy, nodulace a enkapsulace patogenních mikroorganismů, jejich zastoupení se mění s věkem včel (Turner, 1994; Amaral *et al.*, 2010).

### **1.4.2 Humorální imunita**

Humorální imunita je spjata s buněčnou imunitou, protože hemocyty jsou schopny produkovat některé komponenty humorální imunitní odpovědi, například antimikrobiální peptidy - AmP (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990). Tato část imunitního systému je tvořena jednotlivými molekulami, mezi něž patří právě zmíněné AmP, lektiny a enzymy lysozym (EC 3.2.1.17) a fenoloxidasa (EC 1.14.18.1) (Gliński & Jarosz, 2001).



Lektiny mají afinitu ke glykosylovaným proteinům buněčné stěny bakterií, na níž se vážou. Vazbou spouštějí fagocytózu, kterou vykonávají hemocyty obsažené v hemolymfě (Turner, 1994). Lysozym hydrolyzuje  $\beta$ -1,4,-glykosidovou vazbu mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu mureinu a mezi *N*-acetyl-D-glukosaminovými zbytky chitinu. Je tedy aktivní především proti Gram-pozitivním bakteriím ( $G^+$ ), při infekci jeho koncentrace může vzrůst z 5 – 25  $\mu\text{g/ml}$  na 1300  $\mu\text{g/ml}$  (Glinski & Jarosz, 1993).

Biochemická dráha aktivace enzymu fenoloxidasy je spouštěna lipopolysacharidy a peptidoglykanem z buněčných stěn bakterií nebo i  $\beta$ -1,3-glukany z buněčných stěn hub (Cerenius & Soderhall, 2004). Fenoloxidasa je aktivována ze svého zymogenu pro-fenoloxidasy pomocí serinových proteas (Cerenius *et al.*, 2010). Principem účinku fenoloxidasy je oxygenace fenolů na *o*-difenoly a následná oxidace *o*-difenolů na *o*-chinony. Výsledný produkt, barvivo melanin, i meziprodukty reakce jsou látky s antimikrobiální funkcí (Kanost & Gorman, 2008). Aktivita fenoloxidasy se mění s věkem včely nebo i v závislosti na kastě (matka, trubec, dělnice). Například včely vylétující za zdroji potravy mají vyšší aktivitu fenoloxidasy, protože jsou v kontaktu s mnoha mikroorganismy ve venkovním prostředí. Mladušky a úlové včely mají aktivitu tohoto enzymu nižší, zřejmě proto, že nejsou vystaveny tak vysokému infekčnímu tlaku (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

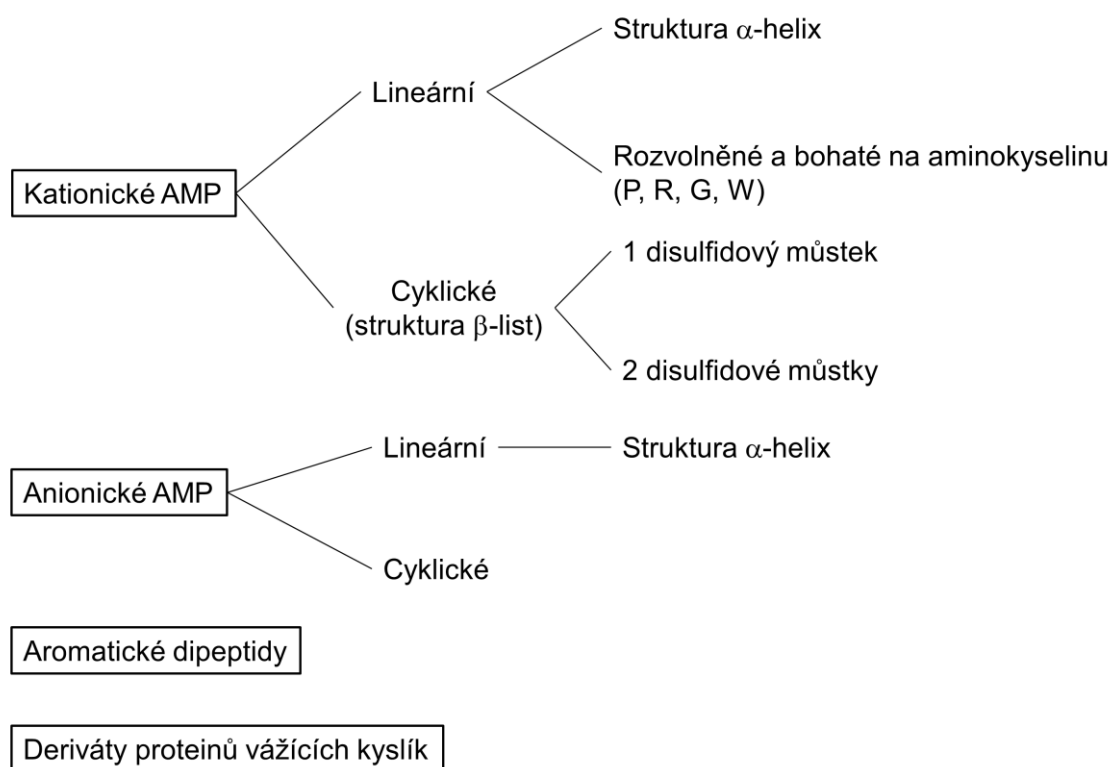
Další významnou složkou humorální imunity jsou AmP. Tyto se často tvoří na ribosomech, některé ale také mohou být (např. v mikroorganismech) syntetizovány neribozomálními peptidovými syntetasami. Mezi takovéto peptidy produkované bakteriemi patří například glykopeptid vancomycin, lipopeptidové antibiotikum daptomycin nebo imunosupresant FK506 (Giessen & Marahiel, 2012). U včel byly nalezeny peptidy apidaecin (isoformy 1A, 1B a 2), abaecin, defensin a malý antimikrobiální protein hymenoptaecin v hemolymfě (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Klaudiny *et al.*, 2005), jelleiny a royalisin v mateří kašičce (Fujiwara *et al.*, 1990; Fontana *et al.*, 2004), konečně pak melittin, apamin a „mast cell degranulating“ (MCD) peptidy v jedu (Fennell *et al.*, 1968; Lima & Brochetto-Braga, 2003).

## **1.5 Antimikrobiální peptidy**

AmP se nacházejí napříč všemi organismy, u nichž se podílejí na imunitní odpovědi při ochraně před infekčními agens, jako jsou bakterie, houby a další mikroorganismy (Wimley & Hristova, 2011; Li *et al.*, 2012). AmP byly popsány prakticky u všech organismů, většinou jsou to krátké aminokyselinové řetězce (30 – 60 aminokyselin) s převažujícím kladným nábojem a cytotoxickým účinkem na prokaryontní buňky (Li *et al.*, 2012). Některé AmP jsou však i kratší, např. apidaeciny mají 18 aminokyselin (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

## **1.6 Rozdělení antimikrobiálních peptidů**

Celkově bylo popsáno více než 1500 AmP napříč všemi organismy, z toho však přibližně 200 AmP bylo nalezeno u hmyzu (Li *et al.*, 2012). Můžeme je rozdělit podle struktury na cyklické a lineární, zároveň podle náboje na kationtové a aniontové nebo podle zvýšeného obsahu konkrétních aminokyselin (Andreu & Rivas, 1998; Powers & Hancock, 2003; Neubauerova *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2014). Schéma dělení AmP následuje:



Obr. č. 2: Schéma rozdělení antimikrobiálních peptidů podle jejich struktury. Upraveno dle Andreu & Rivas (1998); Powers & Hancock (2003); Neubauerova *et al.* (2009); Li *et al.* (2014).

### 1.6.1 Kationtové antimikrobiální peptidy

Skupina kationtových AmP je nejrozsáhlejší, navíc tyto AmP vykazují mnohonásobně vyšší antimikrobiální aktivitu v porovnání s ostatními skupinami peptidů (Vizioli & Salzet, 2002). Kationtové AmP jsou aktivní proti  $G^+$  i Gram-negativním ( $G^-$ ) bakteriím (Powers & Hancock, 2003). Strukturně tyto peptidy obsahují větší množství aminokyselin s bazickým postranním řetězcem, jako jsou histidin, arginin nebo lysin. Jejich celkový náboj se pohybuje od +2 do +9 (Hancock & Sahl, 2006), náboj peptidu se může podílet na celkové antibakteriální aktivitě peptidu (Dathe *et al.*, 2001). Neméně důležitým faktorem pro antimikrobiální funkci peptidů je i jejich sekundární struktura. Aminokyseliny prolin a glycin často tvoří smyčku mezi dvěma  $\alpha$ -helixy u skupiny peptidů s  $\alpha$ -helikální strukturou. Smyčka, resp. počet prolinů, může mít vliv na antimikrobiální aktivitu peptidu. Se zvyšujícím se počtem prolinů ve struktuře peptidu klesá jeho schopnost vytvářet kanály v membráně bakterií (Zhang *et al.*, 1999). Peptidy se strukturou  $\beta$ -listu obsahují disulfidové můstky, které stabilizují molekulu peptidu,

což je důležité pro interakci peptidu s membránou, kdy dochází k ohybu peptidu (Powers & Hancock, 2003). Například peptid tachyplesin má strukturu antiparalelního  $\beta$ -listu obsahující 2 disulfidové vazby. Tato struktura je důležitá pro jeho afinitu k lipopolysacharidům, přes které se peptidy s  $\beta$ -strukturou translokují přes buněčnou stěnu a membránu bakterií do cytoplazmy. Translokace přes fosfolipidovou dvojvrstvu je právě nejvyšší u  $\beta$ -struktur v porovnání s  $\alpha$ -helixy nebo rozvolněnými strukturami, u nichž je translokace nejnižší (Zhang *et al.*, 2001). Po změně struktury tachyplesinu na lineární poklesla jeho antimikrobiální aktivita, protože byla narušena schopnost peptidu translokovat se přes membránu (Tamamura *et al.*, 1993; Matsuzaki *et al.*, 1997).

### **1.6.2 Aniontové antimikrobiální peptidy**

Skupina aniontových AmP je výrazně méně početná než skupina peptidů kationtových. Peptidy z této skupiny obsahují ve své struktuře kyselé aminokyseliny, které jim udávají záporný náboj pohybující se v rozmezí -1 až -7, výjimečně pak až -20 (Lavery *et al.*, 2011). Mechanismus působení anionických AMP není tak dobře prozkoumaný jako u kationických peptidů. Peptidy mohou interagovat s molekulami uvnitř buněk, vázat se na chitin v buněčné stěně nebo mohou procházet přes plasmatickou membránu při interakci s lipidy (Prabhu *et al.*, 2013). Mezi zástupce aniontových peptidů patří peptid izolovaný z obojživelníků maximin H5, peptid izolovaný z lidského potu dermicidin (Lavery *et al.*, 2011), či opioidní peptid s antibakteriální funkcí enkelytin (Stefano *et al.*, 1998).

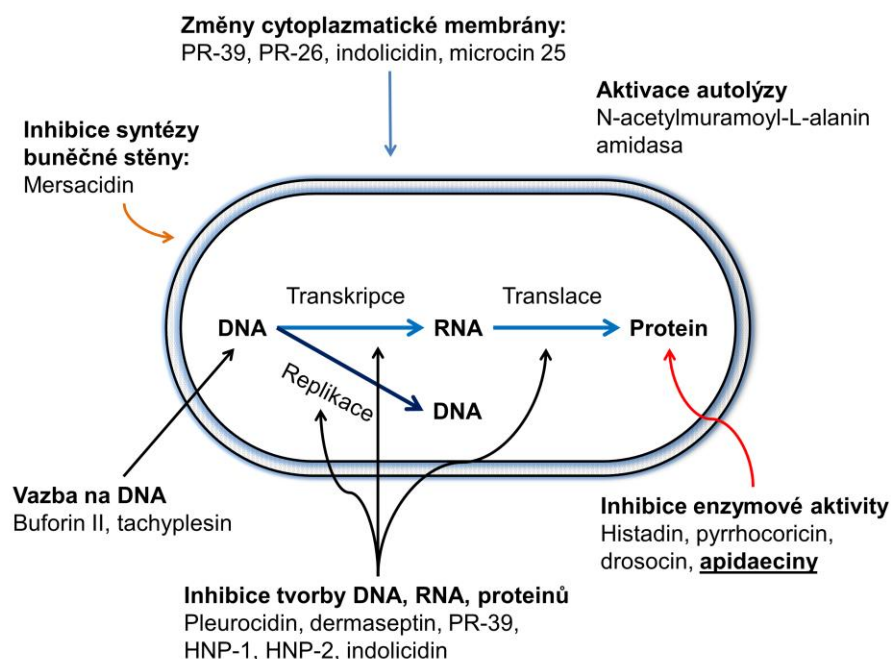
### **1.6.3 Aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vážící kyslík**

Aromatické dipeptidy byly izolovány z larev hmyzu z řádu dvoukřídlých (*Diptera*). Zástupcem této skupiny je peptid 5-S-GAD, který vykazuje protinádorovou aktivitu a potlačuje angiogenezi (Brogden *et al.*, 1996). Mezi deriváty proteinů vážících kyslík patří hemocyaninové deriváty z hemolymfy kroužkovců a členovců, podobné molekuly byly popsány i v hemolymfě klíšťat (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001). Ve srovnání s kationtovými AmP je však účinek zástupců těchto skupin peptidů slabý (Vizioli & Salzet, 2002).

## **1.7 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů**

Mechanismus účinku na molekulové úrovni byl studován u mnoha AmP, jejich účinky se však značně liší. Některé AmP interagují s buněčnou membránou, kterou

mohou lyzovat nebo v ní vytvářet póry, a narušovat tak membránový potenciál. Jiné peptidy vstupují do cytosolu buněk a interagují s vnitrobuněčnými cíli (Brogden, 2005).

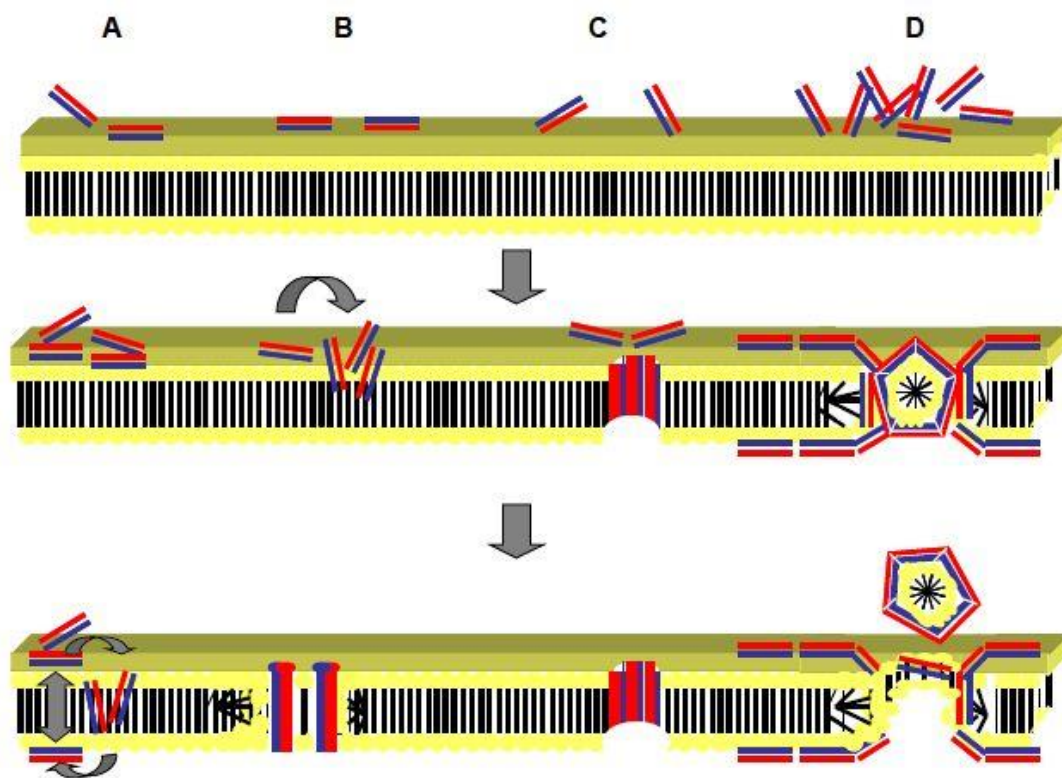


Obr. č. 3: Mechanismy interakce AmP se složkami prokaryotické buňky, upraveno dle Brogden (2005).

AmP nespecificky interagují s vnější buněčnou stěnou bakterií, kde jejich kladné náboje kontaktují záporně nabitě lipopolysacharidy. Elektrostatická interakce a membránový potenciál jsou důvodem přiblížení peptidů k buněčné stěně bakterií. Výsledkem interakce je buď neutralizace náboje, nebo proniknutí peptidu přes buněčnou stěnu do prostoru mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou (Hancock & Chapple, 1999; Neubauerova *et al.*, 2009). Pro přiblížení peptidu k buňce je důležitá hodnota membránového potenciálu. Pro savčí buňky se hodnota  $\Delta\psi$  pohybuje v rozmezí -90 až -110 mV, pro bakteriální buňky v logaritmické fázi růstu je typická hodnota  $\Delta\psi$  -130 až -150 mV (Yeaman & Yount, 2003). Fosfolipidové membrány eukaryot obsahují fosfatidylcholin, sfingomyelin a cholesterol udávající buněčné membráně neutrální náboj, ale i fosfatidylethanolamin, který je slabě aniontový. Naopak bakteriální membrány obsahují ve velké míře fosfatidylglycerol a fosfatidylserin, dále pak lipoproteiny a v případě gramnegativních bakterií i lipopolysacharidy (Neubauerova *et al.*, 2009).

Existuje několik modelů mechanismu reakce AmP s bakteriální membránou (Brogden, 2005; Laverty *et al.*, 2011):

- a) agregační model („aggregate model“): peptidy vytvářejí uvnitř membrány agregáty, což roztahuje membránu díky vzniku komplexních micel z lipidů a peptidů;
- b) model toroidního póru („toroidal pore“): peptidy se postupně začleňují do membrány, což vede k jejímu ohýbání a deformaci; na rozdíl od modelu sudové skruže pór tvoří jak peptidy, tak i fosfolipidy z membrány;
- c) model sudové skruže („barrel-stave model“): peptidy ve formě monomerů tvoří kruhovitě útvary, následně se paralelně orientují k lipidové dvojvrstvě a nakonec vytvoří pór ve tvaru sudu;
- d) koberecový model („carpet model“): peptidy se shlukují na povrchu membrány, hydrofóbní část je orientována k povrchu membrány a vázána k peptidu, jakmile koncentrace peptidu dosáhne limitní hranice, dojde k rozpadu membrány.



Obr. č. 4: Schématické znázornění interakcí peptidů s membránami. A – agregační model, B – model toroidního póru, C – model sudové skruže, D – koberecový model, převzato z Laverty *et al.* (2011).

### 1.8 Antimikrobiální peptidy včel

U včely medonosné (*Apis mellifera*) byly jako první detegovány AmP v hemolymfě, kde byly nalezeny apidaeciny, abaecin a malý protein hymenoptaecin. Tyto peptidy se liší ve své antimikrobiální specifitě. Apidaeciny jsou účinné proti  $G^-$  bakteriím, zatímco abaecin je účinnější proti  $G^+$  bakteriím, jeho inhibiční účinky byly prokázány i proti bakterii *Paenibacillus larvae*. Hymenoptaecin vykazuje podobně jako apidaeciny inhibiční účinky proti  $G^-$  bakteriím. K jeho expresi však dochází i po expozici včel syntetické dsRNA (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Evans, 2004; Schluns & Crozier, 2007).

Fujiwara *et al.* (1990) detegovali v mateří kašičce AmP, který byl pojmenován jako royalisin a zařazen do skupiny defensinů. Klaudiny *et al.* (2005) později zjistili, že v genomu včely jsou kódovány dvě isoformy defensinů: defensin-1 a defensin-2. Isoforma defensinu-1 se nachází jak v hemolymfě, tak i mateří kašičce. Hmotnostně spektrometrickou analýzou se dále zjistilo, že defensin-1 obsažený v hemolymfě má

amidový C-konec peptidu (poslední aminokyselinou je fenylalanin) a defensin-1 z mateří kašičky (nazvaný royalisin) má v aminokyselinové sekvenci na pozici 50 tyrosin namísto argininu, který je zde přítomný v sekvenci defensinu-1 z hemolymfy (Casteels, 1998). V mateří kašičce je přítomna ještě třetí isoforma defensinu-1, jehož C-koncovou terminální aminokyselinou je arginin (Klaudiny *et al.*, 2005; Ilyasov *et al.*, 2013). Kwakman *et al.* (2010) studovali antimikrobiální účinky medu, které jsou dány přítomností peroxidu vodíku, methylglyoxalu ale i defensinem-1. Defensin-2 dosud nebyl nalezen, jde o peptid předpovězený na základě analýzy cDNA (Klaudiny *et al.*, 2005).

Jinou skupinou AmP detegovaných v mateří kašičce jsou jelleiny, které byly prvně izolovány u afrikanizovaných včel (*Apis mellifera scutellata*). Popsány byly čtyři isoformy jelleinů lišících se ve své antibakteriální aktivitě. Rozdílná aktivita peptidů může být dána odlišnostmi v jejich sekvenci. Největší antimikrobiální aktivitu vykazuje isoforma jellein-I (Fontana *et al.*, 2004; Romanelli *et al.*, 2011). Jelleiny nejsou syntetizovány jako aktivní peptidy, aktivní forma peptidu vzniká až proteolytickým štěpením prekurzorového proteinu MRJP-1 („major royal jelly protein-1“) (Fontana *et al.*, 2004).

Přibližně 40 – 60 % hmotnosti sušiny včelího jedu obsahuje amfipatický, 26 aminokyselin dlouhý peptid melittin vykazující lytickou aktivitu proti  $G^+$  i  $G^-$  bakteriím; snižuje povrchové napětí, čímž působí jako přírodní detergent. Včelí jed obsahuje v daleko menším zastoupení pro obratlovce i bezobratlé neurotoxický apamin a další peptidy adolapin a MCD peptid (Fennell *et al.*, 1968; Lima & Brochetto-Braga, 2003). U melittinu se využívá jeho protizánětlivého účinku při léčbě revmatoidní artritidy, inhibuje cyklooxygenasu-2 a produkci superoxidu, které iniciují a podporují zánětlivý proces při artritidě (Lee *et al.*, 2008).

### 1.8.1 Apidaeciny

Na základě analýzy cDNA knihovny včel (*Apis mellifera*) byly popsány čtyři varianty pro geny apidaecinů. Jednotlivé geny byly pojmenovány jako *Apid14*, *Apid22* a *Apid73* a kódují prekurzorový protein, z něhož jsou následně proteolyticky sestřiženy jednotlivé sekvence propeptidů až do vzniku aktivního peptidu (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	GNNRPF <b>V</b> YI <b>P</b> QPRPPHP <b>R</b> I	Q06601	<i>Apid14</i>	1
		P35581	<i>Apid22</i>	1
		Q06602	<i>Apid73</i>	1
Apidaecin 1B	GNNRPF <b>V</b> YI <b>P</b> QPRPPHP <b>R</b> L	Q06601	<i>Apid14</i>	2
		P35581	<i>Apid22</i>	3
		Q06602	<i>Apid73</i>	6
Apidaecin 2	GNNRPF <b>I</b> YI <b>P</b> QPRPPHP <b>R</b> L	Q06601	<i>Apid14</i>	2
Apidaecin*	GNNRPF <b>V</b> YI <b>S</b> QPRPPHP <b>R</b> L	Q06602	<i>Apid73</i>	2

\*predikovaný peptid

Produkce aktivního apidaecinu pravděpodobně probíhá ve třech krocích, kdy je prekurzorový protein obsahující několik kopií aktivních isoform apidaecinů (viz. Tab. 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 TNLDPPTRPA RLRREAKPEA EP **GNNRPIYI**  
60 70 80 90 100  
**PQPRPPHPRL** **RR**EAEPKAEP **GNNRPIYIPQ** PRPPHPRL**RR** EAESAE**EP**GN  
110 120 130 140 150  
NRPFVYIPQPR PPHPR**L**RR**EP**EAEP **GNNRPFV** YIPQPRPPHP **RL**RR**EP**EAEP  
160  
**GNNRPFVYIPQ** PRPPHP**R**I

Obr. č. 5: Předpovězená sekvence prekurzorového proteinu, který je kódován genem *Apid14* s vyznačením signální sekvence (žlutě), propeptidů (červeně) a dvojic argininů, které jsou odstřiženy z C-konce aktivních peptidů (modře). Aktivní isoformy apidaecinu jsou zvýrazněny tučně a podtrženy (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

Apidaeciny patří k silně bazickým peptidům, jejich isoelektrický bod je 11,71. Bazicita peptidu je dána obsahem tří argininů v sekvenci peptidu, které udávají peptidu celkový náboj +3. Díky obsahu šesti prolinů (33 % ze všech aminokyselin v sekvenci) patří apidaeciny do skupiny peptidů bohatých na prolin. Poměrné zastoupení tří isoform apidaecinu v hemolymfě je: apidaecin 1A 5%, apidaecin 1B 80 – 90 %, apidaecin 2: 5 – 15 %, přičemž celkový obsah apidaecinů v hemolymfě je po nákaze až 360 µg/ml hemolymfy (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

### 1.9 Význam studia antimikrobiálních peptidů

Počátky hledání a identifikace látek s antimikrobiální aktivitou sahají do začátku 20. století, kdy Alexander Fleming objevil látku obsaženou v lidských sliznicích, projevující se svou antimikrobiální aktivitou. Tuto molekulu pojmenoval jako lysozym (Nakatsuji & Gallo, 2012). Později byly nalezeny látky, které produkuje půdní bakterie *Bacillus brevis*. Ukázalo se, že jde o směs AmP s bakteriostatickým i bakteriocidním účinkem, peptidy byly pojmenovány jako gramicidiny (Dubos, 1939a; Dubos, 1939b). V současnosti je známo, že peptidy s antimikrobiální funkcí produkují prokaryotní i eukaryotní organismy, a byly jich již identifikovány řádově stovky (Wimley & Hristova, 2011). Vyhledávání a výzkum látek zabraňujících nebo inhibujících rozvoji patogenních mikroorganismů u hmyzu započal Hans G. Boman. Boman *et al.* (1972) popsali nespecifickou imunitní odpověď v hemolymfě octomilky (*Drosophila melanogaster*) jako reakci po infekci bakteriemi (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Aerobacter cloacae*) rezistentními na antibiotika. Následovaly objevy mnoha dalších AmP, například cekropinů z martináče cekropiového (*Hyalophora cecropia*) nebo později lidského peptidu LL-37 (Steiner *et al.*, 1981; Pütsep & Faye, 2009).

AmP mají díky svým vlastnostem velký potenciál využití v medicíně nebo biotechnologiích, testují se jako náhrada klasicky používaných antibiotik nebo i jako látky aplikovatelné potenciálně při léčbě rakoviny (Li *et al.*, 2014). Strategie spočívá ve vyhledávání stále nových a nových peptidů napříč všemi organismy, testování jejich aktivity proti různým více či méně odolným kmenům bakterií, hub a dalších mikroorganismů. Následuje testování toxicity proti savčím a lidským buňkám. Pokud jsou prvotní testy úspěšné, jsou zaváděny technologie pro přípravu většího množství peptidů k dalším testům *in vitro* nebo *in vivo*. S aplikací peptidů v různých odvětvích samozřejmě souvisí i celková cena potenciální léčby nebo jiné aplikace a také její

účinnost (Hancock & Sahl, 2006). Do dnešní doby prochází testy celá řada peptidů testovaných jako možná léčba diabetických vředů, růže, chronických zánětů středního ucha a dalších. Například magainin peptid/pexiganan acetát je již ve třetí fázi testování při léčbě diabetických vředů (Fjell *et al.*, 2012; Fox, 2013).

Pro produkci AmP se využívají různé expresní systémy. Peptidy lze produkovat v bakteriích nebo kvasinkách (Zhou *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009). Bakterie jsou však na některé AmP přirozeně citlivé, protože peptidy jsou proti nim vlastně namířeny, a tak jsou často tvořeny v neaktivní formě prekurzoru, který je následně *in vitro* sestřižen do aktivní formy (Ingham & Moore, 2007). Někdy jsou pro produkci využívány i kvasinky (např. *Pichia pastoris*) (Shiloach *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009). Jinou možností, jak levně a efektivně produkovat antimikrobiální peptidy je jejich získávání v rostlinných expresních systémech, které potenciálně umožňují vyšší produktivitu i možnost skladování, např. v semenech (Giddings *et al.*, 2000).

Ačkoli včela medonosná patří mezi eusociální hmyz, tak výzkum celulární a humorální imunity na úrovni jednotlivých včel je důležitý pro pochopení, jak mohou různé faktory ovlivnit imunitní systém. AmP byly popsány na biochemické úrovni včetně jejich účinků proti různým mikroorganismům. Bohužel však stále není zcela známo, jak různé patogeny, xenobiotika či výživa ovlivňují genovou expresi a tvorbu těchto peptidů. Sice jsou popsány rozdíly v expresi genů pro AmP u včel uměle infikovaných různými agens (např. *E. coli* nebo patogenní *P. larvae*) nebo jen stimulovaných fyziologickým roztokem, ovšem stále chybí detailní studie, které by zahrnovaly i sledování tvorby samotných AmP v hemolymfě nebo tkáních včel či jejich vývojových stádií (Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006).

## **1.10 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.

### **1.11 Příprava vzorku pro purifikaci peptidů**

Identifikace peptidů minoritně zastoupených ve studovaných vzorcích s sebou nese komplikace jak ve stabilitě peptidů, tak i v odstranění majoritních proteinů nebo peptidů, které by způsobily vysoký signál pozadí a interferovaly se stanovením cílových analytů. Biologické vzorky mohou také obsahovat mnoho anorganických solí a nízkomolekulárních metabolitů, typickým příkladem takového vzorku je moč nebo plasma.

Dialýza je klasická biochemická metoda pro odstranění kontaminujících nebo interferujících látek ze vzorku, bohužel její nevýhodou je časová náročnost (Tantipaiboonwong *et al.*, 2005). Ultrafiltrace je v porovnání s dialýzou výrazně rychlejší metoda, k dispozici jsou komerční ultrafiltrační patrony s různou technologií výroby membrán, objemů, pro které jsou kolony určeny, nebo velikostí pórů definujících velikost molekul schopných membránou projít (tzv. cut off limit) (Millipore, 2014). Ultrafiltrace je využívána pro oddělení proteinů na základě molekulové velikosti, což má široké uplatnění, například při separaci peptidů a proteinů produkovaných do bakteriálních kultur nebo produktů žláz s extracelulární sekrecí (Bilikova *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2013). Pokud ultrafiltraci nelze z nějakého důvodu použít (nedostupnost, nevhodnost pro daný vzorek atp.) je možné analyty ze vzorků separovat precipitací. Ke srážení lze použít organická rozpouštědla nebo jejich směsi. Tento přístup může být využit při izolaci peptidů z moči. Proteiny a lipidy lze ze vzorků vysrážet vychlazeným acetonem, acetonitrilem okyseleným trifluoroctovou kyselinou, směsí methanol/chloroform/voda nebo směsí trichloroctové kyseliny a acetonu (Tantipaiboonwong *et al.*, 2005). Relativně novým přístupem je využití magnetických částic k purifikaci biomolekul. Na tyto částice se mohou biomolekuly vázat specificky i nespecificky, výhoda purifikace pomocí magnetických částic je především rychlost a relativně nízká cena (Šafařík & Šafaříková, 2004).

### **1.12 Extrakce na pevné fázi**

Extrakce na pevné fázi (SPE, „solid phase extraction“) byla vyvinuta pro analýzu farmaceutik, drog či metabolitů přítomných v biologických vzorcích. SPE nahrazuje konvenční extrakci z kapaliny do kapaliny, která je zdlouhavá, pracná a relativně drahá

z důvodu spotřeby velkého množství velmi čistých rozpouštědel. Metoda SPE má vysokou návratnost, spotřeba rozpouštědel je vcelku nízká v porovnání s extrakcí z kapaliny do kapaliny, vzorky nepění a navíc celou metodu lze v laboratoři snadno automatizovat (Kataoka, 2003). Jako sorbenty pro plnění SPE kolonek se používají různé anorganické nebo polymerní materiály. Mezi nejběžnější patří silikagely, polymerní materiály jakým je kopolymer styrenu a divinylbenzenu nebo zesíťovaný methakrylát. Na ně jsou pak navázány funkční řetězce pro purifikaci využívající chromatografie na reverzní fázi nebo ionexovou chromatografii. Existují i smíšené sorbenty, při jejichž funkci se současně uplatňují reverzní i ionexové chromatografie (Nováková & Vlčková, 2009). S běžně používanými SPE kolonkami je snadné pracovat, avšak silikagelové sorbenty mají tu nevýhodu, že během postupu extrakce nesmějí vyschnout, jinak ztrácejí svou funkci; naproti tomu kolonky s polymerními sorbenty jako jsou Oasis<sup>TM</sup> (Waters) nebo Absolut (Varian) toto omezení nemají (Nováková & Vlčková, 2009).

Dostupnost SPE sorbentů ve formě kolonek nebo extrakčních disků skýtá možnost vlastní laboratorní přípravy kolonek. Ty jsou sice k dostání komerčně pro různé objemy vzorků, avšak v některých případech je možné zakoupit samostatně konkrétní sorbent nebo extrakční disky a s nimi pracovat. Rappsilber *et al.* (2007) vyvinuli protokol pro mikroextrakci peptidů, který je založen na laboratorní přípravě kolonek z pipetovacích špiček a teflonového disku s funkčními skupinami pro chromatografii.

### **1.13 Chromatografické techniky pro purifikaci antimikrobiálních peptidů**

Mnoho studií o izolaci biologicky aktivních peptidů zahrnuje často specifickou analytickou strategii purifikace těchto biomolekul z tkání, pletiv či biofilmů zakončenou spojením kapalinové chromatografie s UV-Vis detekcí nebo specifičtější a citlivější detekcí hmotnostně spektrometrickou (Sasaki & Minamino, 2013). Vyrůstající nabídka komerčních antimikrobiálních nebo i jinak biologicky aktivních peptidů přinesla potřebu dostupných analytických metod detekce a kvantifikace těchto peptidů před a po jejich otestování, případně i stanovování jejich fyziologických koncentrací v živých systémech (Diehl *et al.*, 2011). K analýze AmP nacházejících se v hemolymfě byla nejčastěji využívána chromatografie na reverzní fázi s UV-Vis detekcí (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993), neuropeptidy byly dokonce přímo analyzovány v mozkové tkáni včel hmotnostně spektrometrickou analýzou bez předchozí purifikace (Boerjan *et al.*, 2010).

## 1.14 Využití iontoměničové chromatografie

Iontoměničová chromatografie (IEC, “ion-exchange chromatography”) je založena na interakci nabitých molekul ve vzorku a nabitými funkčními skupinami chromatografického sorbentu v prostředí s vhodným pH. Analyty jako aminokyseliny, peptidy a proteiny se v používaných pufrch chovají jako nabité molekuly, které lze s úspěchem separovat na různých iontoměničových sorbentech v závislosti na povaze konkrétního analytu. IEC je využívána při výzkumu i v klinických laboratořích, protože se jedná o relativně levnou metodu a sorbenty i plněné kolony jsou snadno dostupné u mnoha dodavatelů laboratorních potřeb (Velickovic *et al.*, 2012).

AmP jsou za fyziologických podmínek nabité molekuly, což je nezbytná vlastnost pro jejich interakci s membránami mikrobiálních buněk nebo i pro interakci s vnitrobuněčnými cíli. Největší skupinu AmP tvoří kladně nabitě bazické peptidy, menší skupinou jsou pak záporně nabitě peptidy s *pI* v kyselé oblasti (Kang *et al.*, 2014). IEC je tedy technika využitelná i při izolaci zkoumaných AmP z různých organismů.

### 1.14.1 Iontoměničová chromatografie na anexech

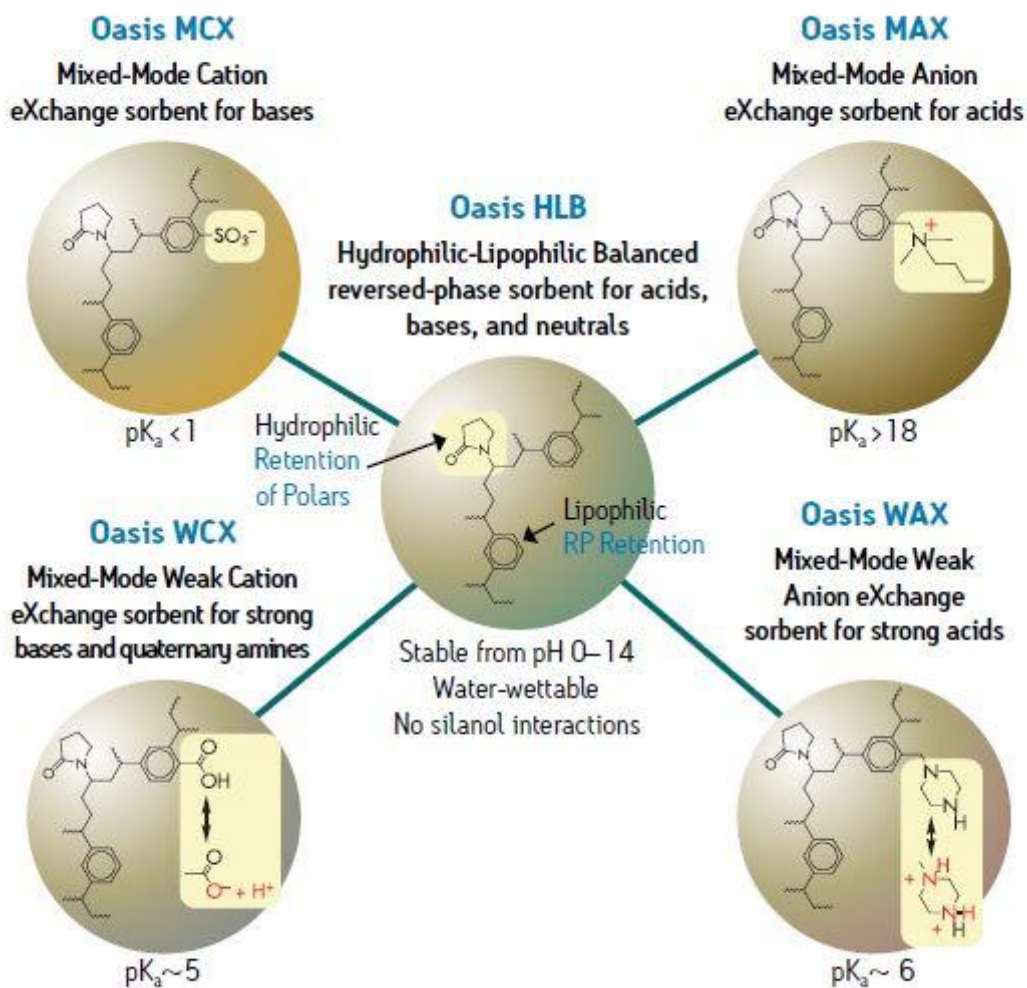
Tato varianta využívá aniontoměničů (anexy), ty jsou silikagelové nebo polymerní nerozpustné sorbenty s navázaným terciárním aminem nebo jinou kladně nabitou skupinou schopnou elektrostaticky vázat záporně nabitě molekuly z roztoků. Silné anexy jsou vhodné pro izolaci slabě nabitých aniontů, protože ty mohou být snadno eluovány jiným aniontem nebo změnou pH roztoku, čímž zachycený aniont dostane neutrální nebo kladný náboj způsobující jeho eluci ze sorbentu. Pro silně kyselé peptidy je vhodnější použít slabý anex, který má navázanou jinou funkční skupinu s nižší disociační konstantou.

Kapalinová chromatografie na anexech byla využita pro studium proteomu buněčného lyzátu nebo při studiu glykosylací proteinů (Behan & Smith, 2011; Ritorto *et al.*, 2013). Pro studium AmP je však vzhledem k jejich silnému náboji mnohem častější IEC na kationtoměničích.

### 1.14.2 Iontoměničová chromatografie na katexech

Katexy mají na svém povrchu, např. záporně nabitě sulfátové skupiny, tyto se pak označují jako silné katexy (SCX), nebo karboxylové skupiny, které jsou funkční skupinou u slabých katexů (WCX). Vhodnost výběru slabého nebo silného katexu je

analogická jako u práce s anezy, opět závisí na povaze analyzovaného peptidu. Pro silně bazické látky bude vhodnější WCX a pro slabě bazické molekuly SCX.



Obr. č. 6: Struktury funkčních skupin různých iontoměničových sorbentů a jejich interakce s analyty, převzato z firemního materiálu Waters (2005).

Kapalinová chromatografie na katexech našla využití pro předseparaci a purifikaci kladně nabitých molekul včetně biologicky aktivních peptidů. Recio & Visser (1999) izolovali antibakteriální peptidy z pepsinového hydrolyzátu glykoproteinu laktoferinu. Nový antibakteriální peptid byl izolován z kultury bakterie *Brevibacillus laterosporus* s využitím srážení síranem amonným a následné purifikaci na katexu a s odsolením na koloně plněné reverzní fází (Zhao *et al.*, 2012). Mezi další biologicky aktivní peptidy, které byly izolovány s využitím katexu, patří například endostatin nebo desmopressin (Shiloach *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2011). Iontoměničová chromatografie není využívána jen pro vyhledávání a izolace antimikrobiálních peptidů, ale i případných

markerů rakoviny nebo peptidových hormonů (Bansal *et al.*, 2009; van den Broek *et al.*, 2010).

Pro nanášení, promytí a eluci vzorků z katexů se využívá změny pH a případně i iontové síly rozpouštědla. Mezi nejčastěji využívané složky mobilní fáze patří mravenčan amonný, octan amonný nebo hydrogenuhličitan amonný. Analyty se ze sorbentů uvolňují změnou pH okyselením elučního roztoku (např. kyselinou mravenčí, FA) nebo iontovou silou roztoku chloridu sodného, případně i organickým rozpouštědlem (Recio & Visser, 1999; Staby *et al.*, 2006; Bansal *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2011).

#### **1.14.3 Chromatografie na reverzní fázi**

Chromatografie na reverzní fázi (RP-LC) dělí peptidy a proteiny na základě jejich hydrofobicity. Separace molekul probíhá na základě interakce mezi ligandem stacionární fáze, na které jsou navázány hydrofóbní alifatické ( $C_{4-18}$ ) nebo aromatické uhlovodíkové řetězce. Eluce analytů z těchto sorbentů probíhá buď isokraticky, nebo vzrůstajícím gradientem organického rozpouštědla, čímž roste eluční síla mobilní fáze (Aguilar, 2004).

Gruber *et al.* (1976) zavedli techniku RP-LC do analýzy peptidů, od té doby se tato metoda stala nejvyužívanější pro přípravu vzorků i samotnou finální separaci peptidů či proteinů (Di Palma *et al.*, 2012). Protože vzorky jsou na kolonu nanášeny v rozpouštědle s nízkým obsahem organické složky (tou je nejčastěji acetonitril nebo methanol) je metoda vhodná i pro odsolení vzorků purifikovaných na iontoměničových kolonách nebo odstranění solí po proteolytickém štěpení vzorků proteinů (Di Palma *et al.*, 2012).

Dvoudimenzionální chromatografie pak využívá kombinace ionexů a reverzní fáze nebo i dvou typů reverzních fází (Di Palma *et al.*, 2012). Kombinace SCX a RP je možné využít i pro přímou purifikaci peptidů ze vzorků, oba sorbenty mohou být dokonce naplněny v jedné koloně. Při čistění pak dochází k multidimenzionálnímu odsolení, filtraci, promytí i zkoncentrování analyzovaných peptidů nebo proteinů (Ishihama *et al.*, 2006).

#### **1.15 Využití hmotnostní spektrometrie pro kvantifikaci peptidů**

Hmotnostní spektrometrie (MS) se stala hlavním analytickým nástrojem pro studium výskytu, vlastností a funkcí proteinů a peptidů. Proteomika i peptidomika



využívá hmotnostní spektrometrii pro charakterizaci proteinů a jejich posttranslačních modifikací, dále pro porovnávání rozdílů v proteinovém spektru obsaženém v konkrétních vzorcích (zdravá vs. nemocná tkáň) a také pro studium protein-proteinových interakcí. MS se postupně stává důležitou a často využívanou metodou v biologii, protože může relativně rychle přispět k objasnění funkce studovaných proteinů. Mnohdy se kombinují přístupy molekulárně biologické a hmotnostně spektrometrické, např. při kontrole kvality rekombinantních proteinů (Pandey & Mann, 2000). Rozvoj purifikačních metod proteinů i peptidů a potřeba rychlého stanovení koncentrace analyzovaných biomolekul vedl i k rozvoji kvantitativní MS.

Vývoj metody pro kvantifikaci konkrétního proteinu nebo peptidu zahrnuje často nutnost optimalizovat laboratorní postup od zpracování vzorků, purifikaci daného analytu až po MS detekci (Taylor *et al.*, 2007). Isotopově značený peptid nebo vhodná část proteinu, se používají jako interní standardy (IS). Na základě naměřených signálů pro IS se výsledná data normalizují a z poměru signálu endogenní molekuly k značenému IS lze vypočítat koncentraci (Martínez-Bartolomé *et al.*, 2013). Ke značení IS se používají isotopy  $^{15}\text{N}$  nebo  $^{13}\text{C}$ , které jsou inkorporovány ve struktuře molekuly (Kuhn *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2009; Voges & Noack, 2012).

## **2 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 účastnících 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

### 3 Metody

#### 3.1 Syntetické standardy peptidů

Pro vývoj metody byly použity následující syntetické peptidy:

Tab. č. 2: Sekvence, molekulové hmotnosti a *pI* syntetických standardů peptidů, zakoupených od firmy Clonestar (ČR) – apidaeciny a Sigmy Aldrich (USA) bradykininy.

Název	Aminokyselinová sekvence	Monoisotopová molekulová	
		hmotnost	<i>pI</i>
Apidaecin 1A	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	2107,06	11,70
Apidaecin 1B	GNNRPVYIPQPRPPHPRL	2107,06	11,70
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> ] Apidaecin 1A	GNNRPVYIPQPRPPHPR*L	2117,17	11,70
Bradykinin	RPPGFSPFR	1059,56	12,00
K-des-R- Bradykinin	KRPPGFSPF	1031,56	11,00

\* označuje isotopově značenou aminokyselinu

Apidaecin 1A a apidaecin 1B jsou isobarické, pokud není rozlišena daná isoforma, označujeme peptid jako apidaecin 1 (bez písmena A/B).

#### 3.2 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 (MPBiomedicals, Illkirch, Francie) při intenzitě 5 m/s po dobu 20 s. Homogenát byl následně centrifugován (15000 × *g*, 10 min), inkubován při 100 °C po dobu 10 min a po ochlazení znovu centrifugován stejně jako v předchozím kroku. Supernatant vzorku byl zamražen a lyofilizován.

### 3.2.1 Chromatografická předseparace vzorku s využitím sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup>

Sorbent WCX Oasis<sup>TM</sup> (Waters, UK) dělí látky 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. 3: Optimalizovaný postup purifikace apidaecinu 1.

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

### 3.3 Odsolení vzorku na C<sub>8</sub> Stage Tip

Vzorky byly po přečištění na WCX Oasis<sup>TM</sup> sorbentu odsoleny s využitím C<sub>8</sub> extrakčních disků plněných do 200  $\mu\text{l}$  špiček (Rappsilber *et al.*, 2007). Vždy 2 kusy sorbentu vykrojených ocelovou jehlou z extrakčních disků byly plněny do koncové části 200  $\mu\text{l}$  špiček. Jednotlivé mobilní fáze byly přes sorbent protlačeny odstředivou silou vzniklou během centrifugace ( $1000 \times g$ , 5 min) špičky zasazené v plastové mikrozkuhavce .

Tab. č. 4: Postup odsolení vzorků na C<sub>8</sub> sorbentu z extrakčních disků.

	C <sub>8</sub>
Ekvilibrace	isopropanol (50 $\mu\text{l}$ ) 5% v/v FA ( $2 \times 50 \mu\text{l}$ )  <i>nanesení 50 <math>\mu\text{L}</math> vzorku</i>
Promytí	5% v/v FA ( $2 \times 50 \mu\text{l}$ )
Eluce	50% v/v acetonitril ( $2 \times 50 \mu\text{l}$ )

### 3.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Metoda MALDI-TOF MS byla využita pro kontrolu proběhlé derivatizace 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  $\alpha$ -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 C<sub>8</sub> Stage Tip. Před smísením s matricí byly vzorky rozpuštěny v 0,1% TFA, poté bylo 0,6  $\mu$ l vzorku a 0,6  $\mu$ L matrice nanášeno na destičku MSP AnchorChip<sup>TM</sup> 600/96.

### 3.5 Nanoprůtoková kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (nLC-MS)

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 je uveden v článku Daníhlík *et al.* (2014), viz. **Příloha 1**.

## 4 Optimalizace měření exprese genů antimikrobiálních peptidů

### 4.1 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 guanidinium thiokyanátového pufru (GITC pufr) v množství 300  $\mu$ l pufru/zadeček. GITC pufr obsahuje: 5,25 M guanidinium thiokyanát, 50 mM Tris-HCl (pH 6,4), 20 mM EDTA, 1,3% Triton X-100, 1%  $\beta$ -merkaptoethanol (Evans *et al.*, 2013). Vzorek 100  $\mu$ l homogenátu byl smíchán s 350  $\mu$ l RNA pufru. K izolaci celkové RNA byl použit kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), postup izolace byl totožný s návodem výrobce kitu. RNA byla eluována 95  $\mu$ l vody. Koncentrace a čistota izolované RNA byly stanoveny na mikrobjemovém spektrofotometru (BioSpec-nano).

Kontaminující DNA byla z izolátů RNA odstraněna DNAsou Turbo DNase (Ambion) a to tak, že k 90  $\mu$ l vzorku RNA byl přidán 1  $\mu$ l Turbo DNAasy a 10  $\mu$ l

reakčního pufru. Vzorek byl inkubován 30 min při 37 °C. Poté byl ke vzorku opětovně přidán 1 µl Turbo DNAasy a opět byl inkubován za stejných podmínek.

Okamžitě po ošetření vzorků DNAsou byla RNA izolována magnetickými kuličkami pomocí kitu Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter). K celkovému objemu RNA (přibližně 100 µl) bylo přidáno 50 µl suspenze magnetických kuliček a 40 µl isopropanolu. Směs byla promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 10 min. Magnetické kuličky s navázanou RNA byly zachyceny pomocí magnetu na dně mikrozkuhavky a několikrát promyty 70% v/v ethanolem. Po promytí a vysušení ethanolu byla RNA eluována do 32 µl vody prosté RNAsy. Koncentrace přečištěné RNA byla opět změřena na mikrospektrofotometru (BioSpec-nano). Integrita izolované RNA byla testována separací horizontální agarosovou elektroforézou: 1,1% w/v agarosa byla za horka rozpuštěna v TRIS-acetátovém-EDTA pufru (tzv. TAE pufr), 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).

#### **4.2 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.

K PCR reakci byly použity primery totožné s těmi, které byly použity pro qPCR reakci. Kit Go Taq Polymerase Green Master Mix (Promega) byl použit pro PCR reakci: 4,75 µl voda, 0,5 µl 10 µM kódující primer („forward“, zkratka F), 0,5 µl 10 µM antikódující primer („reverse“, zkratka R), 0,5 µl templátu, 6,25 µl of GoTaq® Green Master Mix 2×. Jako standard velikosti produktů na agarosovém gelu byla použita sada 50-1000 bp PCR Markers (Promega). Nastavení reakce: 95 °C - 2 min, 35×[95 °C - 40 s, 60 °C - 30 s, 72 °C - 1 min], 72 °C - 5 min, 4 °C.

### 4.3 Kvantitativní PCR

Experimenty qPCR byly provedeny s kitem Syber Select Master Mix (Life Technologies) v reakčním objemu 5 µl: 2,5 µl 2x SyberSelect<sup>®</sup> Master Mix, 0,45 µl 3,3 µM kódující primer, 0,45 µl 3,3 µM antikódující primer, 1,6 µl templátu. Pro qPCR měření byl využit přístroj CFX96 Touch<sup>™</sup> 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.

Tab. č. 5: Sekvence primerů použitých při kvantifikaci exprese daných genů.

Peptid/protein	Název genu	ID genu	Amplikon (bp)	Primer 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Odkaz
Abaecin	<i>LOC406144</i>	406144	72	F CAGCATTCGC ATACGTACCA	64,6	(Evans, 2006)
				R GACCAGGAAA CGTTGGAAAC TTTTCCTTAG	63,3	
Apidaecin typ 14	<i>Apid1*</i>	406140	80	F CAATTCTTGTT G	60,0	(Simone <i>et al.</i> , 2009)
				R GTAGGTCGAG TAGGCGGATC T	63,4	
Aktin	<i>Arp1</i>	406122	155	F TGCCAACACT GTCCTTTCTG	64,0	(Lourenço <i>et al.</i> , 2008)
				R AGAATTGACC CACCAATCCA GGAGATGCTG	64,1	
EF-1α	<i>EF1a-F2</i>	544670	153	F CCATCGTTAT	63,9	(Lourenço <i>et al.</i> , 2008)
				R CAGCAGCGTC CTTGAAAGTT	64,4	

\* alternativní jméno genu je *Apid14*

S uvedenými primery byla optimalizována metoda kvantitativní PCR (qPCR), s následnou relativní kvantifikací exprese přepočtenou na provozní geny. Primery pro gen *Apid1* jsou univerzální pro všechny tři geny apidaecinů, tedy *Api14*, *Apid22* a *Apid73*.

#### 4.4 Software použitý pro vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení získaných dat proběhlo v programu QC Expert 2.9 a SPSS verze 21. Výsledky z kvantitativního PCR byly hodnoceny softwarem výrobce přístroje Bio Rad CFX Manager. Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována v programu DataAnalysis verze 4.0 SP5. Validace provozních genů pro qPCR metodu byla provedena aplikací BestKeeper pro MS Excel (Pfaffl *et al.*, 2004). Kvantifikace relativní exprese sledovaných genů byla počítána softwarem REST<sup>®</sup> (Pfaffl *et al.*, 2002). Všechna statistická hodnocení byla provedena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

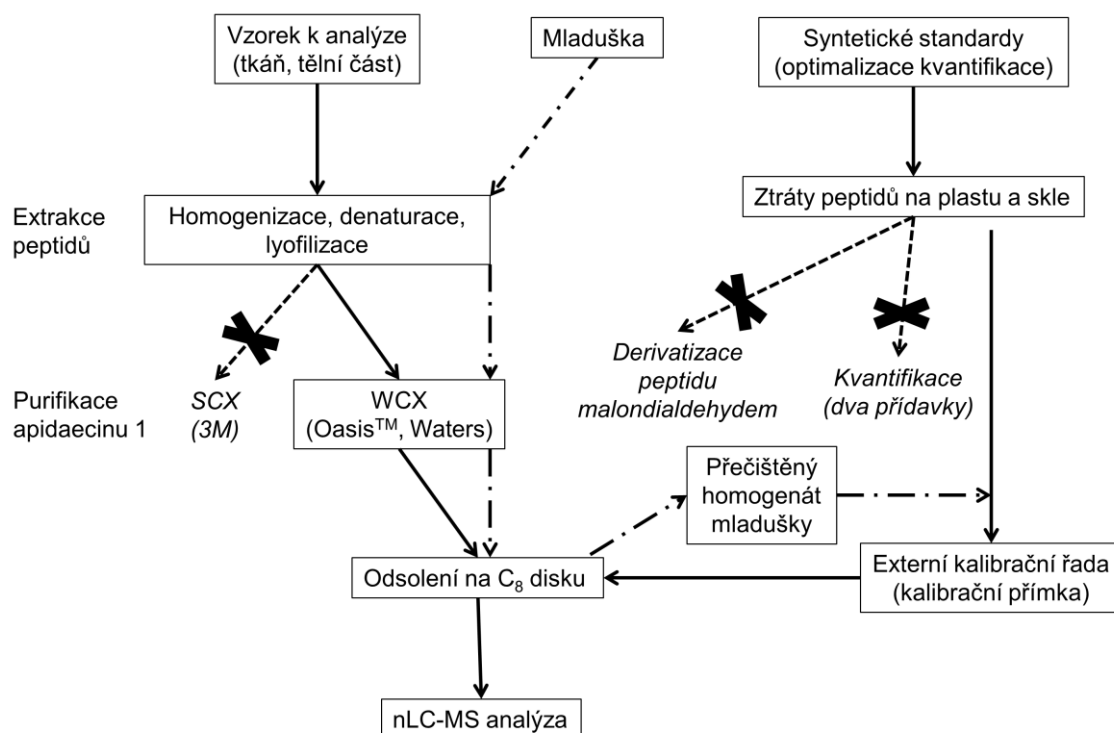
#### 4.5 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení dat byly použity testy shody středních hodnot (t-test). Při validaci nLC-MS metody byl pro 95% intervalové odhady spolehlivosti zjištěných koncentrací aplikován Hornův postup pivotů, který je určený pro malé výběry ( $4 < n < 20$ ). Při analýze rozptylu byla využita ANOVA, kterou podmiňuje normalita rozdělení testovaných hodnot. *Post hoc* analýza byla provedena Scheffeho metodou pro zjištění vzájemných rozdílů mezi testovanými skupinami (Meloun & Milítký, 2012).



## 5 Výsledky a diskuse

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. 7: Vývoj metody izolace a kvantifikace isoformem apidaecinu 1 s uvedením různých přístupů vývoje metody.

### 5.1 Stabilita syntetického standardu peptidu v roztoku

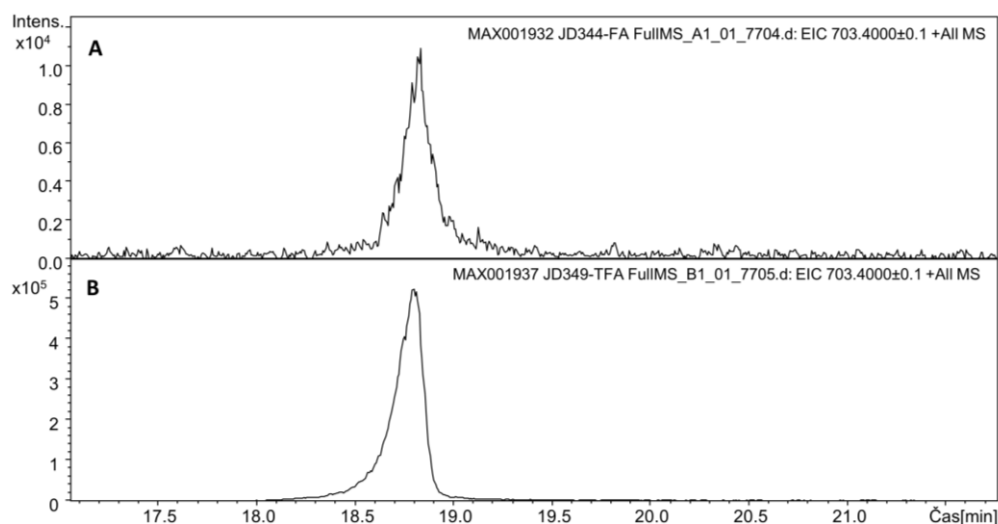
Synteticky připravený apidaecin 1A byl použit jako standard k vývoji metody pro kvantifikaci peptidu v tkáních včel. Silně bazické peptidy s obsahem argininu je velmi problematické identifikovat a kvantifikovat, protože se silně adsorbují na povrchu laboratorního skla nebo plastu a ve vzorcích s nízkou koncentrací může docházet během krátkého časového období k velkým ztrátám analytu (Foettinger *et al.*, 2006). Pro ověření kvality standardu připraveného chemickou syntézou na zakázku a současně k

o testování stability peptidu byl analyzován samotný rozpuštěný standard pomocí nLC-MS metody. Peptid byl rozpuštěn v 0,1% v/v TFA nebo 5% v/v FA a poté ověřována čistota a stabilita standardu v uvedených rozpouštědlech. Hmotnostní spektrum peptidu bylo potvrzeno na základě vypočítaných nábojových stavů apidaecinu 1.

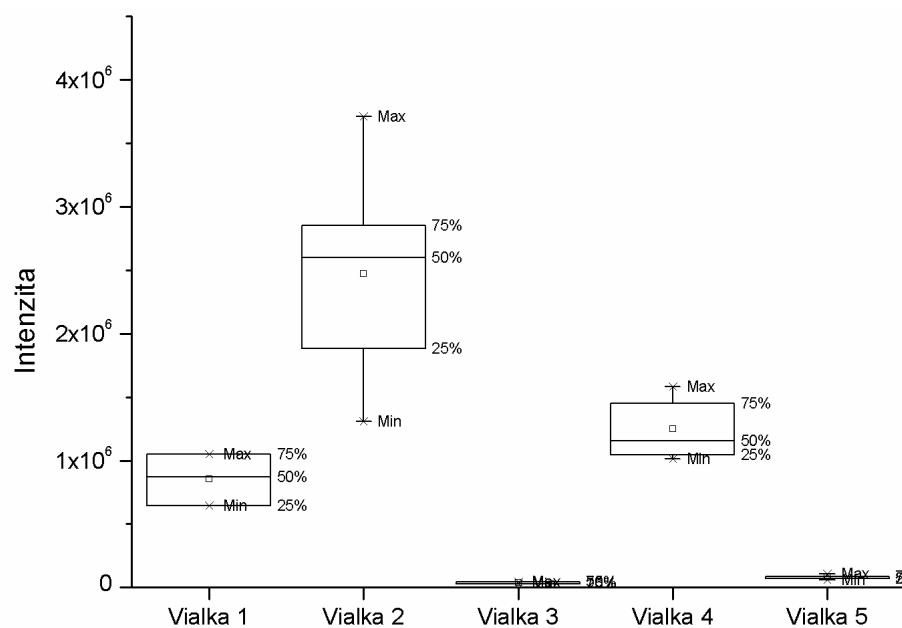
Tab. č. 6: Efektivní hmotnosti iontů apidaecinu 1 v závislosti na nábojovém stavu

Náboj	Pseudomolekulový ion	$m/z$ (teoretická)
1+	$[M+H]^+$	2108,17
2+	$[M+2H]^{2+}$	1054,59
3+	$[M+3H]^{3+}$	703,40
4+	$[M+4H]^{4+}$	527,80
5+	$[M+5H]^{5+}$	422,44

Roztok připraveného peptidu o koncentraci 33 nM byl připraven do tzv. „total recovery vials“ HPLC lahvíček (Waters, UK). Bylo zjištěno, že při rozpuštění samotného standardu peptidu v 5% FA dochází k velkým ztrátám na povrchu lahvičky, protože pozorované plochy signálů („píků“) iontů apidaecinu byly o několik řádů nižší než při použití stejné koncentrace peptidu rozpuštěného v 0,1% TFA (ukázkový chromatogram je na Obr. č. 8). Stejně tak byla pozorovatelná nereprodukovatelná intenzita signálu, která se velmi lišila mezi jednotlivými lahvičkami obsahujícími vzorek se stejnou koncentrací peptidu připravený ve stejný den provedení analýzy (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Výsledky srovnání intenzit signálů pro jednotlivé lahvičky jsou na Obr. č. 9, rozsahy intenzit (osa y) se liší o více než jeden řád.



Obr. č. 8: Porovnání ploch píku pseudomolekulárního iontu 3+ peptidu apidaecinu 1A: A – peptid byl rozpuštěný v 5% FA, intenzita signálu  $1 \times 10^4$ ; B – peptid byl rozpuštěný v 0,1% TFA, intenzita signálu  $5 \times 10^5$ .



Obr. č. 9: Srovnání intenzit iontu apidaecinu 1A  $[M+3H]^{3+}$  mezi jednotlivými lahvičkami s domněle totožnou koncentrací peptidu.

Nestálost koncentrace standardu vlivem adsorpce na povrchy komplikuje přípravu kalibrační řady pro stanovení koncentrace peptidu v reálném vzorku. Připravit kalibrační řadu roztoků v potřebném rozsahu koncentrací standardu apidaecinu 1A v 0,1% TFA nebylo možné. Jednou z možností, jak ztrátám bazických peptidů omezit, je snížení bazicity peptidu jeho chemickou derivatizací (Foettinger *et al.*, 2006). Na

základě výsledků, které publikoval Foettinger *et al.* (2006), byla pro testování zvolena metoda derivatizace s použitím malondialdehydu, která byla optimalizována pro standard apidaecinu 1A. Během reakce však docházelo ke vzniku několika produktů, čímž se tato možnost ukázala nepoužitelnou pro potřebu kvantifikace produktu. Postup a výsledky optimalizace chemické derivatizace apidaecinu 1A malondialdehydem jsou uvedeny v **Příloze 2**.

## **5.2 Optimalizace chromatografické purifikace apidaecinu 1 z komplexní matrice vzorku**

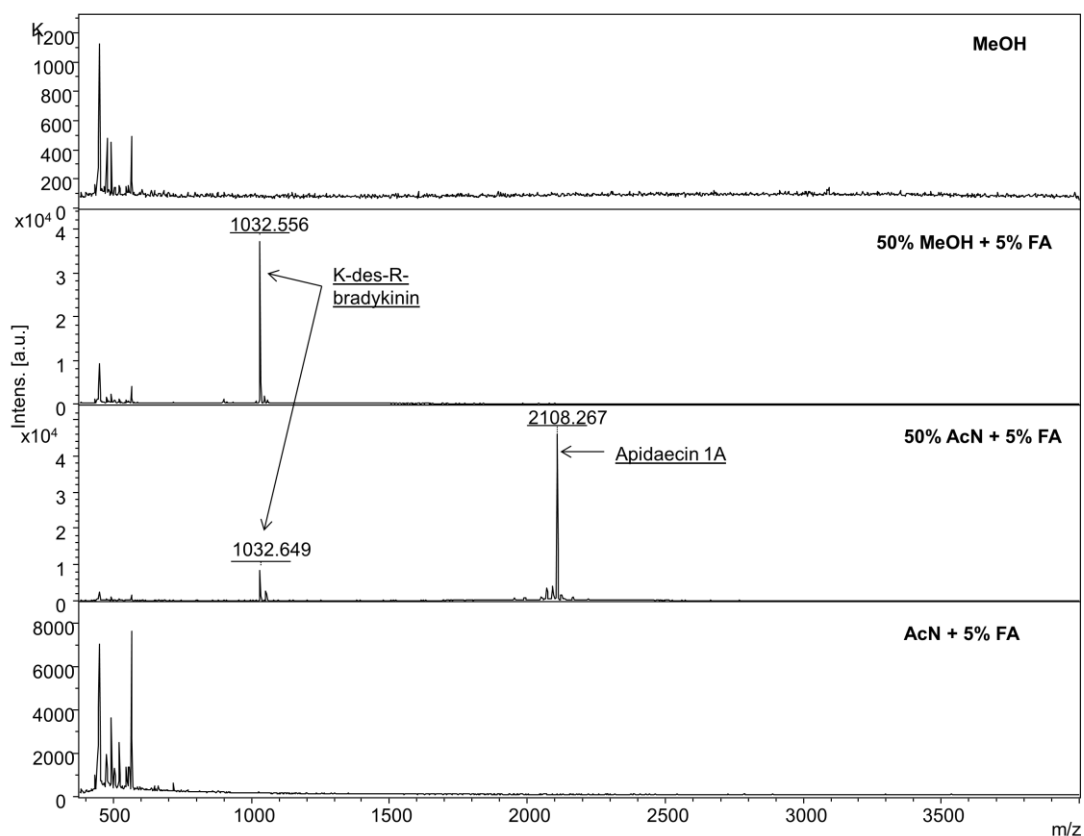
Pro iontomeničovou purifikaci apidaecinu 1 byla nejprve optimalizována metoda s použitím částí SCX extrakčních disků (3M) plněných do 200  $\mu$ l špiček (Rappsilber *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že apidaecin 1 je silně bazický peptid, který se velmi obtížně uvolňuje ze silného katexu, což dokládají i výsledky uvedené v **Příloha 3**, byla následně testována možnost použití slabého katexu. Použitý sorbent WCX Oasis<sup>TM</sup> (Waters) je částicovým sorbentem, jehož plnění je možné do SPE kolonek nebo 20  $\mu$ l GELoader špiček (Eppendorf).

### **5.2.1 Použití chromatografického sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup> pro purifikaci apidaecinu**

Pro silně bazické peptidy je výhodnější použití slabého katexu, z něhož je možné tyto látky snadněji eluovat. Pro peptid apidaecin 1 byl optimalizován postup purifikace na sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup>. Sorbent byl zakoupen ve formě SPE kolonek, které byly rozebrány a sorbent byl rozvážen a plněn do upravených plastových špiček. Sorbent lze zakoupit připravený a rozvážený v SPE kolonkách, avšak v případě analýzy tkání jednotlivých včel postačí výrazně menší množství sorbentu plněného nejlépe v jednorázových kolonkách, aby bylo zabráněno přenosu analytu mezi vzorky. Inspirací pro přípravu a technické provedení purifikace apidaecinu 1 z tkání byla publikace Rappsilber *et al.* (2007), kde použili části extrakčních disků přímo ve špičkách. V případě purifikace apidaecinu 1 byla nejprve zkoušena možnost použití 200  $\mu$ l špiček, kde je však nutno použít fritu, aby nedošlo k úniku sorbentu ze špičky. Jako frity byly použity části membránových disků C<sub>8</sub> Empore. Ty jsou kompatibilní s provedením purifikace na WCX sorbentu, protože se k eluci používá okyselená organická mobilní fáze, kdy by nemělo docházet k zachytu peptidu na reverzní fázi C<sub>8</sub> sorbentu. Bohužel v tomto uspořádání docházelo k častému ucpávání kolon při purifikaci homogenátů

včel, proto bylo technické uspořádání upraveno tak, že 200 µl špičky byly nahrazeny tenčími 20µl GELoader špičkami (Eppendorf), které lze na konci zploštit pinzetou. Zmáčknutí konce špičky zabrání úniku sorbentu a současně purifikaci nekomplikuje materiál z C<sub>8</sub> disků náchylný k ucpávání. Postup purifikace apidaecinu 1 byl tedy dále optimalizován v jednorázových kolonkách připravených z GELoader špiček a WCX sorbentu. Kolonky byly vkládány do plastových mikrozkušavek s otvorem ve víčku. Zdrojem síly protlačující mobilní fáze nebo vzorky přes sorbent byla odstředivá síla vytvořená během centrifugace. Využití centrifugy usnadnilo průtok mobilní fáze přes kolonku a také umožnilo celý postup purifikace zrychlit, neboť počet přečištěných vzorků v jednom kroku je limitován počtem pozic v rotoru centrifugy. Purifikace na použitém sorbentu navíc není narušena vyschnutím sorbentu během purifikačního postupu, na rozdíl od jiných na trhu dostupných ionexových sorbentů (Nováková & Vlčková, 2009).

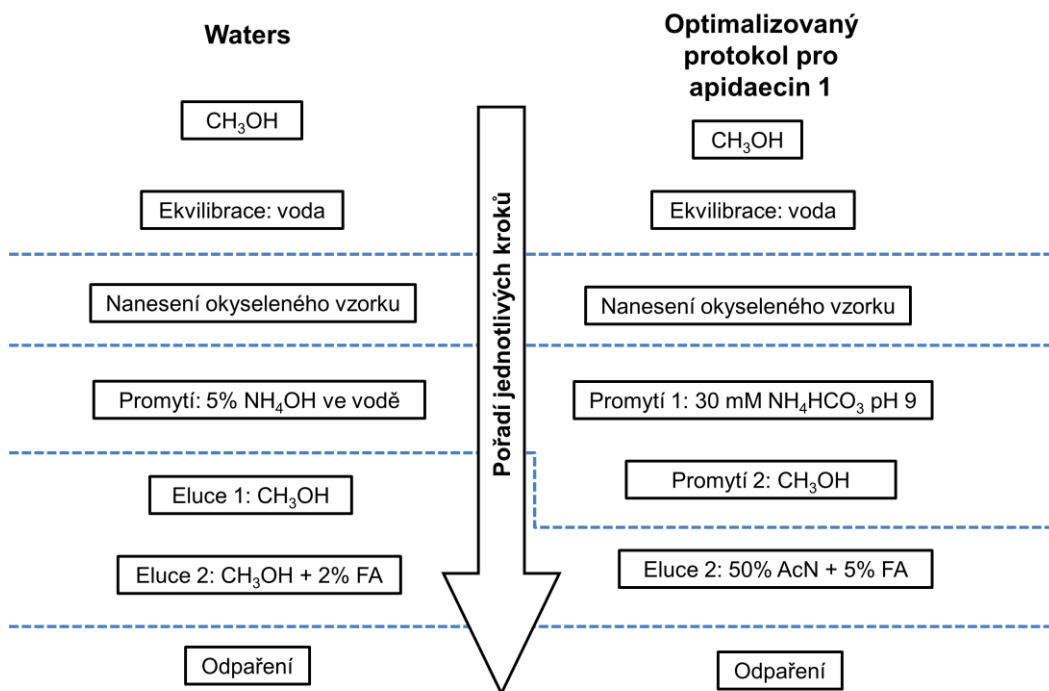
Použité složení roztoků pro purifikaci apidaecinu 1 vychází z postupu navrženého výrobcem (Waters, 2005). Funkční skupiny sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup> jsou karboxylové, což zajišťuje výměnu iontů, zároveň sorbent díky obsahu hydrofobních částí částečně pracuje na principu chromatografie na obrácené fázi. Postup purifikace navržený výrobcem musel být modifikován, protože nedocházelo k eluci apidaecinu 1 ze sorbentu. V první kroku promytí vzorku je odmyta většina peptidů s hodnotou isoelektrického bodu nižší než 9 a v dalším kroku jsou odstraněny látky zachycené na základě hydrofobních interakcí. Při vývoji metody byl zkoušen eluční roztok 50% MeOH + 5% FA, avšak pro eluci apidaecinu 1 nemá dostatečnou eluční sílu (Obr. č. 10). Ke kvantitativní eluci apidaecinu 1 je tedy nutné použít 50% AcN + 5% FA. V tomto optimalizačním kroku byl použit jak syntetický apidaecin 1A, tak i syntetický peptid K-des-R-bradykinin, který není pro včely fyziologický, má však podobné chemické vlastnosti (viz. Tab. č. 2) jako apidaecin 1. Tento peptid byl použit pouze pro ilustraci elučního chování apidaecinu 1. Ačkoliv se tento peptid eluuje z WCX Oasis<sup>TM</sup> sorbentu i při použití 50% MeOH s 5% FA, k eluci apidaecinu 1 nedochází (Obr. č. 10).



Obr. č. 10: Hmotnostní spektrum jednotlivých frakcí eluce standardu isoformy apidaecinu 1A a K-des-R-bradykininu ze sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup>.

Na 2 mg sorbentu bylo nanášeno 25 pmol každého standardu (50 ng apidaecinu 1A; 25 ng K-des-R-bradykininu). Každá frakce byla eluována  $2 \times 50 \mu\text{l}$ , odpařena na vakuové odparce, rozpuštěna v  $10 \mu\text{l}$  0,1% TFA a nanášena na MALDI destičku v množství  $0,6 \mu\text{l}$  vzorku a  $0,6 \mu\text{l}$  matrice CHCA.

Při dalším vývoji protokolu bylo testováno, zda k eluci apidaecinu 1A z kolonky postačí eluce dvakrát  $50 \mu\text{l}$  50% AcN s 5% FA. Apidaecin 1A byl obsažen v první eluované frakci, při druhém a třetím nanášení  $50 \mu\text{l}$  50% AcN s 5% FA se již ze sorbentu žádný apidaecin neuvolňoval. Eluce dvěma dávkami po  $50 \mu\text{l}$  by tedy měla být dostatečná pro kvantitativní uvolnění analytu. Postupné zvyšování eluční síly až na čistý AcN s 5% FA také nevedlo k další eluci peptidu (Obr. č. 10).

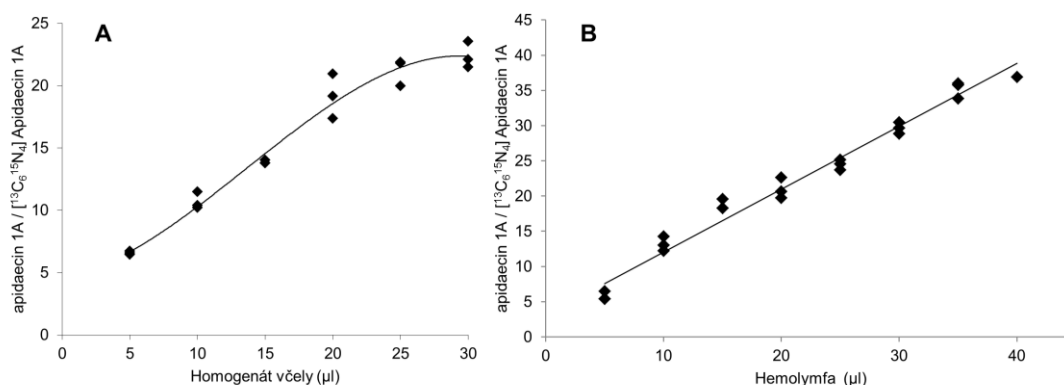


Obr. č. 11: Porovnání doporučeného a optimalizovaného purifikačního postupu silně bazických látek na sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup>; upraveno dle (Waters, 2005).

### 5.3 Kvantifikace hladiny peptidu metodou nLC-MS

#### 5.3.1 Stanovení kapacity sorbentu pro analýzu isoform apidaecinu 1

Pro vzorky homogenátů včel a hemolymfy bylo používáno 5 mg WCX Oasis<sup>TM</sup> sorbentu na jednu purifikační kolonku. Kapacita kolonky byla testována pro hemolymfu i homogenáty včel. Homogenát včel je ve srovnání s hemolymfou mnohem složitější matrice, protože obsahuje extrakt mnoha tkání, včetně trávicího traktu, kde se nacházejí zbytky strávené i nestrávené potravy původem z pylu a medu.



Obr. č. 12: Stanovení kapacity kolonky obsahující 5 mg sorbentu WCX Oasis<sup>TM</sup> při purifikaci homogenátu včely (A) nebo hemolymfy (B).

Ze včel bylo odebráno 2,5  $\mu\text{l}$  hemolymfy, která byla srážena přidávkem 0,1% TFA a ošetřena varem, následně centrifugována ( $15000 \times g$ , 10 min) a supernatant byl lyofilizován. Poté byla částečně zpracovaná hemolymfa opět rozpuštěna ve 100  $\mu\text{l}$  5% FA a nanášena na WCX kolonku. Obsah proteinů ve vzorku zpracované a naředěné hemolymfy nanášené na WCX sorbent byl 0,28  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 95% konfidenční intervaly (CI): 0,22  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,34  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $n = 28$ , což odpovídá koncentraci proteinů v odebrané hemolymfě 11,28  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (95% CI: 8,69  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 13,53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $n = 28$ ). Naproti tomu koncentrace proteinů ve zpracovaném homogenátu mladušky nanášeném na WCX je 1,14  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Hornův postup pivotů pro malé výběry: dolní pivot  $x_D = 0,98 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , horní pivot  $x_H = 1,28 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $n = 10$ ). Při nanesení 25  $\mu\text{l}$  homogenátu včely je téměř dosažena kapacita kolonky odpovídající přibližně 28,5  $\mu\text{g}$  proteinů, protože dochází k ohybu regresní křivky poměru apidaecinu 1A k  $[^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4]$  apidaecinu 1A použitého jako interní standard (Obr. č. 12). Kapacita kolonky ovšem může být snížena v důsledku obsahu bazických nízkomolekulárních látek obsažených v tkáních včel, např. v trávicím traktu.

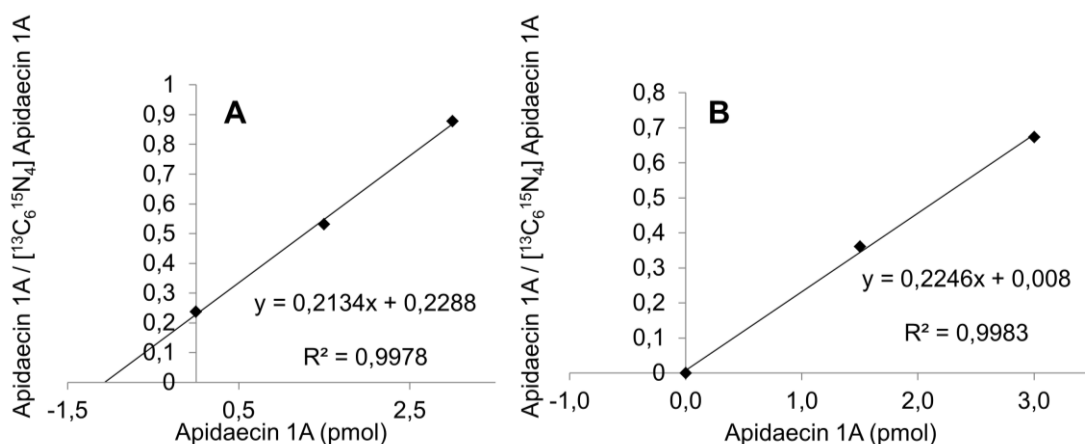
### 5.3.2 Kvantifikace isoform apidaecinu 1 metodou dvou standardních přidavků

Kvantitativní hmotnostní spektrometrie využívá isotopově značených interních standardů pro kontrolu úspěšnosti purifikace a kvality analýzy. Interní standard (IS) kompenzuje náhodné i systematické chyby, matricové efekty, a normalizuje signál samotného analytu (Villanueva *et al.*, 2014). Jako IS byl připraven chemickou syntézou  $[^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4]$  apidaecin 1A značený na argininu 17.

Jelikož je problematické připravit kalibrační řadu obsahující standard apidaecinu 1 a značený IS v samotném rozpouštědle, např. v 0,1% TFA dochází ke ztrátám



standardu na povrchu skla (Obr. č. 9), byla ověřována možnost kvantifikace peptidu metodou dvou standardních přídavek. Vzorek byl rozdělen na tři alikvoty, do každého z nich bylo přidáno stejné látkové množství značeného IS a do dvou alikvotů rozdílné látkové množství neznačeného peptidu. Vzorky byly následně přečištěny přes WCX sorbent, odsoleny na C<sub>8</sub> Stage Tip a analyzovány na nLC-MS systému. Extrapolací regresní přímky zjištěné metodou nejmenších čtverců lze zjistit vztah mezi koncentrací peptidu ve vzorku a poměrem přidávaných množství neznačeného a značeného standardu. Pokud regresní přímka prochází počátkem, analyt se v daném vzorku nenachází. Během optimalizace a validace metody bylo zjištěno, že čerstvě vylíhnuté včely (mladušky) apidaecin 1 neobsahují nebo jeho koncentrace je natolik nízká, že při daném purifikačním postupu a detekci se nachází pod limitem detekce i kvantifikace.



Obr. č. 13: Kvantifikace peptidu metodou dvou standardních přídavek. A – stanovení apidaecinu 1 v těle létavky, B – stanovení apidaecinu 1 v těle čerstvě vylíhnuté včely (mladušky).  $R^2$  - koeficient determinace

Jelikož ve vzorcích mladušek (čerstvě vylíhnutých včel) nebyl detegován apidaecin 1, byla ověřována možnost použít přečištěný homogenát mladušek jako matrici pro rozpuštění standardů při přípravě externí kalibrační řady.

### 5.3.3 Kvantifikace isoforem apidaecinu 1 metodou kalibrační přímky

Prosté rozpuštění standardů peptidu a IS v 0,1% TFA vede ke ztrátám na povrchu laboratorního skla a plastu. Rozpuštění apidaecinu 1 v 0,1% TFA obsahující volný arginin nebo digest hovězího sérového albuminu (BSA) nevedlo k zabránění ztrátám peptidu při přípravě kalibrační řady. Zvláště u malých koncentrací docházelo k výraznému poklesu signálu na detektoru v řádu několika minut od přípravy vzorku. Na základě zjištění, že mladušky včel neobsahují detekovatelné množství endogenního

apidaecinu 1, byla ověřována možnost použití homogenátů mladušek jako matrice pro rozpuštění standardů pro přípravu kalibrační řady ke kvantifikaci apidaecinu 1 v reálných vzorcích včel.

Homogenát mladušky byl přečištěn na WCX sorbentu, odsolen na C<sub>8</sub> disku stejně jako vzorek určen k analýze a následně znova rozpuštěn. Do takto přečištěné bazické frakce homogenátu byla připravena kalibrační řada obsahující konstantní množství IS a rostoucí množství syntetického peptidu. 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. U připravených kalibračních řad byla pozorována lineární závislost mezi koncentrací peptidu a intenzitou signálu (Tab. č. 7).

Tab. č. 7: Porovnání parametrů zjištěných kalibračních přímek připravených v různém čase. Každý bod kalibrace byl připraven dvakrát a dvakrát změřen.

Měření	Rozsah (pmol)	Interval směrnice (L <sub>D</sub> -L <sub>H</sub> )	Interval úseku (L <sub>D</sub> -L <sub>H</sub> )	Korelační koeficient	Počet bodů kalibrace
1	0.1 - 5.0	1.164 - 1.224	0.013 - 0.142	0.999	7
2	0.1 - 5.0	1.053 - 1.085	-0.028 - 0.038	0.999	7
3	0.25 - 5.0	0.926 - 1.067	0.073 - 0.463	0.992	4

#### 5.4 Hodnocení návratnosti metody purifikace

Návratnost metody purifikace byla hodnocena jednak na základě výpočtu poměru ploch píků standardu přidaného před a po purifikaci, ale i s přepočtem návratnosti na známé množství přidaného interního standardu. Bylo provedeno hodnocení vlivu IS na plochu signálu apidaecinu 1A. Apidaecin 1A byl v různých poměrech smíchán s IS v homogenátu včel před purifikací (Tab. č. 8), následně byl biologický vzorek spolu s přidanými standardy purifikován na WCX sorbentu, odsolen na C<sub>8</sub> Stage Tip a analyzován na nLC-MS. Měření bylo provedeno se dvěma nezávislými vzorky, každý roztok z celkem 9 testovaných poměrů apidaecinu 1A a IS byl připraven v technickém duplikátu.

Tab. č. 8: Poměry apidaecinu k IS přidanému do vzorku před WCX purifikací ke zjištění vlivu obsahu IS a analytu na návratnost metody purifikace.

IS (pmol)	Apidaecin 1A (pmol)		
	0,5	1	2,5
0,5	1	2	5
1	0,5	1	2,5
2,5	0,2	0,4	1

Bylo zjištěno, že množství přidaného IS neovlivňuje velikost plochy píku apidaecinu 1A (dvoufaktorová ANOVA, nevyvážená,  $p = 0,254$ ). Současně přídavek apidaecinu 1A neovlivňuje velikost plochy píku IS (dvoufaktorová ANOVA, nevyvážená,  $p = 0,167$ ). Koncentrace analytu po purifikaci a odsolení byla normalizována vzhledem k použité koncentraci interního standardu podle následujícího vzorce:

$$\text{Koncentrace(WCX)} = \text{Koncentrace(nLC)} \times \frac{\text{Apidaecin 1A (nLC)}}{[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4] \text{ Apidaecin 1A(nLC)}} \times \frac{[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4] \text{ Apidaecin 1A(WCX)}}{\text{Apidaecin 1A(WCX)}}$$

- Koncentrace (WCX) – vypočtená koncentrace peptidu
- Koncentrace (nLC) – koncentrace peptidu při 100% návratnosti
- Apidaecin 1A (nLC) – plocha píku po nLC separaci (bez ionexové purifikace)
- $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]$  Apidaecin 1A (nLC) - plocha píku po nLC separaci (bez ionexové purifikace)
- Apidaecin (WCX) - plocha píku po WCX purifikaci a nLC separaci
- $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]$  Apidaecin 1A (WCX) - plocha píku po WCX purifikaci a nLC separaci

Vypočítaná návratnost apidaecinu 1A po normalizaci výpočtu koncentrace peptidu není ovlivněna přídavkem interního standardu (dvoufaktorová ANOVA,  $p = 0,118$ ), na druhou stranu návratnost je ovlivněna množstvím přidaného analytu (dvoufaktorová ANOVA,  $p = 0,001$ ). Zvýšené množství analytu ve vzorku tedy může vést k návratnosti přesahující 100%. Opačný trend popisuje Sato *et al.* (2008), který popisuje vyšší návratnost WCX purifikace bazických drog s využití SPE kolon u nižších koncentrací analytu. 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  $100 \pm 7,1\%$ .

#### 5.4.1 Validace metody

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. Uvedené množství syntetického standardu bylo přečištěno spolu s biologickou matricí (hemolymfa nebo homogenát mladušky) a následně přečištěno optimalizovaným protokolem.

Tab. č. 9: Testování správnosti stanovení standardu apidaecinu 1A intervalem spolehlivosti (Hornův postup pivotů).

Apidaecin 1A	0,1 pmol	0,2 pmol	1,0 pmol	1,0 pmol*	2,0 pmol
Počet měření	11	9	14	6	4
Stanovované množství (pmol)	0,108	0,215	1,025	1,04	1,963
Interval spolehlivosti	0,088 - 0,128	0,188 – 0,242	0,967 – 1,083	0,994- 1,0856	1,833 – 2,094
Odpovídající koncentrace v hemolymfě (ng/μl)	0,84	1,69	8,43		16,69
Odpovídající množství v homogenátu hrudníku (ng)	2,11	4,21	21,07	21,07	42,14

\* stanovováno v homogenátu celé včely použité jaké matrice

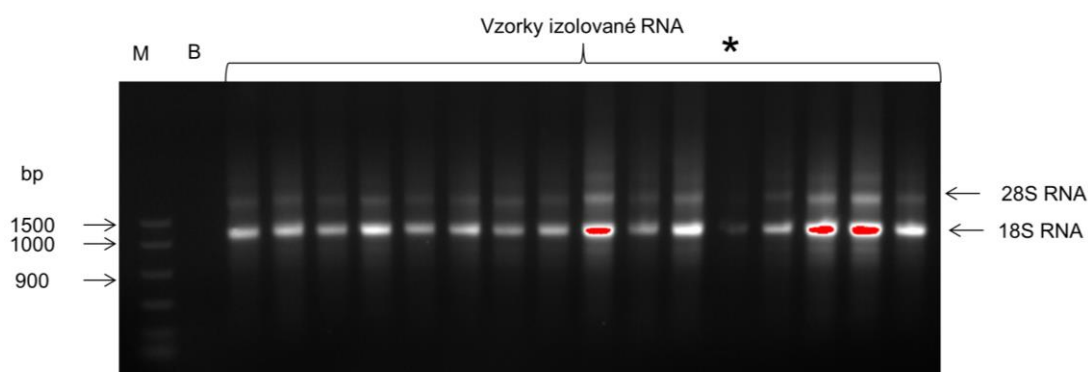
Dle Tab. č. 9 je patrné, že stanovované množství syntetického standardu apidaecinu přidaného k biologickému vzorku vede ke správnému stanovení, protože stanovované množství se nachází ve vypočteném intervalu spolehlivosti.

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 (Tab. č. 9), nižší hodnoty nevyhovují podmínce správnosti stanovení na hladině  $\alpha = 0,05$ .

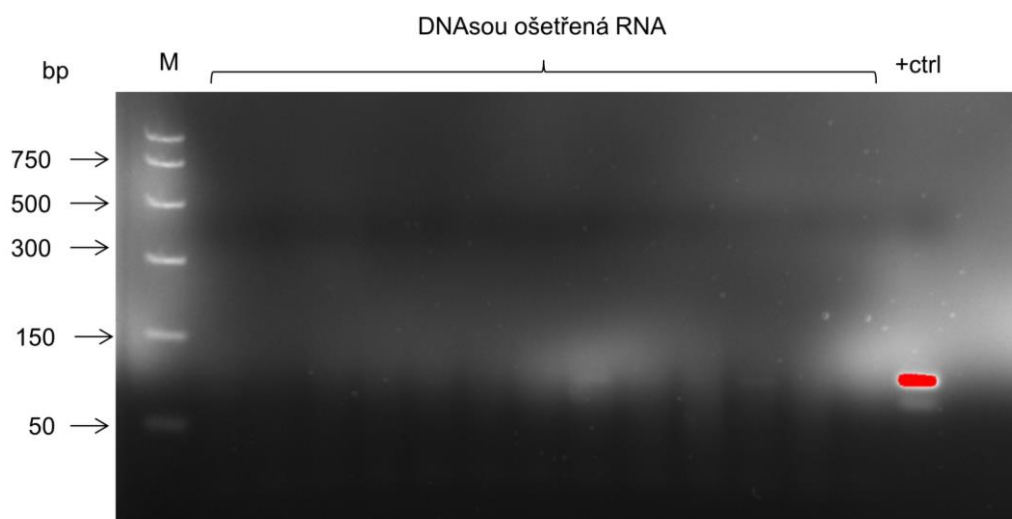
Metoda zahrnující přípravu a zpracování vzorku, purifikaci apidaecinu 1, jeho detekci a kvantifikaci byla úspěšně vyvinuta a otestována. Metoda je vysoce citlivá, neboť umožňuje měřit hladiny apidaecinu 1 v hemolymfě nebo hrudnicích dospělých včel. Isoformy apidaecinu 1A a 1B jsou isobarické, za daných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

## 6 Optimalizace měření exprese genů peptidů abaecinu a isoforem apidaecinu

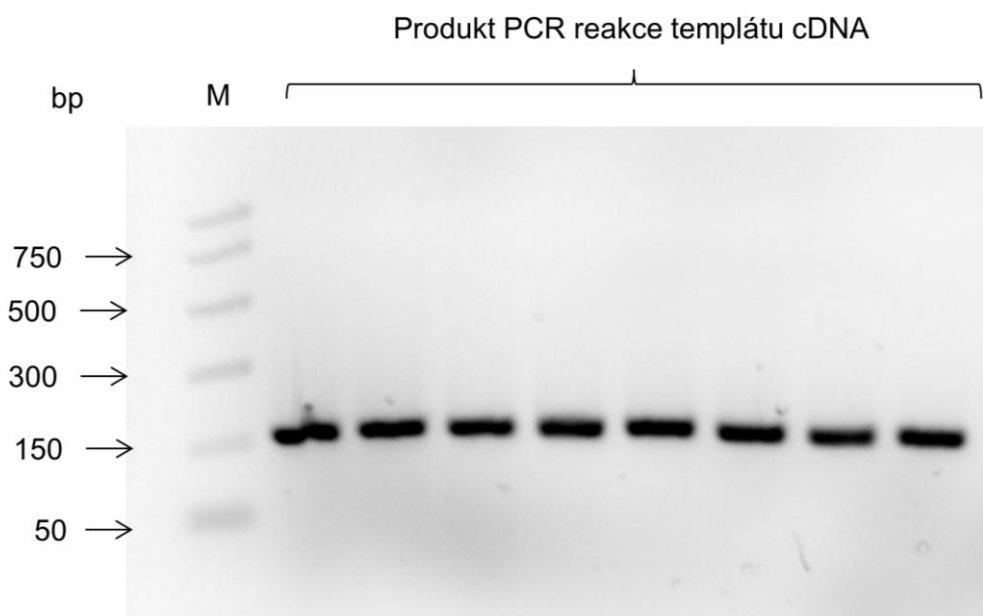
Metoda měření exprese genů kódujících apidaecin a abaecin byla zavedena pro rozšíření sledování změn parametrů imunitního systému včel. Exprese byla sledována v celých tělech včel nebo tělních částech, např. zadeček včely. Před zpracováním byly vzorky včel skladovány při -80 °C. Izolace celkové RNA byla provedena po předchozím rozmělnění tkání v kuličkovém mlýnku. Stanovení koncentrace a čistoty izolovaného vzorku byla provedena spektrofotometricky. Integrita RNA byla sledována separací vzorku na 1,1% w/v agarosovém gelu (Obr. č. 14). Izolovaná RNA byla ošetřena DNAsou, aby bylo zabráněno replikaci genomové DNA během PCR reakce. Přechištěná RNA byla přepsána do cDNA. Pomocí PCR reakce byla kontrolována kvalita ošetření DNAsou i prepis do cDNA. Výsledný produkt reakce byl detegován na 3% w/v agarosovém gelu (Obr. č. 16).



Obr. č. 14: Kontrola integrity izolované RNA vyhodnocená pomocí pásů 18S a 28S RNA. M – marker, B – blank, \* degradovaný vzorek.



Obr. č. 15: Produkt PCR amplifikace pro genu kódujícího apidaeciny ze vzorku RNA po ošetření DNAsou. Nepřítomnost pásu signalizuje správné ošetření vzorku, M – marker, +ctrl - pozitivní kontrola.



Obr. č. 16: Kontrola přepisu RNA do cDNA sledováním vzniku PCR produktu genu kódujícího aktin z cDNA templátu.

### 6.1.1 Validace primerů pro provozní geny

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 $\alpha$  (NM\_001014993) (Lourenço *et al.*, 2008). Vhodnost použití těchto provozních genů byla ověřována softwarem BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Na základě porovnání hodnot C<sub>q</sub> (hodnota, při níž dochází k nárůstu fluorescence nad práh šumu) provozních

genů pro vzorky cDNA ze zpracovaných zadeček včel bylo zjištěno, že hodnoty Cq 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 $\alpha$  a  $P = 0,94$  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.

Tab. č. 10: Výsledek regresní analýzy provozních genů pro EF-1 $\alpha$  a aktin pomocí aplikace BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Výsledky jsou vyhodnocením 81 PCR reakcí (triplikáty sloučeny v jednu reakci) cDNA připravených z 81 vzorků zadeček včel.

<i>Regresní analýza: HKG vs. BestKeeper</i>		
	EF- $\alpha$ HKG* 1	Aktin HKG* 2
	vs. BK**	vs. BK**
korelační koeficient [R]	0,92	0,94
koeficient determinace [R <sup>2</sup> ]	0,84	0,88
úsek [CP]	1,49	-1,48
směrnice [CP]	0,92	1,08
standardní chyba [CP]	$\pm 0.301$	$\pm 0.303$
p-hodnota	0,001	0,001
Účinnost of HKG [x-fold]	1,91	2,12

\* provozní gen, \*\* BestKeeper

### 6.1.2 Testování primerů pro sledované geny abaecinu a isoformy apidaecinu

Casteels-Josson *et al.* (1993) publikovali analýzu cDNA knihovny pre-proteinů apidaecinu 14 (gen *apid14*, ID 406140), apidaecinu 22 (gen *apid22*, ID 494510) a apidaecinu 73 (gen *apid73*, ID 406115). Cílem optimalizace měření exprese genů pro apidaeciny bylo rozlišit jednotlivé varianty genů *Apid14*, *Apid22* a *Apid73*.

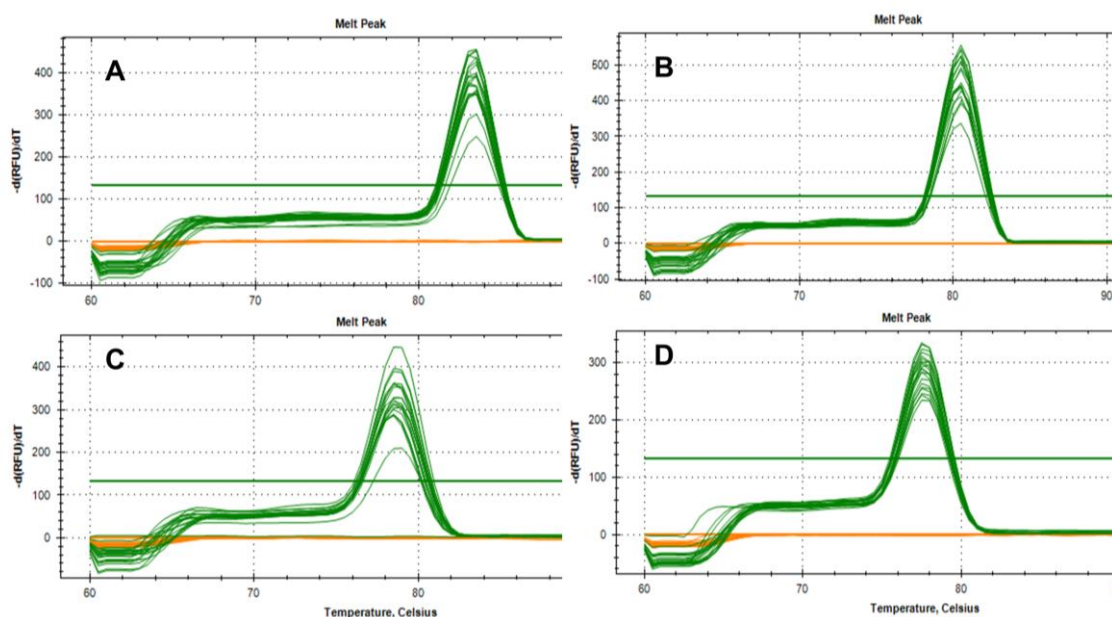
K rozlišení exprese genů byly navrženy primery pomocí softwaru MU Primer schopné rozlišit výsledné produkty tak, aby vzniklé amplikony disociovaly při různých teplotách ( $T_m$ ). Tím by se staly rozlišitelné, a bylo by tak možné expresi genů *Apid14*, *Apid22* a *Apid73*. V nukleotidové sekvenci cDNA variant genů se opakují sekvenční motivy, a proto docházelo k vázání primerů i do jiných než zamýšlených míst Obr. č. 24. V sekvenci neexistuje místo odlišující se ve všech třech genech. PCR s navrženými primery tak vedla k několika směsným produktům **Příloha 4**.



Testováním jednotlivých primerů cílených pro gen kódující apidaeciny převzatých z literatury bylo zjištěno, že primer z publikace Evans (2006) nevede k žádnému produktu. Primery pro peptid abaecin byly použity z 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 amplicon PCR (**Příloha 4**), který reprezentuje sumární expresi genů apidaecinů.

Gen *Apid14* má alternativní název *Apid1*, který bude používán v dalším textu. Měření exprese genu *Apid1* reprezentuje sumu exprese pro všechny tři varianty genů apidaecinů.

Při použití uvedených primerů v qPCR reakci vzniká pouze jeden produkt, což lze doložit jak na gelu (**Příloha 4**), tak i pomocí křivek tání (Obr. č. 17).



Obr. č. 17: Disociační teploty ( $T_m$ ) ampliconu qPCR reakce provedené s primery použitými pro relativní kvantifikaci exprese. A: *EF1a-F2*; B: *Arp1* (gen kódující aktin); C: *LOC4006144* (gen kódující abaecin); D: *Apid1* (gen kódující preprotein apidaecinu 14); zkratky a čísla genů, viz. **Tab. č. 5**.

Během optimalizace měření exprese byla stanovena účinnost jednotlivých primerů použitých pro měření. Měřeno bylo provedeno na několika nezávislých vzorcích jednotlivých zadeček včel.

Tab. č. 11: Účinnost jednotlivých primerů stanovena z různých měření (Hornův postup pivotů pro malé výběry). Účinnost primerů se vzájemně neliší (ANOVA,  $p = 0,185$ ).

	<i>Arp1</i>	<i>EF1a-F2</i>	<i>Apid1</i>	<i>LOC4006144</i>
Počet měření	5	5	5	5
Střední hodnota	2,03	2,02	2,08	2,00
Interval spolehlivosti	1,95 - 2,11	1,98 - 2,06	1,89 - 2,26	1,92 - 2,08
Pivotové rozpětí	0,04	0,02	0,09	0,04

Pro měření exprese genů pro apidaeciny a abaecin byl optimalizován postup izolace celkové RNA, přepis do cDNA, kontrola kvality a úspěšnosti jednotlivých kroků a následně i metoda qPCR s využitím primerů publikovaných v literatuře ale přesto znova otestovanými, protože provozní geny nebyly validovány pro sledovanou tělní část (zadečky včel).

## 7 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 touto potravou: pouze 50% sacharosou (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%). Složení pylových rousek bylo zjištěno palynografickou analýzou na pracovišti AGES – SPB, Abteilung, Bienenkunde und Bienenschutz, Lunz am See, Rakousko. Jednotlivé skupiny pylu byly před podáním včelám homogenizovány a bylo z nich vytvořeno „těsto“, které bylo plněno do 10 ml plastových mikrozskumavek. Včely byly drženy v inkubátoru za standardních podmínek po dobu 18 dní. (Williams *et al.*, 2013).



Obr. č. 18: Klíčky se včelami v inkubátoru v průběhu experimentu.

Po ukončení experimentu byly pokusné včely zmrazeny při -80 °C, za této teploty byly vzorky uchovány do jejich zpracování pro nLC-MS a qPCR analýzu. 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, a proto byla pro měření exprese genů pro apidaeciny a abaecin vybrána právě zadečková část včel a hrudník pro stanovení koncentrace aktivních isoform apidaecinu 1.

## **7.1 Výsledky sledování obsahu isoform apidaecinu 1 v tkáních včel a relativní kvantifikace exprese genů pro apidaeciny a abaecin**

Pyl je pro včely zdrojem proteinů a tuků, které jsou nezbytné pro rozvoj včelstva. Nutriční kvalita pylu se však liší mezi jednotlivými rostlinami, z nichž pochází. Rozdíly byly nalezeny v obsahu proteinů, tuků, cukrů, aminokyselin ale i v antioxidační kapacitě (Di Pasquale *et al.*, 2013). Špatná či nedostatečná výživa může vést k jeho slábnutí včelstva a případně až i jeho úhynu (Brodschneider & Crailsheim, 2010). Vliv výživy na včelí imunitní systém je sledován i v závislosti na úspěšnosti zimování včelstev. Wheeler & Robinson (2014) popisují ovlivnění exprese mnoha genů v tukovém tělese dospělých včel jako reakci na krmení medem, cukrem nebo kukuřičným cukerným sirupem. Imunokompetenci včel lze sledovat měřením genové exprese jednotlivých parametrů humorálního imunitního systému nebo přímo měřením jejich aktivity či koncentrace. Hladiny isoform apidaecinu 1 však dosud nebyly zjišťovány v tkáních jednotlivých včel. Optimalizované metody kvantifikace isoform apidaecinu 1 pomocí nLC-MS a relativní exprese genů pro apidaeciny a abaecin metodou qPCR byly využity pro sledování vlivu výživy na imunokompetenci jednotlivých včel.

Výsledky poukazují na 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. Rozdíly v hladině isoform apidaecinu 1 se liší i mezi jednotlivými skupinami včel krmenými proteinovou výživou. Skupina krmená pylem slunečnice má vyšší koncentraci peptidu než skupina krmená pylem *Castanea sativa* nebo pylem rostlin rodu *Asparagus*.

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 roku *Castanea* nebo *Asparagus*. Zjištěné výsledky indikují, že výživa může ovlivnit parametry humorálního imunitního systému na úrovni exprese genů i samotné množství efektorového AmP v tkáních. Podrobné výsledky a diskuse jsou uvedeny v přiloženém rukopisu článku v **Příloha 7**.

## 7.2 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 do 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 (**Příloha 5**), druhý článek byl určen odborné veterinární a včelařské veřejnosti a byl publikován v českém recenzovaném časopise Veterinářství název článku: Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel (**Příloha 6**).

Tato práce se zaměřuje na kvantifikaci množství antimikrobiálního peptidu apidaecinu 1 ve tkáních včel. Práci s tímto peptidem silně komplikuje jeho vysoká bazicita a rychlé ztráty 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 (**Příloha 1**), článek nese název „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), prepis do cDNA a samotnou qPCR reakci pro stanovení relativní exprese. Primery použité pro reakci byly převzaty z literatury. Primery pro provozní geny (*Arp1*, *EF1a-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 v připravovaném rukopisu odborného článku, viz. Příloha 7: Does the pollen diet influence the expression and production of antimicrobial peptides in honey bee body parts?

“

## 8 Životopis

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

Mateřský jazyk: český

Mobil: +420 724 758 774

Telefon: +420 585 63 4931

E-mail: [jiri.danihlik@upol.cz](mailto:jiri.danihlik@upol.cz); [j.danihlik@gmail.com](mailto:j.danihlik@gmail.com)

Státní příslušnost: ČR

### 8.1 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)

### 8.2 Zahraniční stáže

- 1) 2012 únor - březen (4 týdny) stáž na Sveriges Lantbruksuniversitet v Uppsale, Švédsko pracoviště Dr. Joachima de Mirandy – PCR metody detekce včelích viróz
- 2) 2013 únor – duben (8 týdnů) stáž na Lund Univesity, Medical Microbiology, Švédsko 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



### 8.3 Pracovní zkušenosti

Leden 2012 až dnes – PhD student oboru Biochemie, zaměstnání Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc.

### 8.4 Projekty

- 1) Phytochem, CZ.1.07/2.2.00/28.0171 – Příprava laboratorních experimentů a materiálů pro předmět Experimentální metody obranné reakce rostlin.
- 2) Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů, CZ.1.07/1.1.00/14.0016 - expert, technický pracovník, organizátor konference
- 3) E-learningová podpora praktické výuky biochemie a imunologie, CZ.1.07/2.2.00/15.0271 zpracování dotazníkového šetření k hodnocení projektu
- 4) BioLink, CZ.1.07/2.4.00/17.0007 – expert workshopů
- 5) WinLoss, 69p11, AKTION Česká republika - Rakousko – člen realizačního týmu
- 6) Ztráty včelstev v Rakousku a České republice a vztah k imunitnímu systému včel, 71p6, AKTION Česká republika – Rakousko, hlavní řešitel
- 7) PřF2015\_026: Studium metabolismu, modifikací a funkcí proteinů a peptidů jako důležitých modulátorů signálních drah a regulátorů vývoje rostlin, markerů poškození orgánů živočichů a biomolekul s antimikrobiální funkcí, hlavní řešitel
- 8) NPU I, LO1204, Udržitelný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná, (2014-2018)
- 9) CZ.1.05./2.1.00/01.0007, OpVaVpI projekt Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum

### 8.5 Pedagogická činnost

- vedení bakalářské práce Silvie Dostálkové, téma: Testování antimikrobiální aktivity peptidů, obhájeno 2014
- vedení SOČ Kateřiny Bayerové, téma: Schopnost reprodukce kleštíka včelího v dělničím a trubčím plodu včely medonosné, obhájeno 2014, 8. místo v celostátním kole SOČ

- vedení SOČ Barbory Šmucrové, téma: Antimikrobiální vlastnosti medu a propolisu, obhájeno 2015, 6. místo v celostátním kole SOČ
- výuka předmětu Praktická cvičení z biochemie (KBC/BCHC)
- přednášková činnost pro včelaře

## **8.6 Členství v organizacích a spolcích**

- Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ
- Mendelova společnost pro včelařský výzkum
- mezinárodní asociace COLOSS

## **8.7 Příspěvky na konferencích**

### **8.7.1 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 (2<sup>nd</sup> Informal Proteomic Meeting), 30<sup>th</sup> November – 1<sup>st</sup> December 2012, Olomouc, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. Book 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 isoform apidaecinu pomocí nanoLC-MS, přednáška

### **8.7.2 Plakátová sdělení**

- Daníhlík J., Šebela M., Lenobel L., Petřivalský M. (2010) Antimikrobiální peptidy v imunitním systému včel, XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno; poster

- Danihlák J., Šebela M., Lenobel R., Petřivalský M. (2011) Analýza parametrů humorální imunity včel, XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno; poster
- Danihlák 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
- Danihlák J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2012) Analysis of bee antimicrobial peptides by mass spectrometry methods, Eurbee, Halle an der Saale, Německo; poster
- Danihlák J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2013) Detection of Bee Antimicrobial Peptides by Mass Spectrometry Method, Apimodia, Kyjev, Ukrajina; poster
- Danihlák J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2014) Quantification of Peptide Apidaecin in Honey Bee Bodies or Tissues, Eurbee, Murcia, Španělsko; poster
- Brodschneider R., Danihlák 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
- Danihlák J., Lenobel R., Šebela M., Petřivalský M. (2015) Detekce a kvantifikace isoformů 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
- Danihlák 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., Danihlák 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., Danihlák 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

## 8.8 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)

## 8.9 Seznam ostatních, neimpaktovaných článků

- Danihlák J. (2008) Imunita včel, Moderní včelař 3, 17-19
- Danihlák J. (2008) Kyselina mravenčí a šťavelová v chovu včel, Moderní včelař 6, 27-28
- Vondráčková H., Danihlák J. (2010) První krok k očkování včel pro roztoči *Varroa destructor*, Moderní včelař 2, 41-42
- Danihlák 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
- Danihlák J., Čermák K. (2010) Objevena příčina CCD? Moderní včelař 6, 190
- Danihlák J. (2011) Antimikrobiální peptidy, Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Bulletin 2
- Danihlák J. (2011) Imunita včel, Moderní včelař 5, příloha - sborník z I. konference Mendelovy společnosti pro včelařský výzkum
- Danihlák J. (2012) Jak se včely a včelstvo brání onemocnění morem včelího plodu? Moderní včelař 2, 55-56
- Danihlák J. (2012) S prof. Ingemarem Friesem o moru včelího plodu, Moderní včelař 4, 119-120
- Danihlák J. (2012) Konference EurBee, Moderní včelař 5
- Danihlák J. (2012) RNAi – Nová strategie léčby včelích viróz, Moderní včelař 6; 205-207
- Danihlák J. (2013) Rozhovor a Alejandrou Vásquez o objevu a významu symbiotických mikroorganismů včel, Moderní včelař 2; 20-25
- Danihlák J. (2013) Varroóza, varroatolerance a šlechtění včelstev, Moderní včelař 3; 18-21

- Daníhlík J., Kobza R., Klíma Z. (2014) COLOSS: Vyhodnocení prvního českého monitoringu zimních ztrát včelstev, Moderní včelař 6; 8-13
- Daníhlík J. (2015) Cesta na sever aneb vědecká konference včelařů ze Skandinávie a Pobaltí. Moderní včelař 2; 24-25
- Daníhlík J. (2015) COLOSS: ze zákulisí přípravy dotazníku. Moderní včelař 2; 26-27

## 9 Seznam zkratk

AcN – acetonitril

AmP – antimikrobiální peptid(y)

ANOVA – analýza rozptylu

BPC – „base peak chromatogram“

BSA – hovězí sérový albumin

C<sub>q</sub> – hodnota počtu cyklů, při níž došlo k rozlišení fluorescence od šumu při qPCR

FA – kyselina mravenčí

G<sup>-</sup> Gram-negativní

G<sup>+</sup> - Gram-pozitivní

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHCA -  $\alpha$ -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 – analyzátor doby letu

MDA – malondialdehyd

MeOH – methanol

MRJP-1 – Major Royal Jelly Protein-1

MS – hmotnostní spektrometrie

nLC-MS nanoprůtoková kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní  
spektrometrií

PCR- polymerasová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerasová řetězová reakce

RP-LC – chromatografie na obrácené fázi

S/N -poměr signálu vůči šumu

SCX – silný kationtoměnič

SPE – extrakce na pevné fázi

TBA – hydroxid tetrabutylamonia

TFA – trifluoroctová kyselina

TiPP - 1,1,3,3-tetraisopropoxypropan

T<sub>m</sub> – disociační teplota ampliconu

VSH – Varroa Sensitive Hygiene

WCX – slabý kationtoměnič

## 10 Seznam literatury

- Aguilar M.-I. (2004) Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In *Hplc of Peptides and Proteins*, Aguilar M.-I. (ed), 2, pp 9-23. New Jersey, USA: Humana Press
- Amaral I.M.R., Neto J.F.M., Pereira G.B., Franco M.B., Beletti M.E., Kerr W.E., Bonetti A.M., Ueira-Vieira C. (2010) Circulating Hemocytes from Larvae of *Melipona Scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell Types and Their Role in Phagocytosis. *Micron* **41**: 123-129
- Andreu D., Rivas L. (1998) Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers* **47**: 415-433
- Bansal S.S., Halket J.M., Bomford A., Simpson R.J., Vasavda N., Thein S.L., Hider R.C. (2009) Quantitation of Hepcidin in Human Urine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **384**: 245-253
- Behan J.L., Smith K.D. (2011) The Analysis of Glycosylation: A Continued Need for High Ph Anion Exchange Chromatography. *Biomedical Chromatography* **25**: 39-46
- Bilikova K., Popova M., Trusheva B., Bankova V. (2013) New Anti-Paenibacillus Larvae Substances Purified from Propolis. *Apidologie* **44**: 278-285
- Bilikova K., Wu G.S., Simuth J. (2001) Isolation of a Peptide Fraction from Honeybee Royal Jelly as a Potential Antifoulbrood Factor. *Apidologie* **32**: 275-283
- Boerjan B., Cardoen D., Bogaerts A., Landuyt B., Schoofs L., Verleyen P. (2010) Mass Spectrometric Profiling of (Neuro)-Peptides in the Worker Honeybee, *Apis Mellifera*. *Neuropharmacology Neuropeptides* **58**: 248-258
- Boman H.G., Nilsson I., Rasmuson B. (1972) Inducible Antibacterial Defence System in Drosophila. *Nature* **237**: 232-&



Brodschneider R., Crailsheim K. (2010) Nutrition and Health in Honey Bees. *Apidologie* **41**: 278-294

Brogden K.A. (2005) Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**: 238-250

Brogden K.A., DeLucca A.J., Bland J., Elliott S. (1996) Isolation of an Ovine Pulmonary Surfactant-Associated Anionic Peptide Bactericidal for *Pasteurella Haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 412-416

Butler E., Alsterfjord M., Olofsson T.C., Karlsson C., Malmstrom J., Vasquez A. (2013) Proteins of Novel Lactic Acid Bacteria from *Apis Mellifera Mellifera*: An Insight into the Production of Known Extra-Cellular Proteins During Microbial Stress. *BMC Microbiology* **13**

Carreck N.L., Andree M., Brent C.S., Cox-Foster D., Dade H.A., Ellis J.D., Hatjina F., Vanenglesdorp D. (2013) Standard Methods for *Apis Mellifera* Anatomy and Dissection. *Journal of Apicultural Research* **52**

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

Casteels P. (1998) Immune Response in *Hymenoptera*. In *Molecular Mechanism of Immune Responses in Insects*, Brey P.T., Hultmark D. (eds), first edn, 4, pp 92-111. London: Chapman and Hall

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

Cerenius L., Kawabata S.-i., Lee B.L., Nonaka M., Söderhäll K. (2010) Proteolytic Cascades and Their Involvement in Invertebrate Immunity. *Trends in Biochemical Sciences* **35**: 575-583

Cerenius L., Soderhall K. (2004) The Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrates. *Immunol Rev* **198**: 116-126

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

Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M. (2001) Optimization of the Antimicrobial Activity of Magainin Peptides by Modification of Charge. *FEBS Letters* **501**: 146-150

Destoumieux-Garzon D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachere E. (2001) Crustacean Immunity - Antifungal Peptides Are Generated from the C Terminus of Shrimp Hemocyanin in Response to Microbial Challenge. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 47070-47077

Di Palma S., Hennrich M.L., Heck A.J.R., Mohammed S. (2012) Recent Advances in Peptide Separation by Multidimensional Liquid Chromatography for Proteome Analysis. *Journal of Proteomics* **75**: 3791-3813

Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L.P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J.-L., Alaux C. (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *Plos one* **8**: e72016

Diehl D.M., Chambers E.E., Fountain K.J. (2011) A Strategic Approach to the Quantification of Therapeutic Peptides in Biological Fluids. *Chromatography Online Special Issues*

Dubos R.J. (1939a) Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : I. Preparation of the Agent. Its Activity in Vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **70**: 1-10

Dubos R.J. (1939b) Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus: Ii. Protective Effect of the Bactericidal Agent against Experimental Pneumococcus Infections in Mice. *The Journal of Experimental Medicine* **70**: 11-17

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. (2004) Transcriptional Immune Responses by Honey Bee Larvae During Invasion by the Bacterial Pathogen, *Paenibacillus* Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **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., 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**

Evans J.D., Spivak M. (2010) Socialized Medicine: Individual and Communal Disease Barriers in Honey Bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S62-S72

Fennell J.F., Shipman W.H., Cole L.J. (1968) Antibacterial Action of Melittin, a Polypeptide from Bee Venom. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **127**: 707-710

Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E.W., Schneider G. (2012) Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. *Nature Review of Drug Discovery* **11**: 37-51

Foettinger A., Leitner A., Lindner W. (2005) Solid-Phase Capture and Release of Arginine Peptides by Selective Tagging and Boronate Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1079**: 187-196

Foettinger A., Leitner A., Lindner W. (2006) Derivatisation of Arginine Residues with Malondialdehyde for the Analysis of Peptides and Protein Digests by Lc-Esi-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **41**: 623-632

Fontana R., Mendes M.A., Souza B.M.d., Konno K., César L.M.M., Malaspina O., Palma M.S. (2004) Jelleines: A Family of Antimicrobial Peptides from the Royal Jelly of Honeybees (*Apis Mellifera*). *Peptides* **25**: 919-928

Fox J.L. (2013) Antimicrobial Peptides Stage a Comeback. *Nature Biotechnology* **31**: 379-382

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

Gallai N., Salles J.-M., Settele J., Vaissière B.E. (2009) Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline. *Ecological Economics* **68**: 810-821

Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. (2000) Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* **18**: 1151-1155

Giessen T.W., Marahiel M.A. (2012) Ribosome-Independent Biosynthesis of Biologically Active Peptides: Application of Synthetic Biology to Generate Structural Diversity. *FEBS Letters* **586**: 2065-2075

Głinski Z., Jarosz J. (1993) Further Evidence for Cell-Free Immunity in the Honeybee, *Apis Mellifera*. *Apiacta* **23**: 69-78

Gliński Z., Jarosz J. (2001) Infection and Immunity in the Honey Bee *Apis Mellifera*. *Apiacta* **36** (1): 12 - 24

Goulson D., Nicholls E., Botias C., Rotheray E.L. (2015) Bee Declines Driven by Combined Stress from Parasites, Pesticides, and Lack of Flowers. *Science* **347**: 1255957

Gruber K.A., Stein S., Brink L., Radhakrishnan A., Udenfriend S. (1976) Fluorometric Assay of Vasopressin and Oxytocin - General Approach to Assay of Peptides in Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 1314-1318

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

Hancock R.E.W., Sahl H.-G. (2006) Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nature Biotechnology* **24**: 1551-1557

Chen Y.P., Siede R. (2007) Honey Bee Viruses, Advances in Virus Research. Karl Maramorosch A.J.S.a.F.A.M. (ed), Volume 70 edn, pp 33-80. Academic Press

Ilyasov R.A., Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Nikolaenko A.G. (2013) Defensins in the Honeybee Antiinfectious Protection. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **49**: 1-9

Ingham A.B., Moore R.J. (2007) Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in Heterologous Microbial Systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **47**: 1-9

Ishihama Y., Rappsilber J., Mann M. (2006) Modular Stop and Go Extraction Tips with Stacked Disks for Parallel and Multidimensional Peptide Fractionation in Proteomics. *Journal of Proteome Research* **5**: 988-994

Jin F.-l., Xu X.-x., Yu X.-q., Ren S.-x. (2009) Expression and Characterization of Antimicrobial Peptide Cecropin in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*. *Process Biochemistry* **44**: 11-16

Kanbar G., 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

Kang S.-J., Park S.J., Mishig-Ochir T., Lee B.-J. (2014) Antimicrobial Peptides: Therapeutic Potentials. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **12**: 1477-1486

Kanost M.R., Gorman M.J. (2008) Phenoloxidases in Insect Immunity, Insect Immunology. pp 69-96. San Diego: Academic Press

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

Klein A.-M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharntke T. (2007) Importance of Pollinators in Changing Landscapes for World Crops. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**: 303-313

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

Kuhn E., Wu J., Karl J., Liao H., Zolg W., Guild B. (2004) Quantification of C-Reactive Protein in the Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis Using Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry and <sup>13</sup>c-Labeled Peptide Standards. *Proteomics* **4**: 1175-1186

Kwakman P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J. (2010) How Honey Kills Bacteria. *The FASEB Journal* **24**: 2576-2582

Laverty G., Gorman S.P., Gilmore B.F. (2011) The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 6566-6596

Lavine M.D., Strand M.R. (2002) Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 1295-1309

Le Conte Y., De Vaublanc G., Crauser D., Jeanne F., Rousselle J.C., Becard J.M. (2007) Honey Bee Colonies That Have Survived *Varroa Destructor*. *Apidologie* **38**: 566-572

Lee M.S., Pittler M.H., Shin B.-C., Kong J.C., Ernst E. (2008) Bee Venom Acupuncture for Musculoskeletal Pain: A Review. *The Journal of Pain* **9**: 289-297

Leitner A., Amon S., Rizzi A., Lindner W. (2007) Use of the Arginine-Specific Butanedione/Phenylboronic Acid Tag for Analysis of Peptides and Protein Digests Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**: 1321-1330

Li W., Tailhades J., O'Brien-Simpson N.M., Separovic F., Otvos L., Jr., Hossain M.A., Wade J.D. (2014) Proline-Rich Antimicrobial Peptides: Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Amino Acids* **46**: 2287-2294

Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012) Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application. *Peptides* **37**: 207-215

Lima P.R.d., Brochetto-Braga M.R. (2003) Hymenoptera Venom Review Focusing on *Apis Mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**: 149-162

Locke B., Fries I. (2011) Characteristics of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) in Sweden Surviving *Varroa Destructor* Infestation. *Apidologie* **42**: 533-542

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

Martínez-Bartolomé S., Deutsch E.W., Binz P.-A., Jones A.R., Eisenacher M., Mayer G., Campos A., Canals F., Bech-Serra J.-J., Carrascal M., Gay M., Paradela A., Navajas R., Marcilla M., Hernáez M.L., Gutiérrez-Blázquez M.D., Velarde L.F.C., Aloria K., Beaskoetxea J., Medina-Aunon J.A., Albar J.P. (2013) Guidelines for Reporting Quantitative Mass Spectrometry Based Experiments in Proteomics. *Journal of Proteomics* **95**: 84-88



- Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. (1997) Membrane Permeabilization Mechanisms of a Cyclic Antimicrobial Peptide, Tachyplesin I, and Its Linear Analog. *Biochemistry* **36**: 9799-9806
- Meloun M., Militký J. (2012) *Interaktivní Statistická Analýza Dat*, 3 edn. Praha: Univerzita Karlova v Praze.
- Millipore M. (2014) Sample Preparation Product Guide. In Millipore M. (ed.). Millipore Corporation, USA.
- Nakatsuji T., Gallo R.L. (2012) Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology* **132**: 887-895
- Neubauerova T., Mackova M., Macek T., Koutek B. (2009) Antimicrobial Cationic Peptides. *Chemické Listy* **103**: 460-468
- Nováková L., Vlčková H. (2009) A Review of Current Trends and Advances in Modern Bio-Analytical Methods: Chromatography and Sample Preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**: 8-35
- Onofrejova L., Leitner A., Lindner W. (2008) Malondialdehyde Tagging Improves the Analysis of Arginine Oligomers and Arginine-Containing Dendrimers by HPLC-MS. *Journal of Separation Science* **31**: 499-506
- Palacio M.A., Rodriguez E., Goncalves L., Bedascarrasbure E., Spivak M. (2010) Hygienic Behaviors of Honey Bees in Response to Brood Experimentally Pin-Killed or Infected with *Ascosphaera Apis*. *Apidologie* **41**: 602-612
- Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M., Gerula D. (2010) Process of Cleaning Dead Brood from Cells in a Honeybee Colony. *Journal of Apicultural Science* **54**: 5-11
- Pandey A., Mann M. (2000) Proteomics to Study Genes and Genomes. *Nature* **405**: 837-846

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

Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002) Relative Expression Software Tool (Rest©) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**: e36

Powers J.-P.S., Hancock R.E.W. (2003) The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity. *Peptides* **24**: 1681-1691

Prabhu S., Dennison S.R., Lea B., Snape T.J., Nicholl I.D., Radecka I., Harris F. (2013) Anionic Antimicrobial and Anticancer Peptides from Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **32**: 303-320

Přídal A., Čermák K. (2005) *Včelařství*: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.

Pütsep K., Faye I. (2009) Hans G Boman (1924-2008): Pioneer in Peptide-Mediated Innate Immune Defence. *Scandinavian Journal of Immunology* **70**: 317-319

Qiang M., Xu Y.J., Lu Y., He Y.G., Han C.S., Liu Y., He R.Q. (2014) Autofluorescence of Mda-Modified Proteins as an in Vitro and in Vivo Probe in Oxidative Stress Analysis. *Protein & Cell* **5**: 484-487

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

Recio I., Visser S. (1999) Two Ion-Exchange Chromatographic Methods for the Isolation of Antibacterial Peptides from Lactoferrin - in Situ Enzymatic Hydrolysis on an Ion-Exchange Membrane. *Journal of Chromatography A* **831**: 191-201

Ritorto M.S., Cook K., Tyagi K., Pedrioli P.G.A., Trost M. (2013) Hydrophilic Strong Anion Exchange (Hsax) Chromatography for Highly Orthogonal Peptide Separation of Complex Proteomes. *Journal of Proteome Research* **12**: 2449-2457

Romanelli A., Moggio L., Montella R.C., Campiglia P., Iannaccone M., Capuano F., Pedone C., Capparelli R. (2011) Peptides from Royal Jelly: Studies on the Antimicrobial Activity of Jelleins, Jelleins Analogs and Synergy with Temporins. *Journal of Peptide Science* **17**: 348-352

Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010) Biology and Control of *Varroa Destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103 Suppl 1**: S96-119

Sasaki K., Minamino N. (2013) Peptidomics Strategy of Discovering of Endogenous Biologically Active Peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides*, Kastin A.J. (ed), 243, pp 1772-1779. USA: Elsevier

Sato Y., Yamamoto E., Takakuwa S., Kato T., Asakawa N. (2008) Weak Cation-Exchange Restricted-Access Material for on-Line Purification of Basic Drugs in Plasma. *Journal of Chromatography A* **1190**: 8-13

Shiloach J., Santambien P., Trinh L., Schapman A., Boschetti E. (2003) Endostatin Capture from *Pichia Pastoris* Culture in a Fluidized Bed - from on-Chip Process Optimization to Application. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **790**: 327-336

Schluns H., Crozier R.H. (2007) Relish Regulates Expression of Antimicrobial Peptide Genes in the Honeybee, *Apis Mellifera*, Shown by Rna Interference. *Insect Molecular Biology* **16**: 753-759

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

Spivak M., Reuter G. (2001) Resistance to American Foulbrood Disease by Honey Bee Colonies, *Apis Mellifera*, Bred for Hygienic Behavior. *Apidologie* **32**: 555 - 565

Staby A., Jacobsen J.H., Hansen R.G., Bruus U.K., Jensen I.H. (2006) Comparison of Chromatographic Ion-Exchange Resins - V Strong and Weak Cation-Exchange Resins. *Journal of Chromatography A* **1118**: 168-179

Starks P., Blackie C., Seeley T. (2000) Fever in Honeybee Colonies. *Naturwissenschaften* **87**: 229 - 231

Stefano G.B., Salzet B., Fricchione G.L. (1998) Enkelytin and Opioid Peptide Association in Invertebrates and Vertebrates: Immune Activation and Pain. *Immunology Today* **19**: 265-268

Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. (1981) Sequence and Specificity of 2 Anti-Bacterial Proteins Involved in Insect Immunity. *Nature* **292**: 246-248

Šafařík I., Šafaříková M. (2004) Magnetic Techniques for the Isolation and Purification of Proteins and Peptides. *Bimagnetic Research and Technology* **2**: 7

Tamamura H., Ikoma R., Niwa M., Funakoshi S., Murakami T., Fujii N. (1993) Antimicrobial Activity and Conformation of Tachyplesin-I and Its Analogs. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **41**: 978-980

Taniguchi K., Kuyama H., Kajihara S., Tanaka K. (2013) Maldi Mass Spectrometry-Based Sequence Analysis of Arginine-Containing Glycopeptides: Improved Fragmentation of Glycan and Peptide Chains by Modifying Arginine Residue. *Journal of Mass Spectrometry* **48**: 951-960

Tantipai boonwong P., Sinchaikul S., Sriyam S., Phutrakul S., Chen S.-T. (2005) Different Techniques for Urinary Protein Analysis of Normal and Lung Cancer Patients. *Proteomics* **5**: 1140-1149

Taylor C.F., Paton N.W., Lilley K.S., Binz P.-A., Julian R.K., Jr., Jones A.R., Zhu W., Apweiler R., Aebersold R., Deutsch E.W., Dunn M.J., Heck A.J.R., Leitner A., Macht M., Mann M., Martens L., Neubert T.A., Patterson S.D., Ping P., Seymour S.L., Souda P., Tsugita A., Vandekerckhove J., Vondriska T.M., Whitelegge J.P., Wilkins M.R., Xenarios I., Yates J.R., III, Hermjakob H. (2007) The Minimum Information About a Proteomics Experiment (Miape). *Nature Biotechnology* **25**: 887-893

Thomas A., Solymos E., Schanzer W., Baume N., Saugy M., Dellanna F., Thevis M. (2011) Determination of Vasopressin and Desmopressin in Urine by Means of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry for Doping Control Purposes. *Analytica Chimica Acta* **707**: 107-113

Turner R.J. (1994) *Immunology - a Comparative Approach*: John Wiley and Sons Ltd.

van den Broek I., Sparidans R.W., Schellens J.H.M., Beijnen J.H. (2010) Quantitative Assay for Six Potential Breast Cancer Biomarker Peptides in Human Serum by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**: 590-602

van der Zee R., Brodschneider R., Brusbardis V., Charriere J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Dahle B., Drazic M.M., Kauko L., Kretavicius J., Kristiansen P., Mutinelli F., Otten C., Peterson M., Raudmets A., Santrac V., Seppala A., Soroker V., Topolska G., Vejsnaes F., Gray A. (2014) Results of International Standardised Beekeeper Surveys of Colony Losses for Winter 2012-2013: Analysis of Winter Loss Rates and Mixed Effects Modelling of Risk Factors for Winter Loss. *Journal of Apicultural Research* **53**: 19-34

van der Zee R., Gray A., Holzmann C., Pisa L., Brodschneider R., Chlebo R., Coffey M.F., Kence A., Kristiansen P., Mutinelli F., Nguyen B.K., Nouredine A., Peterson M., Soroker V., Topolska G., Vejsnaes F., Wilkins S. (2013) Standard Survey Methods

for Estimating Colony Losses and Explanatory Risk Factors in *Apis Mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**

van der Zee R., Pisa L., Andonov S., Brodschneider R., Charriere J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Crailsheim K., Dahle B., Gajda A., Gray A., Drazic M.M., Higes M., Kauko L., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kralj J., Kristiansen P., Hernandez R.M., Mutinelli F., Nguyen B.K., Otten C., Ozkirim A., Pernal S.F., Peterson M., Ramsay G., Santrac V., Soroker V., Topolska G., Uzunov A., Vejsnaes F., Wei S., Wilkins S. (2012) Managed Honey Bee Colony Losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the Winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research* **51**: 91-114

Velickovic T., Ognjenovic J., Mihajlovic L. (2012) Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins by Ion Exchange Chromatography. In *Ion Exchange Technology II*, Inamuddin D., Luqman M. (eds), 1, pp 1-34. Springer Netherlands

Villanueva J., Carrascal M., Abian J. (2014) Isotope Dilution Mass Spectrometry for Absolute Quantification in Proteomics: Concepts and Strategies. *Journal of Proteomics* **96**: 184-199

Vizioli J., Salzet M. (2002) Antimicrobial Peptides from Animals: Focus on Invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**: 494-496

Voges R., Noack S. (2012) Quantification of Proteome Dynamics in *Corynebacterium Glutamicum* by N-15-Labeling and Selected Reaction Monitoring. *Journal of Proteomics* **75**: 2660-2669

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

Wheeler M.M., Robinson G.E. (2014) Diet-Dependent Gene Expression in Honey Bees: Honey Vs. Sucrose or High Fructose Corn Syrup. *Scientific Reports* **4**

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., Dres S.T., Starks P.T. (2008) The Ontogeny of Immunity: Development of Innate Immune Strength in the Honey Bee (*Apis Mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **54**: 1392-1399

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

Wimley W.C., Hristova K. (2011) Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. *Journal of Membrane Biology* **239**: 27-34

Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* **55**: 27-55

Yi H.-Y., Chowdhury M., Huang Y.-D., Yu X.-Q. (2014) Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 5807-5822

Zhang J., Raglione T., Wang Q., Kleintop B., Tomasella F., Liang X. (2011) Regeneration of Tetrabutylammonium Ion-Pairing Reagent Distribution in a Gradient Elution of Reversed Phase Ion-Pair Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **49**: 825-831

Zhang L., Benz R., Hancock R.E.W. (1999) Influence of Proline Residues on the Antibacterial and Synergistic Activities of  $\alpha$ -Helical Peptides. *Biochemistry* **38**: 8102-8111

Zhang L., Rozek A., Hancock R.E.W. (2001) Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 35714-35722

Zhao J., Guo L., Zeng H., Yang X., Yuan J., Shi H., Xiong Y., Chen M., Han L., Qiu D. (2012) Purification and Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide from *Brevibacillus Laterosporus* Strain A60. *Peptides* **33**: 206-211

Zhou Q.F., Luo X.G., Ye L., Xi T. (2007) High-Level Production of a Novel Antimicrobial Peptide Perinerin in *Escherichia Coli* by Fusion Expression. *Current Microbiology* **54**: 366-370



**Příloha 1: 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**

## **Příloha 2: Derivatizace apidaecinu 1A malondialdehydem**

### **Postup přípravy činidla a derivatizace silně bazických peptidů malondialdehydem**

Postup pro derivatizaci peptidů a proteinů malondialdehydem je založen na specifické reakci guanidinové skupiny argininu s aldehydovými skupinami činidla v silně kyselém prostředí. Postup přípravy derivatizačního činidla 1,1,3,3,-tetraisopropoxypropanu (TiPP) byl upraven dle Foettinger *et al.* (2006). Tři gramy chromatografického sorbentu Amberlite IRC 50 byly třikrát promyty 100 ml 3,6% v/v HCl, poté třikrát vodou a nakonec třikrát isopropanolem. Před použitím byl sorbent vysušen v sušárně.

Navážka 2,5 g sorbentu Amberlite IRC 50 byla smíchána s 2,47 g 1,1,3,3,-tetramethoxypropanu v 91 ml isopropanolu a 2 h míchána na elektromagnetické míchačce při laboratorní teplotě. Poté byl sorbent dekantován a kapalná fáze byla slita. Isopropanol a při reakci uvolněný methanol byly odstraněny na vakuové rotační odparce při laboratorní teplotě. Odparek byl znovu rozpuštěn v 91 ml isopropanolu a opět 2 h míchán se zreagovaným sorbentem Amberlite IRC 50. Následovala dekantace, isopropanol a methanol byly opět za stejných podmínek odpařeny na vakuové odparce. Výsledný produkt TiPP měl světle žlutou barvu. Získaný produkt byl používán bez dalšího ředění.

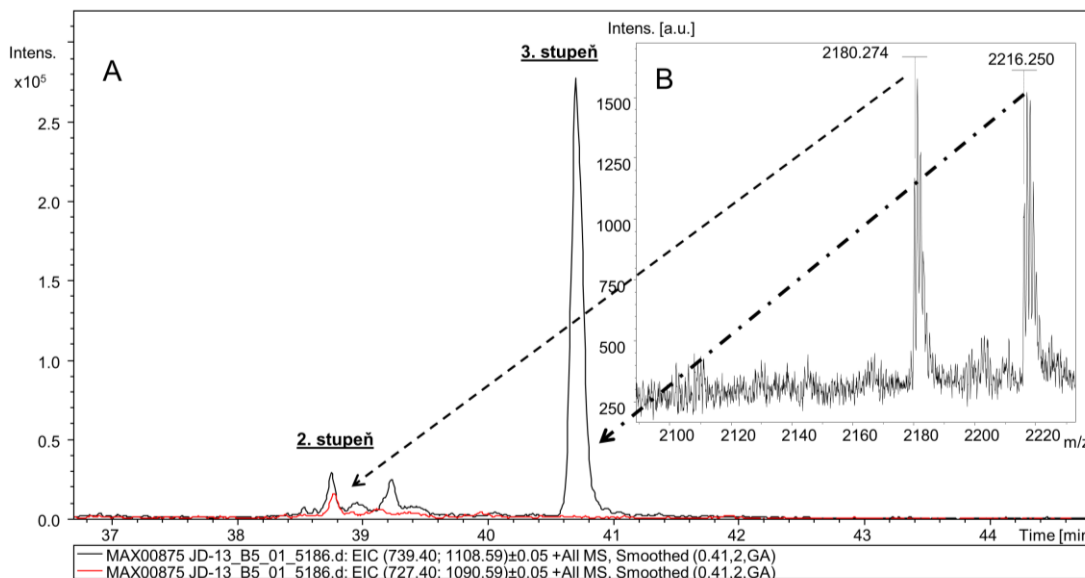
Řádově jednotky  $\mu\text{g}$  standardů peptidu apidaecinu nebo bradykininu byly použity pro reakci s TiPP. K 10  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{M}$  peptidu bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  12M HCl a 3  $\mu\text{l}$  TiPP. Reakce probíhala ve skleněné zkumavce jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl peptid 100 $\times$  zředěn vodou a přečištěn na C<sub>8</sub> Stage Tip.

### **Výsledky derivatizace malondialdehydem**

Foettinger *et al.* (2006) publikovali metodu vedoucí ke snížení bazicity peptidu a ke zvýšení chromatografické retence, fragmentačního chování a zvýšené úspěšnosti identifikace proteinů. Peptidy reagují v silně kyselém prostředí s TiPP. Metoda je založena na chemické modifikaci postranních řetězců argininu, kdy guanidinová skupina argininu reaguje s malondialdehydem za vzniku 2-pyrimidylargininu. Malondialdehyd je vysoce reaktivní sloučenina, proto se k reakcím používá jeho acetalová forma. V tomto případě byl připraven TiPP, protože použití methoxy nebo ethoxy sloučenin vede k vyšší tvorbě vedlejších produktů reakce: methyl- a ethylesterů

karboxylové skupiny na C-konci peptidu. Po úspěšné derivatizaci jednoho postranního řetězce argininu dochází k navýšení molekulové hmotnosti o 36 Da.

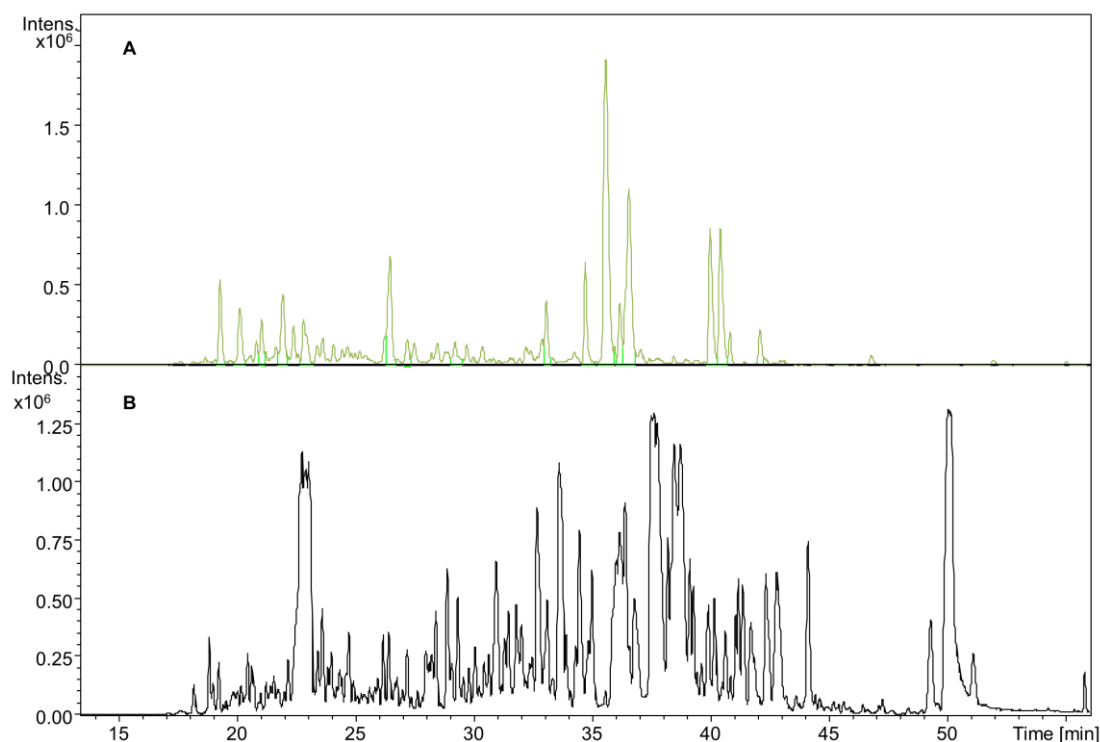
Apidaecin 1 obsahuje ve své sekvenci 3 argininy, takže dle stupně derivatizace narůstá molekulová hmotnost z 2107,06 Da na 2143,06 Da (1. stupeň), 2179,06 Da (2. stupeň), 2215,06 Da (3. stupeň). Během reakční doby 1 h proběhla derivatizace všech tří zbytků argininu, avšak v hmotnostním spektru byly pozorovatelné i signály peptidů s 2. stupněm derivatizace.



Obr. č. 19: A – Chromatogram z nLC-MS analýzy derivatizovaného apidaecinu 1A s ukázkou rozdílné retence jednotlivých derivatizovaných stavů apidaecinu 1A; B – hmotnostní spektrum z MALDI-TOF měření, kde lze pozorovat signály odpovídající apidaecinu 1 derivatizovanému do 2. a 3. stupně.

Použití TiPP skutečně vedlo k potlačení tvorby esterů, které vznikaly při derivatizaci peptidu pomocí methoxy- a ethoxy- sloučenin, avšak během optimalizace podmínek reakce se nepodařilo dosáhnout kvantitativní derivatizace do třetího stupně. Prodloužení doby reakce vedlo k rozkladu peptidu a použití méně koncentrované HCl mělo za následek spíše nižší celkový výtěžek reakce, v reakční směsi stále zůstávalo detegovatelné množství nezreagovaného peptidu. Ukázalo se, že vzhledem ke vzniku více produktů reakce není tato metoda vhodná pro kvantifikaci derivatizovaných peptidů, ale spíše pro studium funkce a struktury proteinů nebo jejich funkce v živých systémech (Taniguchi *et al.*, 2013; Qiang *et al.*, 2014).

Protokol derivatizace byl aplikován na komplexní vzorek homogenátu včel, který byl nejdříve přečištěn na kolonce obsahující sorbent SCX Empore. Peptid apidaecin 1 nebyl ve vzorku detekován ani před derivatizací ani po vzniku jednoho z produktů reakce derivatizace apidaecinu 1 do druhého nebo třetího stupně. Po derivatizaci vzorku došlo k výraznému zjednodušení „base peak chromatogram“ (BPC) chromatogramu pro  $m/z$  500 – 1500.



Obr. č. 20: BPC chromatogram hmotnostního spektra  $m/z$  500 – 1000. A – směsný homogenát 10 včel přečištěný přes SCX Empore sorbent a následně derivatizován malondialdehydem, B - směsný homogenát 10 včel přečištěný přes SCX Empore sorbent bez následné derivatizace.

Onofrejova *et al.* (2008) uvádí, že derivatizace MDA je vhodná pro peptidy obsahující až 7 argininů, peptidy s větším počtem argininů nejsou derivatizovány kvantitativně. V případě peptidů s osmi a devíti argininy chyběla k plné derivatizaci peptidu reakce s jedním postranním řetězcem argininu. Zároveň také uvádí, že prodloužení doby reakce na 2 h vede k zvýšení konverze peptidu k plné derivatizaci, což se potvrdilo reakcí peptidu obsahujícího 8 argininových zbytků. V případě apidaecinu proběhla derivatizace pouze jednoho argininového zbytku, další dva arginyly

přítomné v sekvenci peptidu často modifikovány nebyly. Optimalizace doby reakce k plné derivatizaci nevedla, stejně tak náhrada některých stěžejních chemikálií (HCl). Jinou možností, jak derivatizovat postranní řetězce argininu, je využití 2,3-butandionu (neboli biacetylu) (Foettinger *et al.*, 2005; Leitner *et al.*, 2007), tato metoda však zkoušena nebyla. Cesta chemické modifikace peptidu vedoucí ke snížení bazicity a zlepšení jeho chromatografického chování byla opuštěna a vývoj metody směřoval k využití iontoměničové chromatografie.

### Příloha 3: Chromatografická předseparace vzorku metodou StageTip s využitím SCX disků

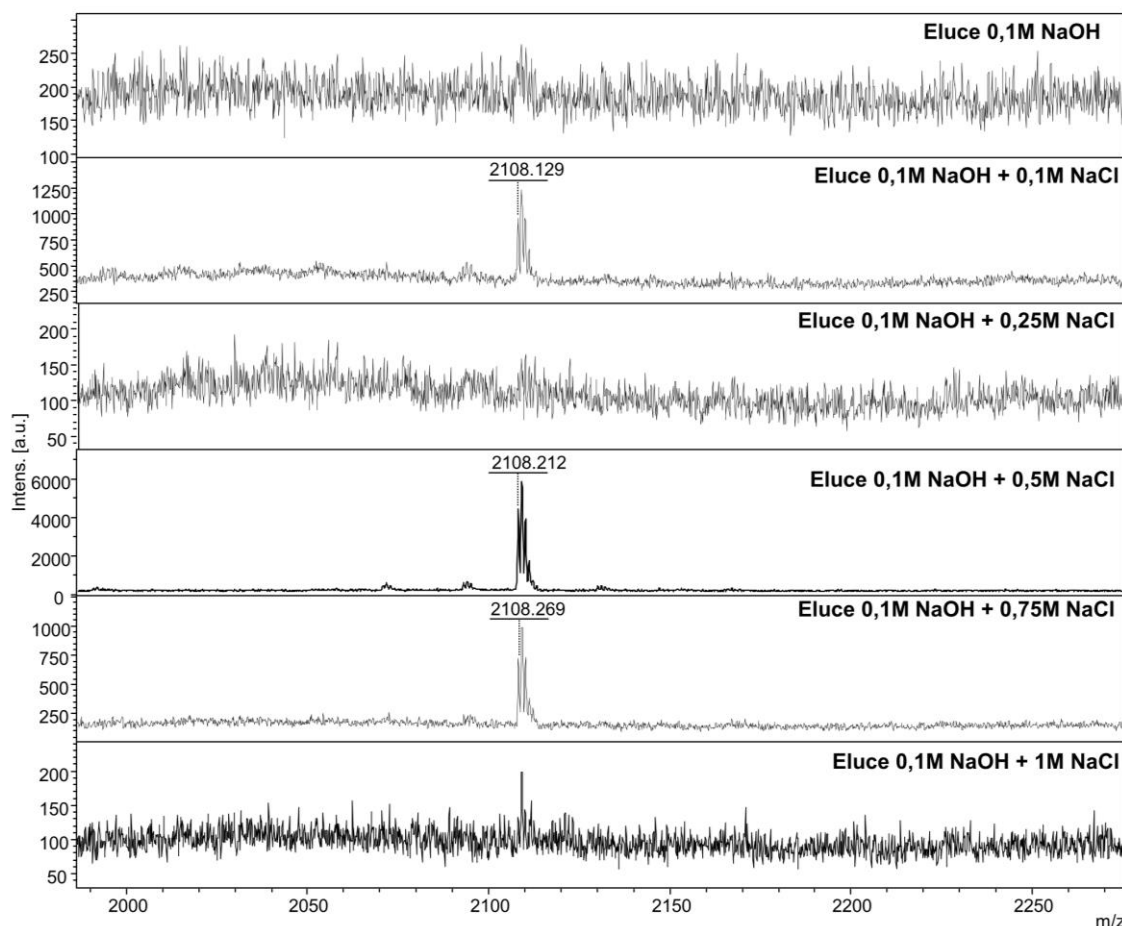
Pro purifikaci vzorků bylo využito technické uspořádání StageTip založené na plnění špiček chromatografickým sorbentem a následné mikropurifikaci peptidů ze vzorku (Rappsilber *et al.*, 2007). Byly využity extrakční disky obsahující jednak silný kationtoměnič (SCX) pro předseparaci vzorků, ale i reverzní fázi (C<sub>8</sub>) pevně fixované v poly(styrendivinybenzenové) polymerní membráně (Empore 3M) určené k přečištění vzorků před MS analýzou.

Tab. č. 12: Purifikační podmínky pro jednotlivé sorbenty

	SCX
Ekvilibrace	aceton (50 µl)
	methanol (50 µl)
	voda (50 µl)
	50% v/v HNO <sub>3</sub> (2 × 50 µl)
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 9 (2 × 50 µl)
	<i>nanesení vzorku</i>
Promytí	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 9 (2 × 50 µl)
Eluce	<i>variabilní</i>

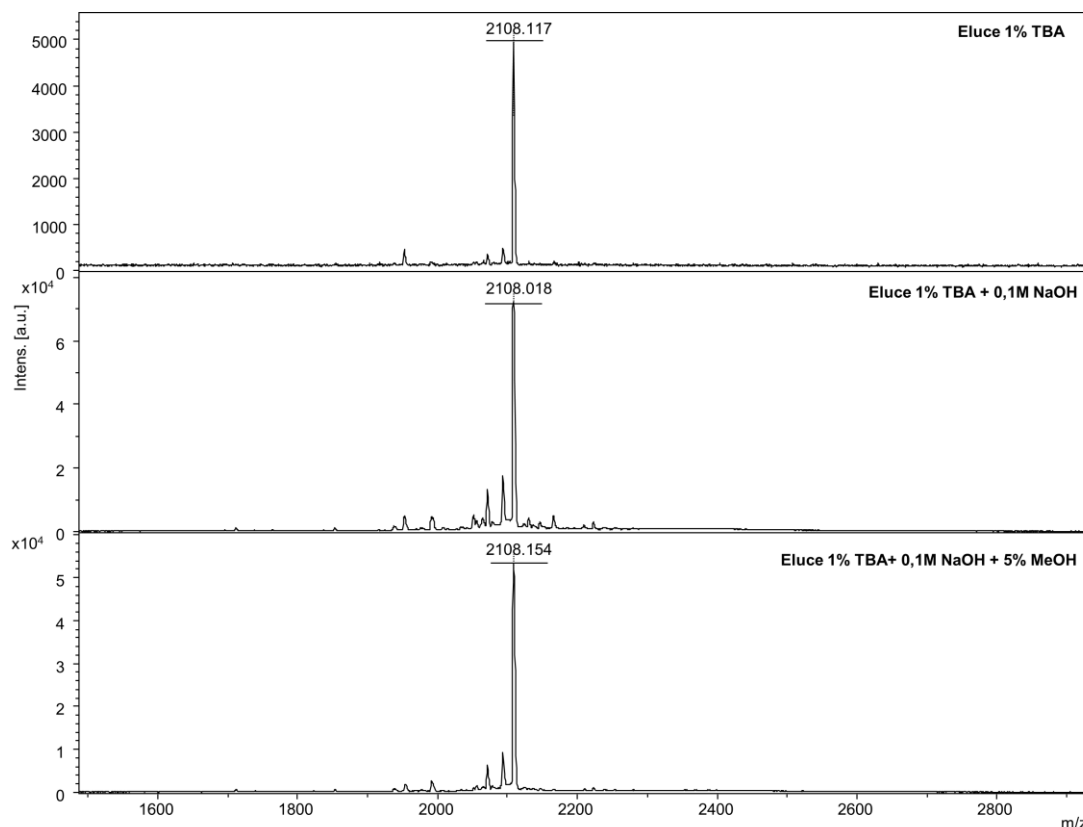
#### Výsledky purifikace na SCX kationtoměničích

Iontoměničová chromatografie na silném katexu byla testována pro možnost jejího využití k purifikaci apidaecinu 1 z homogenátů včel. Metoda navazuje na publikaci Rappsilber *et al.* (2007), kde byl využit technicky snadný a cenově výhodný postup čištění vzorků na výsecích disků s různým chromatografickým sorbentem. Jelikož disk se slabým katexem není dostupný, byly nejprve pro izolaci apidaecinu 1 z tkání včel testovány špičky naplněné výseky SCX disků (3M). Při SCX chromatografii bylo postupováno dle návodu výrobce k ekvibraci disku, vzorek byl nanesen v 30 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 9, dle doporučení výrobce byl pro eluci použit 0,01M NaOH. Po eluci byl roztok nejprve zneutralizován pomocí 0,1M HCl, pak mírně okyselen 5% kyselinou mravenčí a odsolen na C<sub>18</sub> extrakčním disku (3M). Eluce peptidu z SCX disku byla testována metodou MALDI-TOF MS.



Obr. č. 21: Hmotnostní spektra testovaných frakcí eluce apidaecinu 1 z SCX disku. Na SCX disk bylo dávkováno 500 pmol peptidu, na jedné pozici MALDI destičky se po odsolení vzorku při plné návratnosti purifikace teoreticky nacházelo 10 pmol peptidu.

Zvyšování iontové síly elučního roztoku nevedlo k uspokojivému výsledku. Eluce nebyly reprodukovatelné a navíc byly vzorky silně zasolené, což vedlo k nutnosti několikanásobného přečištění na  $C_{18}$  discích. K eluci ze silného katexu lze také použít silně bazický hydroxid tetrabutylamonium (TBA), kde se předpokládalo, že může pomoci eluci apidaecinu 1 a jiných silně bazických peptidů z SCX disků. TBA je iontové párové činidlo využívané v chromatografii k eluci problematicky se chovajících látek. U těchto činidel dochází k navázání na stacionární fázi, kde následně ovlivňují retenci analytu (Zhang *et al.*, 2011). Pro zjištění vlivu TBA na eluci peptidu z SCX disků bylo na SCX disk nanášeno 500 pmol peptidu a na MALDI spot teoreticky 10 pmol apidaecinu 1 (Obr. č. 22).



Obr. č. 22: Hmotnostní spektrum elucí standardu apidaecinu pomocí různých modifikací eluce obsahující hydroxid tetrabutylamonia (TBA).

Eluce apidaecinu 1 z SCX disku byla sice zvýšena, avšak reprodukovatelnost postupu purifikace značně kolísala. Peptid byl po eluci rozpuštěn v mobilní fázi obsahující TBA. Odpaření vzorku na vakuové odparce vedlo k ztrátě peptidu z roztoku, buď se rozpadl vlivem silně bazického prostředí, nebo došlo k jeho vazbě na povrch plastu mikrozkuřavky.

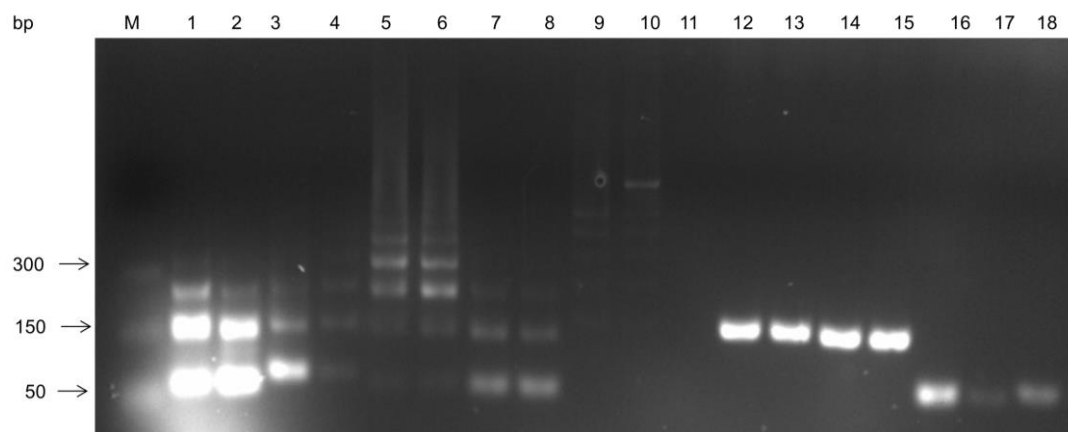


**Příloha 4: Sekvence primerů navržených k rozlišení peptidových preproteinů apidaecinu**

Tab. č. 13: Sekvence primerů navržených pro rozlišení jednotlivých preproteinů apidaecinu.

Název genu	Identifikátor genu	Primer 5' → 3'	$T_m$ (°C)	Odkaz	Výsledek
<i>Apid22<sup>a</sup></i>	GB17782	F TAGTCGCGGTA TTTGGAAT	63,1	(Evans, 2006)	bez produktu
		R TTTCACGTGCT TCATATTCTTC			
<i>Apid14<sup>a</sup></i>	406140	F TCGCCGTGAAC CGGAAGCT	63,3	navrženo	>1 produkt
		R ACGCGGATGAG GTGGTCTC	72,5		
<i>Apid14<sup>b</sup></i>	406140	F ATCGGAAGCTG AACCCGGC	67,8	navrženo	>1 produkt
		R TGAGGTGGTCT CGGTTGTGG	70,7		
<i>Apid73</i>	406115	F ACTGGAAGCTG AACCCGGT	68,6	navrženo	>1 produkt
		R TGAGGTGGTCT TGGTTGTGA	66,0		
<i>Apid22<sup>b</sup></i>	494510	F ACCGGAAGCTG AACCCGGC	64,4	navrženo	>1 produkt
		R TGAGGTGGCCT TGGTTGTGG	72,8		
			70,6		

<sup>a,b</sup> indexy rozlišují jednotlivé primery pro stejné geny, jejich použití vedlo k žádným nebo více amplikonům PCR, viz. Obr. č. 23.



Obr. č. 23: Vizualizace produktů PCR na 3% w/v agarosovém gelu s využitím primerů použitých pro optimalizaci metody, detekce bromidem ethidia. M: marker; 1+2: *Api14<sup>b</sup>*; 3+4: *Apid14<sup>a</sup>*; 5+6: *Apid22<sup>b</sup>*; 7+8: *Apid73*; 9+10: *Apid22<sup>a</sup>* (Evans, 2006); 11: blank; 12+13: *Arp1* (Lourenço *et al.*, 2008); 14+15: *EF1a-F2* (Lourenço *et al.*, 2008); 16+17: *LOC4061* (gen kódující abaecin) (Evans, 2006); 18: *Apid1* (gen kódující preprotein apidaecin 14, univerzální primery pro geny *Apid14*, *Apid22*, *Apid73*) (Simone *et al.*, 2009).

Na následujícím obrázku je ukázána nukleotidová sekvence cDNA genů *Api14*, *Api22* a *Api73* pro demonstraci opakujících se motivů.



**Příloha 5: Danihlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (*in press*) Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research***

**Příloha 6: Danihlák J., Petřivalský M. (2015) Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* 65: 434-431**

**Příloha 7: Does the pollen diet influence the expression and production of antimicrobial peptides in honey bee body parts? (manuskript článku)**