

**VĚDECKÁ RADA LÉKAŘSKÉ FAKULTY
V PLZNI
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Logo univerzity

logo fakulty

Ing. Jaroslav Hrabák

**PROTEOLYTICKÉ ENZYMY
VEGETATIVNÍCH FOREM A SPOR
BAKTERIE *PAENIBACILLUS LARVAE***

Autoreferát dizertační práce

Vědní obor: lékařská mikrobiologie

Plzeň, 2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenční formy doktorského studijního programu v oboru lékařská mikrobiologie na Ústavu mikrobiologie LF UK a FN v Plzni.

Uchazeč: Ing. Jaroslav Hrabák

Školitel: RNDr. Karel Martínek, Ph.D.
odborný asistent Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni

Oponenti: RNDr. Věra Drobníková, CSc.

Doc. MUDr. Jaromír Kotyza, CSc.,
Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UK v Plzni

Stanovisko k dizertační práci bylo vypracováno na Ústavu mikrobiologie LF UK a FN v Plzni,
přednosta: RNDr. Karel Fajfrlík

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce se koná dne:

před komisí pro obhajoby dizertačních prací doktorského studijního programu v oboru lékařská mikrobiologie na Lékařské fakultě UK v Plzni.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu LF UK v Plzni,
Husova 3, 306 05 Plzeň

Předseda komise pro obhajoby v oboru lékařská mikrobiologie: Doc.
Ing. Zdeněk Zloch, CSc., vedoucí Ústavu hygieny LF UK v Plzni

OBSAH

1. Úvod a současný stav poznatků	3
2. Cíle práce	6
3. Metodika	8
4. Dosažené výsledky	11
5. Závěr	13
6. Summary	14
7. Literatura k řešené problematice	16
8. Publikace autora	28

1. Úvod a současný stav poznatků

Bakterie *Paenibacillus larvae* způsobuje nejzávažnější bakteriální onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*) – mor včelího plodu. Jedná se o sporulující, pohyblivou, gram-pozitivní tyčinku, velikosti $0,5 - 1 \times 2,5 - 5 \mu\text{m}$, obvykle tvořící řetízky (Hansen a Brodsgaard, 2001). Spory jsou velké $0,6 \times 1,3 \mu\text{m}$ (Hansen a Brodsgaard 2001) a díky své extrémní odolnosti vůči fyzikálně – chemickým vlivům jsou příčinou vysoké nebezpečnosti moru včelího plodu. Proto lze tento mikroorganismus použít jako modelový pro studium fyziologických vlastností sporulujících mikrobů.

Molekulární mechanismy patogeneze moru včelího plodu však nejsou dosud známy. E.W.Davidson (1973) na základě elektron-mikroskopické studie patogeneze tohoto onemocnění vyslovila hypotézu, že by významným faktorem průniku bakterie do hemolymfy mohl být pohyb tyčinky a tedy mechanické rozrušení tkáně. Pohyb sice může být významným faktorem patogenity při pronikání některých bakterií (*Helicobacter* sp., *Vibrio cholerae*, atd.) mukózními vrstvami (Salyers a Whitt, 2002), avšak zdá se nepravděpodobné, že by pouhý pohyb umožňoval tyčince průnik přes vrstvu epitelu. Zmíněná hypotéza nebyla dosud potvrzena žádnou

biomechanickou studií. S největší pravděpodobností se bude jednat o souhru několika různých faktorů.

V souvislosti s destrukcí tkání larvy se často uvádí význam proteáz, které mohou hrát jak nutriční, tak penetrační úlohu (Dancer a Chantawannakul, 1997; Glinski a Jarosz, 1998; Hansen a Brodsgaard, 2001). Jejich přesná úloha v patogenezi moru včelího plodu dosud zjištěna nebyla.

Na produkci proteáz bakterií *P. larvae* bylo možné usuzovat podle ztekucování želatiny při růstu na umělých živných médiích. (Maasen, 1908; Sturtevant, 1924; Lochhead, 1928; Stoilowa, 1938)

Na základě tohoto znaku byla předpokládána významná produkce proteáz bakterií *P. larvae*.

Za pilotní práci zabývající se proteázami *P. larvae* lze považovat práci E.C. Holsta a A.P. Sturtevant publikovanou v roce 1940. Tito autoři zjistili, že extrakt z příškvarů vyvolává peptonizaci a srážení mléka.

N.G. Patel a T.A. Gochner (1972) provedli detailní biochemickou studii intracelulárních proteáz *P. larvae* a proteáz sekretovaných do média během sporulace. Ve studii použili metody papírové chromatografie a elektroforézu. Ztekucování želatiny detekovali změnou viskozity a rovněž pomocí chloridu rtuťnatého. Podle výsledků chromatografie a elektroforézy autoři usoudili na přítomnost dvou proteáz

ve vysporulované kultuře a jedné intracelulární proteázy u vegetativních forem *P. larvae*.

B.N. Dancer a P. Chantawannakul (1997) studovali proteázy přítomné v rozkládajících se tkáních a v příškvarech včelích larev napadených *P. larvae*. K detekci proteolytické aktivity použili kasein, azokasein, elastázu, kolagenázu a zymografii s kaseinovým substrátem. Byla zjištěna velká variabilita mezi aktivitou testovaných vzorků. Společným znakem u všech vzorků byly proteázy s pH optimem okolo 6,8, inhibované 1,10-phenantrolinem. Teplotní optimum těchto enzymů leželo mezi 60 – 65 °C, přičemž při zahřátí na 70 – 80 °C docházelo k prudkému poklesu aktivity. Provedením denaturující elektroforézy (SDS-PAGE) s následným převrstvením gelu agarem s kaseinem (modifikace zymografie) identifikovali několik proteolytických pruhů v oblasti 21 – 23 kDa. Při použití nativní elektroforézy s následným převrstvením gelu agarem s přidavkem odstředěného mléka byly detekovány celkem čtyři pruhy značící proteolytickou aktivitu. Tyto proteázy se v příškvarech a rozkládajících se larvách vyskytovaly v různých kombinacích.

Autor této práce se ve své diplomové práci zabýval studiem proteáz sekretovaných do MYPGP média během růstu kultury *P. larvae* (Hrabák, 2004a; Hrabák a Martínek, 2006).

Během primární detekce proteolytických enzymů se podařilo zymograficky identifikovat aktivitu v oblasti 87, 74 a 42 kDa u dvoudenní kultury bakterie *P. larvae*. V pětidenní kultuře bylo možné identifikovat změny v proteolýze slábnutím aktivity 74 kDa a naopak zesílení proteolytické aktivity v oblasti 42 kDa a zcela novou aktivitu v oblasti 40 kDa. U pětidenní kultury však dochází k lýze části tyčinek, proto nelze aktivním proteázám v této kultuře jednoznačně přisoudit extracelulární charakter. Dle charakterizace proteáz provedené pomocí zymografie autor předpokládá charakter metaloproteáz či proteáz se závislostí na kovových iontech, neboť byly inhibovány chelátory kovových iontů. Aktivita byla nejvyšší při neutrálním pH (lze uvažovat o vyloučení aspartátových proteáz) a ke své aktivitě nevyžadovaly redukční činidlo (vyloučení cysteinových proteáz). Byly štěpeny substráty, jenž jsou obvykle specifické pro aspartátové proteázy a metaloproteázy a neštěpeny substráty používané pro některé serinové a cysteinové proteázy (Bz-Arg-pNA, Bz-Phe-Val-Arg-pNA).

2. Cíle práce

Práce byla rozdělena do dvou dílčích celků – doplnění informací o biochemických vlastnostech proteáz

sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* a na studium biochemických vlastností proteáz vázaných ve vnějších vrstvách spory a jejich významu v patogenezi moru včelího plodu. V případě proteáz sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* byl cíl vytyčen k navržení vhodného purifikačního postupu, zdokonalení detekčních technik proteáz a srovnání proteolytické aktivity deponovaných izolátů.

V případě studia proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory bylo cílem navržení vhodného extrakčního postupu, lokalizace proteáz ve struktuře spory, vliv inhibitorů proteáz na germinaci spor (možnost nového přístupu k desinfekci) a ověření významu proteáz v patogenezi moru včelího plodu.

K dosažení vytyčených cílů v případě proteáz sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* bylo zapotřebí:

- optimalizovat kultivaci bakterie *P. larvae* vzhledem k množství balastních proteinů ve vzorku,
- navrhnout vhodný purifikační postup,
- analyzovat aktivitu proteáz.

K dosažení cílů v případě studia proteáz vázaných ve struktuře spory bylo zapotřebí:

- navrhnout a ověřit vhodné sporulační médium,
- vybrat vhodný kmen *P. larvae* ke studiu,
- navrhnout optimální extrakční postup proteáz,

- lokalizovat proteázy ve struktuře spory,
- nalézt vhodné inhibitory proteáz,
- otestovat vliv inhibitorů na germinaci spor,
- ověřit virulenci spor zbavených proteáz ve srovnání se sporami nativními.

3. Metodika

Izoláty *P. larvae*

Izoláty bakterie *P. larvae* byly získány z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o., kde byla provedena jejich identifikace. Jednalo se o izoláty ze včelstev s diagnózou moru včelího plodu z ČR a Rakouska.

Kultivace

Jako pevné médium byl zvolen MYPGP agar (Dingman a Stahly, 1983), který sloužil k izolaci jednotlivých bakteriálních kolonií.

Jako sporulační médium byl navržen a použit HCBB agar. Kultivace na tomto agaru probíhala 14 dní při teplotě 35°C.

Statistická analýza

Data získaná při srovnání počtu CFU na různých médiích byla srovnávána t-testem na hladině významnosti $p < 0,05$ (Reif, 2000).

Analýza proteinů

Proteiny byly děleny pomocí denaturující a nedenaturující elektroforézy (Bollag a Edelstein, 1991).

Analýza proteolytické aktivity zymografií

Zymografie byla použita pro detekci proteolytické aktivity, stanovení molekulové hmotnosti a základních vlastností studovaných proteáz. Nami použitá metodika byla modifikována podle M.J. Northa (1997), G.W. Olivera a kol. (1999) a Ch. Paecha a kol. (1993).

Lytická aktivita vzorků

Metoda byla použita ke sledování lytické aktivity produktů metabolismu *P. larvae* na zástupce gram-negativních a gram-pozitivních bakterií a testovaný tentýž kmen *P. larvae*.

Elektronová mikroskopie

Elektron-mikroskopické vyšetření vzorků pro průkaz bakteriofága v lyzující kultuře probíhalo v Laboratoři elektronové mikroskopie Mikrobiologického ústavu AV ČR podle metodiky pospané J. Šmardou a H. Slováčkovou (2004) a O. Benadou a V. Pokorným (1990).

Purifikace proteáz

Gelová filtrace byla prováděna především podle návodů firmy Pharmacia Fine Chemicals (Pharmacia Fine Chemicals, 1975, 1976a, 1976b, 1976c, 1979), jejíž produkty byly použity – značkové kolony, SEPHADEX.

Iontově výměnná chromatografie probíhala podle metodik popsaných D.M. Bollagem a S.J. Edelsteinem (1991), N.M. Hopperem (1999) a návodu firmy Pharmacia Fine Chemicals (1980).

Rovněž byla použita metoda afinitní chromatografie s navázaným chelátorem kovů. Kolona byla připravena v naší laboratoři dle J. Poratha a kol. (1975).

Štěpení BSA / kaseinu

Analýza vlastností purifikovaných proteáz byla testována štěpením bovinního sérového albuminu a kaseinu.

Zjištění inhibičního profilu proteáz

Test inhibice byl prováděn inkubací zymografického gelu v přítomnosti příslušného inhibitoru (North, 1997; Wolz, 1999). Stejně byl prováděn i test vlivu různých kovových iontů na aktivitu a inhibici proteáz.

Elektroeluce proteinů z povrchu spor

K extrakci povrchových proteinů pláště spory bylo použito elektroforetické zařízení zkonstruované pro tyto účely autorem dizertační práce.

Extrakce proteinového pláště spory chemickou cestou

Pro účely této studie byla použita technika popsaná C.S. Hayesem a P. Setlowem (1997).

Infekční pokusy in vitro a in vivo

Význam proteáz vázaných v povrchových strukturách spory v patogenezi byl ověřen infekčním pokusem *in vitro* a *in vivo*. K tomu byla použita metodika podle Y.S.C. Penga a kol. (1992) modifikovaná E. Genersch a kol. (2006).

Infekční pokus *in vivo* byl navržen v laboratorním úlku a to jak krmením testovaného materiálu, tak pipetováním malého množství tohoto materiálu přímo k larvičce.

4. Dosažené výsledky

V prvním kroku bylo potřeba optimalizovat kultivaci *P. larvae*. V MYPGP médiu byla zjištěna lýza kultury po 40ti hodinách od naočkování, doprovázená poklesem pH pod hodnotu 6,4. Jako příčina lýzy byla prokázána indukce temperovaného bakteriofága BLA.

Ke sporulaci *P. larvae* byl navržen nový agar s označením HCBB. Při srovnání schopností sporulace 31 sbírkových kmenů na MYPGP agaru a na agaru HCBB byl HCBB agar vyhodnocen jako vhodné sporulační médium s mediánem sporulace $4,2 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře a $5,65 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře s 10 % CO₂.

Pro purifikaci sekretovaných proteáz byla použita jednodenní kultura *P. larvae*, inkubovaná 24 hodin při pokojové teplotě. Po aplikaci takto připraveného vzorku na kolonu s DEAE-celulózou došlo k optimální purifikaci 87/74 kDa a 42/40 kDa proteáz. Následně byla provedena analýza štěpení bovinního sérového albuminu a kaseinu purifikovanými proteázami, avšak ani jeden z těchto substrátů nebyl štěpen. Sekretované proteázy se ukázaly být stabilní po dobu minimálně 14 dní při 4 °C, 3 dny při pokojové teplotě a pouze 24 hodin při 35 °C. Aktivita zůstala zachována i při zahřátí na 60 °C po dobu 10 minut. Se zvyšováním teploty docházelo k poklesu aktivity.

Při srovnání profilů sekretovaných proteáz u sbírkových kmenů se všechny různé varianty nacházely u vzorků signifikantně patogenních, tj. nebyl prokázán vliv konkrétní proteázy na virulenci *P. larvae*.

Pro extrakci proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory se podařilo sestrojít speciální elektroforetické zařízení, umožňující extrakci proteinů až z 10^8 spor. Extrahované proteázy se nejspíše nalézají ve vnějším proteinovém plášti spory. Jedná se pravděpodobně o metaloproteázy inhibované 1,10-phenantrolinem s pH optimem ležícím v oblasti neutrálního pH. Srovnáním profilu proteáz vázaných v proteinovém plášti spory u sbírkových kmenů byly zjištěny 3

různé kombinace detekovaných proteáz. Vzhledem k tomu, že se všechny varianty vyskytovaly u izolátů izolovaných z klinického materiálu, tj. u signifikantně patogenních kmenů, není žádná z kombinací sama o sobě nutným faktorem patogenity. Infekčním pokusem *in vitro* a *in vivo* byla testována virulence spor zbavených proteinového pláště. Bylo prokázáno, že spory zbavené proteinového pláště jsou stejně virulentní jako spory nativní. Proto je pravděpodobné, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nemají ve virulenci *P. larvae* významnou úlohu.

5. Závěr

Během práce se podařilo:

- optimalizovat kultivaci *P. larvae* s ohledem na následnou purifikaci sekretovaných proteáz,
- zjistit stabilitu sekretovaných proteáz,
- nalézt vhodný postup pro purifikaci 87/74 a 42/40 kDa proteáz,
- srovnat profily sekretovaných proteáz u 31 sbírkových kmenů,
- navrhnout nové sporulační médium pro *P. larvae*,

- nalézt vhodný extrakční postup pro proteázy vázané v proteinovém plášti spory,
- provést základní biochemickou charakterizaci proteáz vázaných v proteinovém plášti spory,
- prokázat, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nejsou esenciálním faktorem virulence *P. larvae*.

Zadané cíle tak byly beze zbytku splněny.

6. Summary

Due to the high resistance of the spores, the bacterium *Paenibacillus larvae* is the most dangerous bacterial pathogen of the honey bee (*Apis mellifera*). Thanks to its biological properties and restricted pathogenicity, this bacterium can be used as a model organism to study gram positive sporulating aerobic rods. This work is focused on a completing information about secreted proteases of this bacterium and on a study of proteases bound in a spore structure. MYPGP medium was used for the cultivation of *P. larvae*. In this medium, lysis of the culture was shown after 40 hours of cultivation. The pH of the medium decreased below 6.4 by lysis. The induction of temperate bacteriophage BLA was

detected as a causative agent of this lysis. A new sporulation medium called HCBB agar was proposed for the sporulation of *P. larvae*. In comparison with HCBB agar with MYPGP agar by 31 strains of *P. larvae* stored in our collection, HCBB agar was evaluated as an appropriate sporulation medium with a median of sporulation 4.2×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions and 5.65×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions with 10 % CO_2 . For purification of the secreted proteases, a one-day culture incubated at room temperature was used. Optimal purification of 87/74 kDa and 42/40 kDa proteases was observed after application of this sample on a DEAE-cellulose column. In the next step, analysis of the activity of purified proteases against bovine serum albumine was done. The secreted proteases have been stable for 14 days at 4 °C, for 3 days at room temperature and only 24 hrs at 35 °C. Proteolytic activity remained stable after heating at 60 °C for 10 minutes. With the increasing temperature, the proteolytic activity decreased. In comparing proteolytic patterns by the different 31 strains, all variants were presented in significantly pathogenic strains, so that there is no protease responsible for the virulence of *P. larvae*. For the extraction of proteases from the external structures of the spores, special electrophoretical equipment was constructed. This apparatus performs the easy extraction of proteases from 10^8 spores. The extracted

proteases are probably located in the spore coat. These proteases were identified as metalloproteases inhibited by 1,10-phenantroline with an optimum of pH in the neutral value. Three combinations of the detected proteases were observed in the 31 strains of *P. larvae*. All these variants were shown in isolates collected from clinical material, so that no one protease is an essential virulence factor. The virulence of the decoated spores was tested *in vitro* and *in vivo*. These experiments proved the same virulence of the decoated and native spores. According to this result, we can hypothesize that the proteases bound in the spore coat do not have an essential function in the virulence of *P. larvae*.

7. Literatura k řešené problematice

Ash C., Priest F.G., Collins D.: Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek* (64), 253-260, 1993.

Bamrick J.F.: Resistance to American foulbrood in honey bees 5. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae, *Insect Pathology* (6), 284-304, 1964.

Bakhiet N., Stahly D.P.: Ultrastructure of Sporulating *Bacillus larvae* in a Broth Medium, Applied and Environmental Microbiology (50), 690-692, 1985.

Bailey L., Ball B.V.: Honey Bee Pathology, Academic Press, London, 1991.

Bauer M.M.T., Stubbs M.T.: Crystallization of Proteinases, In: Sterchi E.E., Stöcker W. (Ed): Proteolytic Enzymes – Tools and Targest, Springer Verlag, Berlin, 1999.

Benada O., Ludvík J., Drobníková V.: Morphology of a new bacteriophage isolated from *Bacillus larvae*. Folia Microbiologica (29), 520-521, 1984.

Benada O., Pokorný V.: Modification of the polaron sputter-coater unit for glow discharge activation of carbon support films, Journal of Electron Microscopic Technique. (16), 235-239, 1990.

Bollag D.M., Edelstein S.J.: Protein Methods, Wiley-Lis, Inc., New York, 1991.

Borracci S.E., Chacana P.A., Palacio A., Terzolo H.R.: In Vitro Generation of *Paenibacillus larvae* Spores. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress - Book of Abstracts, Ljubljana, 2003.

Bradford M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* (72), 248-254, 1976.

Campana C.F., Bakhiet N., Stahly D.P.: Morphology of *Bacillus larvae* bacteriophage PBL3 and physical map of its DNA, *Journal of Invertebrate Pathology* (57), 141-143, 1991.

Carpana E., Marocchi L., Gelmini L.: Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*, *Apidologie* (26), 11-16, 1995.

Casteels P., Ampe C., Riviere J., Damme J. Van, Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Temper P.: Isolation and Characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*), *European Journal of Biochemistry* (187), 381-386, 1990.

Dancer B.N., Chantawannakul P.: The Proteases of American Foulbrood Scales, *Journal of Invertebrate Pathology* (70), 79-87, 1997.

Dalhamar G., Steiner H.: Characterization of Inhibitor A, a Protease from *Bacillus thuringiensis* which Degrades Attacins and Cecropins, Two Classes of Antibacterial Proteins in

Insect, European Journal of Biochemistry (139), 247-252, 1984.

Davidson E.W.: Ultrastructure of American Foulbrood Diseases Pathogenesis in Larvae of the Worker Honey Bee, *Apis mellifera*, Journal of Invertebrate Pathology (21), 53-61, 1973.

Dingman, D., Bakhiet N., Field C., Stahly D.: Isolation of two bacteriophages from *Bacillus* larvae, PBL1 and PBL0.5, and partial characterization of PBL1, Journal of General Virology (65), 1101-1105, 1984.

Dingman D.W., Stahly D.P.: Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components, Applied and Environmental Microbiology (46), 860-869, 1983.

Driks A.: *Bacillus subtilis* Spore Coat, Microbiology and Molecular Biology Reviews (63), 1-20, 1999.

Drobníková V.: Tlumení moru včelího plodu, Ministerstvo zemědělství ČR, Praha, 1983.

Drobníková V., Ludvík J.: Bacteriophage of *Bacillus larvae*, Journal of Apicultural Research (21), 53-56, 1982.

Drobníková V., Pytelová I., Machová M.: Honey bee infectious Diseases, Research Report of the Apiculture Research Institute, Dol, 1988.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I.: Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* and *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (56), 501-511, 2006.

Glinski Z., Jarosz J.: Exoproteinase of *Bacillus larvae* destroys the “in vitro” antibacterial activity of cecropins of lepidodteran insects and antibacterial response peptides from the honeybee, *Apiacta* (33), 1-8, 1998.

Gohnauer T.A.: Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture, *Journal of Invertebrate Pathology* (22), 251-257, 1973.

Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.N.: The genus *Bacillus*, In: Laskin A.I., Lechevalier H.A.: *Handbook of Microbiology*, Chemical Rubber Press, Cleveland, 1973.

de Graf D.C., Vos P.D., Heyndrickx M., Trappen S.V., Peren N., Jacobs F.J.: Identification of *Paenibacillus larvae*

up to subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis, *Journal of Invertebrate Pathology* (91), 115-123, 2006.

Gregorc A., Bowen I.D.: Histopathological changes in honeybee larvae (*Apis mellifera L.*) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, *Cell Biology International* (22), 137-144, 1998.

Hansen H., Brodsgaard C.J.: American foulbrood – biology and control, Euroconference on MOMEDITO Proceedings, Prague, 75 – 96, 2001.

Hayes C.S., Setlow P.: Analysis of Deamidation of Small, Acid-Soluble Spore Proteins from *Bacillus subtilis* In Vitro and In Vivo, *Journal of Bacteriology* (179), 6020-6027, 1997.

Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C.W.: Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *International Journal of Systematic Bacteriology* (46), 270-279, 1996.

Holst E.C., Sturtevant A.P.: Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae*, and two new culture media for this organism, *Journal of Bacteriology* (40), 723-731, 1940.

Hopper N.M.: Purification of Proteases, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): *Proteolytic Enzymes: Tools and Targest.* Springer- Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1999.

Hrabák J.: Charakterizace secernovaných proteáz bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* - diplomová práce, Fakulta aplikovaných věd ZČU, Plzeň, 2004a.

Hrabák J.: Mor včelího plodu, *Včelařství* (9), volná příloha – leták, 2004b.

Hrabák J.: Klinická diagnostika nemocí včelího plodu, *Včelařství* (7), 2006.

Hrabák J., Martínek K.: Sreening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by using substrate SDS polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Apicultural Research*, 2006, *In Press*.

Jaeckel S.: Zur pathologishen Anatomie der Biene *Apis mellifica* L. während der Metamorphose bei böartiger Faulbrut (*Bacillus larvae* White), *Archiv der Bienenkunde* (11), 41-92, 1930.

Julian G.St., Bulla L.A.: Physiology of Sporeforming Bacteria Associated with Insects – IV. Glukose Catabolism in *Bacillus larvae*, Journal of Bacteriology (108), 828-834, 1971.

Katznelson H.: *Bacillus pulvifaciens* (n.sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae, Journal of Bacteriology (59), 153-155, 1950.

Koudelka A.P., Hufnagel L.A., Koudelka G.B.: Purification and Characterization of the Repressor of the Shiga Toxin-Encoding Bacteriophage 933W: DNA Binding, Gene Regulation, and Autocleavage, Journal of Bacteriology (186), 7659-7669, 2004.

Liu H., Bergman N.H., Thomason B., Shallom S., Hazen A., Crossno J., Rasko D.A., Ravel J., Read T.D., Peterson S.N., Yates III J., Hanna P.C.: Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore, Journal of Bacteriology (186), 164-168, 2004.

Lochhead A.G.: Cultural studies of *Bacillus larvae* (White), Agricultural Sciences (9), 80-89, 1928.

Lochhead A.G.: Growth Factor Requirements of *Bacillus larvae*, White, Journal of Bacteriology (44), 185-189, 1942.

Maassen A.: Zur Etiologie der sogenannten Faulbrut der Honigbienen, Arb. Biol. Reichs. Land- und Forstwirtschaft (6), 53-70, 1908.

Mueller T.J., Fried B.: Electrophoretic analysis of proteases in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis*, Journal of Parasitology (85), 174-180, 1999.

North M.J.: Parasite Proteinases, In: Rogan M.T. (Ed.): Analytical Parasitology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1997.

Oliver G.W., Stetler-Stevenson W.G., Kleiner D.E.: Zymography, Casein Zymography, and Reverse Zymography-Activity assays for proteases and their inhibitors, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): Proteolytic Enzymes: Tools and Target. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1999.

Paech Ch., Christianson T., Blasig S.: Enhanced Zymography of Proteases, Analytical Biochemistry (231), 440-441, 1993.

Patel N.G., Gochnauer T.A.: The Production and Properties of *Bacillus larvae* Proteases, Insect Biochemistry (2), 321-333, 1972.

Peng Y.S.C., Museem E., Fong A., Montague M.A., Tyler T.: Effects of chlortetracycline on honey bee Worker larvae

reared in vitro, *Journal of Invertebrate Pathology* (60), 127-133, 1992.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – Gel filtration in theory and practice, Uppsala, 1975.

Pharmacia Fine Chemicals: DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B – for ion exchange chromatography, Uppsala, 1976a.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – a unique substance for modern chromatography, Uppsala, 1976b.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – theory and experimental technique, Uppsala, 1976c.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex ion exchanger – a guide to ion exchange chromatography, Uppsala, 1977.

Pharmacia Fine Chemicals: Gel filtration – theory and practice, Uppsala, 1979.

Pharmacia Fine Chemicals: Ion Exchange Chromatography – principles and methods, Uppsala, 1980.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation, *Nature* (258), 598-599, 1975.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.: Microbiology – Third Edition, The McGraw-Hill Companies Inc., Columbus, 1996.

Reif J.: Metody matematické statistiky, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň, 2000.

Salyers A.A., Whitt D.D.: Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach, American Society for Microbiology Press, Washington, 2002.

Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., He H., Clardy J., Handelsman J.: Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85, Applied and Environmental Microbiology (60), 2023-2030, 1994.

Stoilowa E.R.: Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an einigen deutschen Stämmen des *Bacillus larvae*, des Erregers der bösartigen Faulbrut der Honigbiene, Zentr. Bakt. Parasitenk. (99), 124-130, 1938.

Sturtevant A.P.: The development of American foulbrood in relation to the metabolism of its causative agent, Journal of Agricultural Research (28), 129-168, 1924.

Sturtevant A.P.: Preliminary report concerning factors related to certain of the growth phases of *Bacillus larvae*, Journal of Economic Entomology (23), 129-168, 1930.

Sturtevant A.P.: Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood, *Journal of Agricultural Research* (45), 257-285, 1932.

Šmarda J., Slováčková H.: Ten New Temperate Bacteriophages of *Citrobacter youngae*. *Folia Microbiologica* (49): 671-678, 2004.

Tarr H.L.A.: Studies on American foulbrood. I. The relative pathogenicity of vegetative cells and endospores of *Bacillus larvae* for the blood of the bee, *Annals Applied Biology* (24): 377-384, 1937.

Titěra D., Lenicek J., Haklová M., Sekyra M.: Volatile Substance Produced by *Paenibacillus larvae* and its Detection Using SPME. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress - Book of Abstracts, Ljubljana, 2003.

Veselý V.: Včelařství, Nakladatelství Brázda, Praha, 2003.

White G.F.: The bacteria of the apiary, with special reference to bee Diseases, Bureau of Entomology Technical Series no. 14, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1906.

White G.F.: The cause of American foulbrood, Bureau of Entomology Technical Series no. 94, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1907.

White G.F.: Unheated egg-yolk media, *Science* (49), 362, 1919.

Wolz R.L.: Strategies for Inhibiting Proteases of Unknown Mechanism, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): *Proteolytic Enzymes - Tools and Targets*, Springer Verlag, Berlin, 1999.

8. Publikace autora

Diplomová práce

Hrabák J.: Charakterizace secernovaných proteáz bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita, 2004.

Články v odborných časopisech

Hrabák J., Martínek K.: Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Apicultural Research*, 2007, *v tisku*. (IF 0,672)

Hrabák J.: Izolace mikroorganismů z roztoče *Varroa destructor* s patologickými útvary v divertiklech střeva a průkaz patogenity bakterie *Enterobacter cloacae*, *Plzeňský lékařský sborník* 69, 2002:107-114.

Metodika

Hrabák J., Vaniš V., Bergerová T., Urbášková P.: Průkaz β -laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií, Zprávy CEM, Státní zdravotní ústav, Praha, 2007, v tisku.

Abstrakta ve sbornících

Hrabák J., Benada O., Hrušková-Heidingsfeldová O.: Demonstration of Temperate Bacteriophage as a Lytical Agent of *Paenibacillus larvae* Culture in MYPGP Medium, Proceedings of the Second European Conference of Apidology, Praha, 2006.

Hrabák J., Hrušková-Heidingsfeldová O., Martínek K.: Purification and Biochemical Characterization of Proteolytic Enzymes of Bacterium *Paenibacillus larvae*, Proceedings of the Second European Conference of Apidology, Praha, 2006.

Hrabák J.: Produkce δ -toxinu u koaguláza negativních stafylokoků způsobujících infekci krevního řečiště, 46. Studentská vědecká konference, Lékařská fakulta v Plzni, 2006.

Hrabák J.: Demonstration of temperate bacteriophage as a lytical agent of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* culture in MYPGP medium. Medical Postgraduate Conference 2nd Meeting. Hradec Králové, 2005.

Hrabák J.: Purifikace proteolytických enzymů bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* a návrh chromogenního substrátu, 44. Studentská vědecká konference, Lékařská fakulta v Plzni, 2004.

Hrabák J.: Primární charakterizace secernovaných proteáz bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, 43. Studentská vědecká konference, Lékařská fakulta v Plzni, 2003.

Hrabák J.: The Microorganisms Isolated from the Mites *Varroa destructor* and the Verification of its Pathogenity for it, Book of Abstract XXXVIIIth Apimondia – International Apicultural Congress 2003, 280-281.

Hrabák J.: Bakterie *Enterobacter cloacae* jako patogen roztoče *Varroa destructor*, 42. Studentská vědecká konference, Lékařská fakulta v Plzni, 2002.

Vybrané odborně-populární články

Hrabák J.: Nemoci včel na kongresu EurBee 2006, Včelařství 2, 2007.

Hrabák J.: Klinická diagnostika nemocí včelího plodu, Včelařství 7, 2006.

Hrabák J.: Mor včelího plodu, Včelařství 9, 2004, volná příloha – leták.

Hrabák J.: Roztoč *Varroa* od roku 1904 po současnost, Včelařství 7, 2004: 186 – 187.

Hrabák J.: Hlavní téma: Nemoci včel, Včelařství 12, 2003: 309.

Hrabák J.: Apiterapie ve světle vědy, Včelařství 12, 2003: 310 - 311.

Hrabák J.: Přirozený patogen roztoče *Varroa destructor*, Včelařství 12, 2002: 274 – 275.