

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza  
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



**Bc. Daniela Janechová**

Analýza antimikrobiálních peptidů v jedových žlázách čmeláků  
Analysis of antimicrobial peptides in venom glands of bumblebees

Diplomová práce

**Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.**  
**Konzultant: RNDr. Karolína Pecková, Ph.D.**

Praha, 2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 05. 2012

.....

Daniela Janechová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru RVO 61388963 a podporován MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857).

Úvodem bych ráda poděkovala doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D., RNDr. Karolíně Peckové, Ph.D. a RNDr. Václavu Čeřovskému, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále Ing. Zdeňkovi Voburkovi za zjištění sekvence peptidů a RNDr. Oldřichovi Hovorkovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků blanokřídlého hmyzu.

Zároveň bych chtěla poděkovat všem ostatním členům ze skupin hmotnostní spektrometrie a antimikrobiálních peptidů z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za pomoc, kterou mi při práci poskytovali.

Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a především za podporu a pochopení během celého studia.

## ABSTRAKT

Rozšiřující se rezistence bakterií na tradiční antibiotika podpořila zájem o nalezení nových látek k jejich výrobě. Antimikrobiální peptidy mají srovnatelné účinky s klasickými antibiotiky, ale odlišný mechanismus působení, díky kterému nevyvolávají u bakterií rezistenci. Tyto peptidy byly charakterizovány ve všech formách mnohobuněčných organismů.

Jed blanokřídleho hmyzu obsahuje mnoho biologicky aktivních látek, mimo jiné i antimikrobiální peptidy. Z tohoto důvodu byla tato práce zaměřena na získávání sekvencí antimikrobiálních peptidů z vybraných druhů čmeláků (zemního, zahradního, rokytového, lučního, hájového, skalního, proměnlivého a pačmeláka českého).

Izolace jedových extraktů byla prováděna metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi. Následná analýza byla prováděna pomocí metod hmotnostní spektrometrie, laserovou ionizací za spoluúčasti matrice ve spojení s průletovým analyzátozem a ionizací elektrosprejem s hybridním analyzátozem lineární iontové pasti s orbitrapem. Pro nalezené peptidy byly sekvence určeny tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou "de novo" a Edmanovým odbouráváním.

V této práci bylo charakterizováno 17 sekvencí peptidů z extraktů jedových žláz čmeláků, pro které byla zjištěna antimikrobiální aktivita agarovým difuzním testem.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, ESI-LTQ orbitrap, hmotnostní spektrometrie, jed blanokřídleho hmyzu, MALDI-TOF, RP-HPLC

## ABSTRACT

The growing resistance of bacteria to traditional antibiotics promotes the interest in finding new substances for their production. Antimicrobial peptides have comparable effect to conventional antibiotics, but a different mechanism of action and they do not provoke bacterial resistance. These peptides were characterized in all forms of multicellular organisms.

Hymenoptera venom contains many biologically active substances including antimicrobial peptides. For this reason, this thesis focuses on the acquisition of antimicrobial peptide sequences from selected species of bumblebees (*Bombus terrestris*, *B. hortorum*, *B. hypnorum*, *B. pratorum*, *B. lucorum*, *B. lapidarius*, *B. humilis* and *B. bohemicus*).

The isolation from the venom glands was performed by high performance liquid chromatography with reversed phases. Subsequent analysis was performed using the methods of mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption/ionization with time of flight analyzer and electrospray ionization connected with hybrid linear ion trap analyzer with orbitrap. The sequences for the found peptides were determined by tandem mass spectrometry methods "*de novo*" and Edman degradation.

In this work we characterized 17 sequences of peptides extracted from bumblebee venom glands for which antimicrobial activity was determined by on agar diffusion test.

Keywords: antimicrobial peptides, ESI-LTQ orbitrap, hymenoptera venom, MALDI-TOF, mass spectrometry, RP-HPLC

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>OBSAH .....</b>	<b>5</b>
<b>Seznam použitých symbolů a zkratek.....</b>	<b>7</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
1.1 <i>Antimikrobiální peptidy .....</i>	8
1.2 <i>Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů .....</i>	9
1.3 <i>Imunitní systém hmyzu .....</i>	11
1.4 <i>Jed blanokřídlého hmyzu .....</i>	11
1.5 <i>Čmeláci .....</i>	12
1.6 <i>Metoda izolace peptidů .....</i>	16
1.6.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi .....</i>	16
1.7 <i>Metody analýzy peptidů .....</i>	16
1.7.1 <i>Hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice.....</i>	17
1.7.2 <i>Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem .....</i>	19
1.7.3 <i>"De novo" sekvenování .....</i>	21
1.7.4 <i>Edmanovo odbourávání.....</i>	21
<b>2 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>23</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>24</b>
3.1 <i>Biologický materiál.....</i>	24
3.2 <i>Chemikálie .....</i>	24
3.3 <i>Separace jedové žlázy .....</i>	24
3.4 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi .....</i>	25
3.5 <i>Hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice.....</i>	25
3.6 <i>Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem .....</i>	26
3.7 <i>"De novo" sekvenování .....</i>	26

<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>28</b>
4.1 <i>Chromatografická separace extraktu .....</i>	28
4.2 <i>Analýza extraktu jedových žláz metodou laserové ionizace za spoluúčasti matrice .....</i>	29
4.3 <i>Analýza extraktu jedových žláz metodou elektrosprejové ionizace .....</i>	31
4.4 <i>Sekvenace metodou "de novo" .....</i>	32
<b>5 DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>43</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

## Seznam použitých symbolů a zkratek

A (AU, mAU)	absorbance (absorbanční jednotky)
ACN	acetonitril
AMK	aminokyselina
AMP	antimikrobiální peptid
CID	kolizně indukovaná disociace
Da	dalton
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
G <sup>+</sup>	gram pozitivní
G <sup>-</sup>	gram negativní
HCCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová
HCD	vysokoenergetická disociace
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
MALDI	laserová ionizace za spoluúčasti matrice
MCP	mikrokanálová deska
M <sub>R</sub>	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
LTQ orbitrap	hybridní analyzátor lineární iontové pasti s orbitrapem
ppm	parts per million
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	průletový analyzátor
t <sub>R</sub>	retenční čas
UV	ultrafialová oblast
$\lambda$	vlnová délka



# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Antimikrobiální peptidy

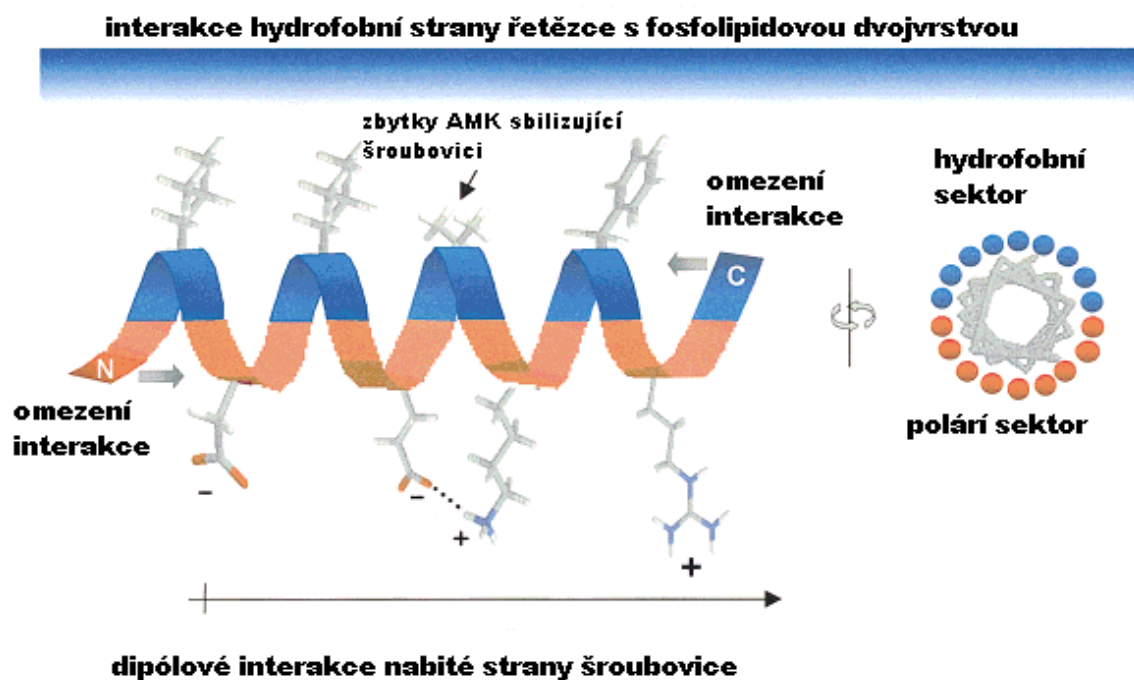
Se vzrůstajícím výskytem rezistence patogenních bakterií vůči tradičním antibiotikům je důležité dále objevovat nové druhy látek vhodných k jejich výrobě. Mezi tyto látky můžeme zahrnout i antimikrobiální peptidy (AMP), jenž se řadí mezi složky vrozeného imunitního systému, který je tvořen jako první odpověď hostitele proti infekcím. Současná antibiotika vyvolávají u patogenních bakterií rezistenci a to díky rychlému šíření a genetické variabilitě bakterií. Antimikrobiální peptidy tuto rezistenci nevyvolávají díky odlišnému mechanismu působení.<sup>1-3</sup>

Přírodní AMP byly izolovány a charakterizovány prakticky ze všech živých organismů, od prokaryot až po člověka, u kterého byly nalezeny jak v obranných buňkách (makrofázích a neutrofilních granulocytech), tak třeba i v epiteliálních buňkách, slinných žlázách a krevních destičkách. Produkce AMP se zvyšuje v případě, že organismus bojuje s infekcí nebo zánětem. Jejich antimikrobiální spektrum je široké a zahrnuje gram-negativní ( $G^-$ ) a gram-pozitivní ( $G^+$ ) bakterie, plísně, některé viry a prvoky.<sup>1-4</sup>

Nejvíce studované AMP patří do skupiny lineárních kationických peptidů s amfipatickým charakterem a s  $\alpha$ -helikální strukturou, nejčastěji obsahují 12 – 40 aminokyselin v řetězci.<sup>3,5-7</sup>

Tyto helikální peptidy mají ve vodném prostředí neuspořádanou strukturu, kterou mění v přítomnosti bakteriální membrány nebo chemikálií (trifluoroethanol nebo dodecylsulfát sodný) na sekundární uspořádání  $\alpha$ -helixu. Stabilita vzniklé  $\alpha$ -šroubovice může být ovlivněna například amidovaným C-koncem řetězce, přítomností aminokyselin (AMK) s vysokou tendencí tvořit  $\alpha$ -helix (leucin, alanin, lysin) nebo naopak destabilizujícími AMK (prolin, glycin) (Obrázek 1).<sup>5</sup>

Amfipatický charakter je dán množstvím aminokyselin, které mají kationický charakter při fyziologickém pH jako jsou arginin nebo lysin. Amfipatické uspořádání se zobrazuje pomocí tzv. Edmundsonovy kruhové projekce, ve které jsou patrné hydrofobní a hydrofilní domény (Příloha 1). Díky tomuto rozdělení dochází k hydrofobním interakcím se zbytky mastných kyselin z fosfolipidové dvojvrstvy membrány, a pokud AMP překročí určitou koncentraci, dochází k narušení membrány. Aby byla splněna amfipaticita je potřebných 40 – 60 % hydrofobních zbytků.<sup>5,6,9</sup>

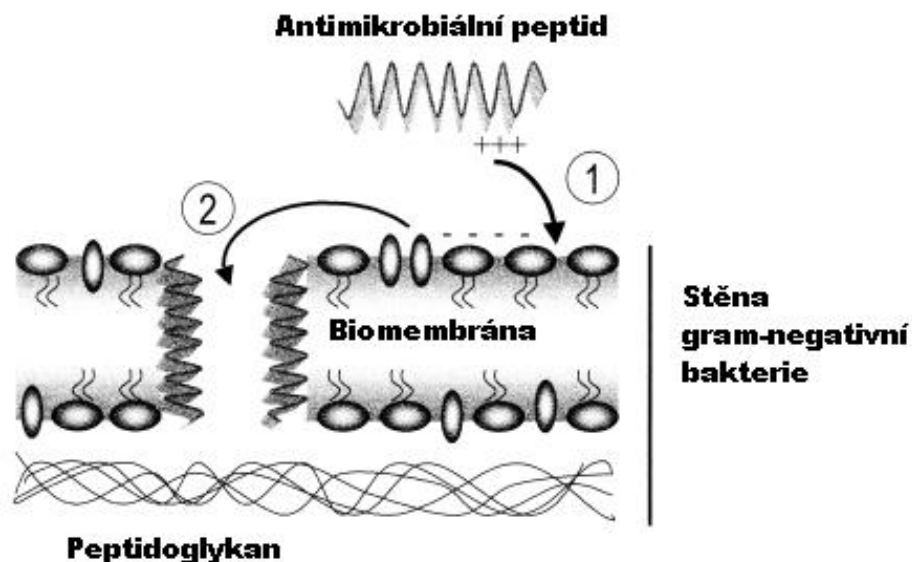


Obrázek 1: Schematické znázornění faktorů mající vliv na strukturu  $\alpha$ -helixu AMP.<sup>5</sup>

## 1.2 Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů

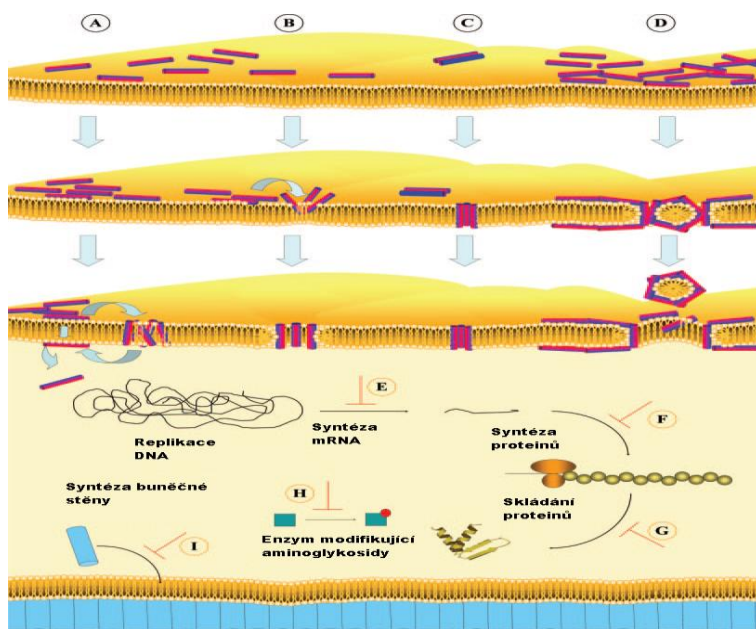
Kationický charakter usnadňuje navázání AMP na buněčnou stěnu bakterií, která je složena převážně ze záporně nabitě fosfolipidové dvojvrstvy (fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin) a neobsahuje cholesterol, což usnadňuje vznik membránových pórů. Tím jsou AMP specifické proti bakteriálním buňkám a nebuňkám eukaryotickým, které jsou elektroneutrální (obsahují obojetné ionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu).<sup>6,10,11</sup>

Na začátku dochází k přiblížení AMP k bakteriální membráně pomocí elektrostatických interakcí mezi kationickým peptidem a anionickou vrstvou lipidů v membráně. U  $G^-$  bakterií membrána obsahuje  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ionty a lipopolysacharidy, ke kterým mají kationické peptidy větší afinitu. AMP způsobí vytlačení kationtů  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  od negativně nabitých lipopolysacharidů a tím způsobí lokální destabilizaci vnější membrány (Obrázek 2).<sup>9,12</sup>



Obrázek 2: Schematické znázornění účinku kationických peptidů V 1. kroku dochází k navázání AMP na fosfolipidovou dvojvrstvu. Ve 2. kroku dochází k vytvoření kanálu přes membránu.<sup>2</sup>

Poté následují interakce peptidu s membránou, což vede k lyzi buňky (Obrázek 3). Může docházet k vytváření kanálů a ztrátě buněčného obsahu, úplné depolarizaci membrány, aktivaci destrukčních procesů (aktivace hydroláz buněčné stěny), k narušení funkce membrány translokací lipidů nebo dokonce k průniku některých peptidů až k cytoplazmatickým organelám.<sup>6,9,13</sup>



Obrázek 3: Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů: A - agregační model, B - model toroidního póru, C - model sudové skruže, D - kobercový model, E-I mechanismy působení antimikrobiálních peptidů.<sup>6,9</sup>

### 1.3 Imunitní systém hmyzu

Dodnes bylo popsáno již přes milion druhů hmyzu a odhaduje se, že minimálně stejné množství ještě zbývá identifikovat. Hmyz představuje největší třídu v rámci živočišné říše na Zemi a kromě hlubokých moří a polárních oblastí je rozšířen prakticky všude. K jeho rozšíření a extrémní rozmanitosti přispěla vysoká reprodukční schopnost, odolnost proti patogenům, adaptační přizpůsobivost na změny životního prostředí a způsobilost k letu.<sup>14,15</sup>

První obranná linie proti mikrobům u hmyzu je založena na strukturních překážkách, které zahrnují vnější kutikulu a epitel trávicí soustavy. Některé mikroorganismy používají k proniknutí přes kutikulu hmyzu enzym chitinázu. Po rozrušení kutikuly a vniknutí do těla hmyzu dochází k imunitní odpovědi na humorální a buněčné úrovni. V rámci humorální odpovědi se vytvářejí AMP a reaktivní sloučeniny kyslíku, které jsou dále uvolňovány do hemolymfy a eliminují mikroorganismy.<sup>6,14</sup>

### 1.4 Jed blanokřídlého hmyzu

Jed je bodavým hmyzem používán nejen k obraně proti predátorům, ale také k útokům a paralýze kořisti před naklazením vajíček do jejího těla. Chemické složení hmyzích jedů je důležitou součástí pochopení farmakologických příznaků po bodnutí hmyzem. Jed hmyzu obsahuje celou řadu biologicky aktivních látek, jako jsou enzymy, nízkomolekulární látky, neurotoxiny a skupiny středně velkých biologicky aktivních peptidů. Tyto látky způsobují celou řadu biologických efektů, jako jsou zvýšení chemotaxe neutrofilu, degranulace žírných buněk, lyze buněčné membrány nebo aktivace leukocytů v místě zánětů. Tyto děje se projevují prudkou dlouhotrvající bolestí, poškozením tkáně v místě vpichu žihadla, zánětem a v některých případech až anafylaktickým šokem, zřídka kdy však končícím smrtí.<sup>13,16</sup>

Nejznámějšími látkami obsaženými v jedu blanokřídlého hmyzu jsou apamin, melitin, kininy, mastoparany, bombolityny, biogenní aminy a enzymy fosfolipasa A<sub>2</sub>, fosfolipasa B a hyaluronidasa.<sup>17,18</sup>

Apamin patří mezi významné peptidy obsažené ve včelím jedu působící jako neurotoxin. Již při nízké koncentraci specificky blokuje draslíkové kanály

v neuroblastových buňkách. Například u kryš apamin způsobuje hyperaktivitu a křeče.<sup>18,19</sup>

Melitin je silně bazický peptid vyznačující se hemolytickou aktivitou proti červeným i bílým krvinkám. Porušuje membránu a tím dochází k uvolnění histaminu, který způsobuje hemolýzu celé buňky, což způsobí zánětlivou reakci.<sup>13,17,18</sup>

Kininy hrají podstatnou úlohu v paralyzování kořisti. Mají vasodilatační účinky a způsobují ztrátu integrity krevních kapilár. Vytvářejí mikrotromby a destičkové agregáty, čímž dochází k unikání tekutiny z cév do řídkého pojiva.<sup>17,20</sup>

Fosfolipasa A<sub>2</sub> se zúčastňuje odbourávání fosfolipidů obsažených v membránách a mitochondriích. Deacyluje je v pozici *sn-2* za vzniku lysofosfolipidů, které dále deacyluje fosfolipasa B na glycerolysofosfolipid a mastné kyseliny. Účinek fosfolipasy A<sub>2</sub> lze srovnávat s detergentem, to znamená, že poškozují mitochondrie a způsobuje rozpad červenýchrvinek. Lze ji zařadit mezi neurotoxiny blokující nervový vzruch.<sup>13,17,20</sup>

Hyaluronidasa způsobuje pronikání složek jedu z místa vpichu žihadla do okolní tkáně tím, že snižuje viskozitu pojivové tkáně katalýzou hydrolýzy mukopolysacharidů.<sup>17,20</sup>

Mastoparany porušují membrány červenýchrvinek a tím dochází k jejich rozpadu a uvolňování hemoglobinu. Také uvolňují histamin z mastocytů (žírné buňky pojivové tkáně) a serotonin z krevních destiček. Způsobují zánětlivou reakci.<sup>13,17,20</sup>

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin a často mají úlohu přenašečů nervového vzruchu. Jedná se o látky dopamin, serotonin, noradrenalin, adrenalin, histamin a tyramin. Způsobují bolestivou reakci, přičemž pokud se jedná o směs, tak je bolestivost zvýšená. Hrají úlohu při paralýze kořisti.<sup>17,20</sup>

Bombolitany jsou cytolytické peptidy, které rozkládají červené krvinky, usnadňují činnost fosfolipasy A<sub>2</sub> a uvolňují histamin ze žírných buněk. Mají stejné biologické vlastnosti jako melitin a mastoparany, ale liší se sekvencemi a také tím, že mají 6x silnější účinek uvolňování histaminu než mastoparany.<sup>13,18,21-23</sup>

## 1.5 Čmeláci

Čmeláci patří mezi důležité opylovače planých rostlin a zemědělských plodin, vyskytujících se v mírně chladnějším pásu. Na povrchu těla mají varovné zbarvení tvořené kombinací bílé, žluté, červené a černé barvy. Toto zbarvení pomáhá při zařazení

čmeláků do systému (Příloha 2). Královny a dělnice mají žihadlo spojené s jedovým vákem a používají ho jak k obraně před predátory tak k paralýze kořisti před naklazením vajíček do jejího těla a také k obraně hnízda. Společenstvo se dělí na královnu, dělnice a samce, přičemž dělnice a samci na podzim umírají. Zimu přežívá jen královna, která další rok nalezne vhodné místo k vystavění hnízda, často pod zemí, někdy však i na stromech nebo podkrovích. Pak zakládá novou jednoletou kolonii s jedinou plodnou samicí. Samice některých druhů čmeláků, především samice pačmeláků se chovají jako tzv. sociální parazité. Tyto samice se probouzejí později než ostatní, mají charakteristickou tvrdší kutikulu, nahoru zahnuté žihadlo a silná kusadla. Na rozdíl od samic ostatních druhů nehledají vhodné místo k vytvoření hnízda, ale čekají, než jiná královna vybuduje hnízdo, pak do něj proniknou a po poražení nebo podřízení původní královny ho obsadí. Pačmeláci bývají specializováni (chemickými signály i vzhledem) na určitý druh čmeláka.<sup>18,20,22,24</sup>

Čmelák zemní (*Bombus terrestris*) patří mezi nejhojnější druhy (Obrázek 4). Svoje hnízda má často až 1,5 m pod zemí na otevřených stanovištích. Tvoří velké kolonie čítající až 600 jedinců.<sup>26</sup>



**Obrázek 4: Čmelák zemní (Linnaeus, 1758)<sup>28</sup>**

Čmelák zahradní (*Bombus hortorum*) se vyskytuje od nížin po nižší polohy hor (Obrázek 5). Často hnízdí v opuštěných ptačích hnízdech nebo lidských stavbách. Je významným opylovačem jetele. Kolonie je tvořena zhruba 120 jedinci.<sup>26</sup>



**Obrázek 5: Čmelák zahradní (Linnaeus 1761)<sup>27</sup>**

Čmelák rokytový (*Bombus hypnorum*) obývá lesy včetně horských smrčín, parky a zahrady (Obrázek 6). Většinou staví hnízda povrchová např. v puklinách skal a zdech, v ptačích hnízdech nebo v ptačích budkách. Populaci tvoří až 400 jedinců.<sup>26</sup>



Obrázek 6: Čmelák rokytový (Linnaeus, 1758)<sup>27</sup>

Čmelák luční (*Bombus pratorum*) se řadí mezi podhorský a horský druh šířící se do nižších poloh (Obrázek 7). Žije převážně ve vlhkých lesích. Zakládá si malá nadzemní hnízda v dutinách zvětralých zdí, pod keři a živými ploty.<sup>26</sup>



Obrázek 7: Čmelák luční (Linnaeus, 1761)<sup>28</sup>

Čmelák hájový (*Bombus lucorum*) se podobá čmelákovi zemnímu, ale liší se menší velikostí (Obrázek 8). Vyskytuje se ve stinných lesích dokonce i horských. Staví si hnízda charakteristická dlouhým přístupovým tunelem hluboko v zemi. Početná populace čítá až 400 jedinců.<sup>26</sup>



Obrázek 8: Čmelák hájový (Linnaeus, 1761)<sup>27</sup>

Čmelák skalní (*Bombus lapidarius*) je velmi hojný druh vyskytující se od nížin až do hor na slunných otevřených stanovištích (Obrázek 9). Hnízda si buduje v hromadách kamení, skalních puklinách nebo budovách. Hnízdo obývá 300 jedinců.<sup>26</sup>



Obrázek 9: Čmelák skalní (Linnaeus, 1758)<sup>27</sup>

Čmelák proměnlivý (*Bombus humilis*) se vyskytuje v nižších až středních polohách především na otevřených travnatých a stepních biotopech (Obrázek 10). Je málo hojný.<sup>26</sup>



Obrázek 10: Čmelák proměnlivý (Illiger, 1806)<sup>27</sup>

Pačmelák český (*Bombus bohemicus*) je podobný svému hostiteli čmeláku hájovému (Obrázek 11). Patří mezi hojné druhy.<sup>26</sup>



Obrázek 11: Pačmelák český (Seidl, 1837)<sup>27</sup>



## 1.6 Metoda izolace peptidů

Izolace peptidů je možné provádět dvěma způsoby, buď elektromigračními, nebo chromatografickými metodami. Mezi elektromigrační metody se řadí kapilární zónová elektroforéza a zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Tento způsob izolace je založen na elektroforetickém pohybu ionizovaných částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Druhou možností jsou chromatografické metody a to chromatografie na iontoměničích a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC).<sup>29</sup>

### 1.6.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

Tato metoda se používá ke kvalitativním a kvantitativním analýzám mnoha biologicky aktivních látek. Chromatografické chování ovlivňuje řada fyzikálně - chemických vlastností látek, které se projeví v separačním procesu, jenž závisí na interakcích analytu se stacionární a mobilní fází při putování kolonou. V systému obrácených (reverzních) fází nese stacionární náplň hydrofobní skupiny, které pomocí hydrofobních interakcí zdržují analyt v chromatografické koloně, čímž je způsobena jeho pozdější eluce a detektor zaznamenává různé retenční časy ( $t_R$ ). Mobilní fáze je polární a pro zlepšení selektivity se v některých případech používá gradientová eluce.<sup>29-31</sup>

Pro izolaci peptidů se jako nepolární stacionární fáze používá modifikovaný silikagel s chemicky vázanými oktadecylovými řetězci (C 18), který se projevuje velkou hydrofobicitou. Mobilní fáze je tvořena směsí polárních rozpouštědel, jako je acetonitril (ACN) nebo methanol s vodou nebo vodným pufrem. Většinou se používá gradientová eluce, při které dochází ke změně složení mobilní fáze v průběhu analýzy.<sup>30,31</sup>

## 1.7 Metody analýzy peptidů

Po izolaci peptidů následuje jejich analýza. K jejímu provedení se používá několik různých metod a to buď přímé, nebo nepřímé. Mezi přímá stanovení lze zařadit

absorpční spektrometrii, emisní fluorescenční spektroskopii a také hmotnostní spektrometrii. Na druhé straně jsou měření nepřímá, která jsou založena na spektrofotometrii, při které se proměřují barevné komplexy peptidů s činidly.<sup>29</sup>

Nejlepším detektorem při RP-HPLC peptidů obsahujících méně než 25 aminokyselin je hmotnostní spektrometrie (MS), která umožňuje zjistit molární hmotnost peptidů a určit i jeho složení. Nejčastějšími typy ionizace jsou ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI).<sup>29</sup>

K určení sekvence peptidů nebo proteinů se používá mnoho různých postupů, které se vybírají podle specifických vlastností studovaných látek. Pro navržení sekvence je vhodná "de novo" sekvenace a k přesnému určení metoda Edmanova odbourávání. Při identifikaci pomocí MS se metody rozdělují podle přístupu k analýze na "Bottom up", kdy nejprve dochází ke štěpení proteinu a vzniklé peptidy se analyzují pomocí MS anebo "Top down", ve které se celý protein rovnou analyzuje MS bez předchozího štěpení.<sup>32,33</sup>

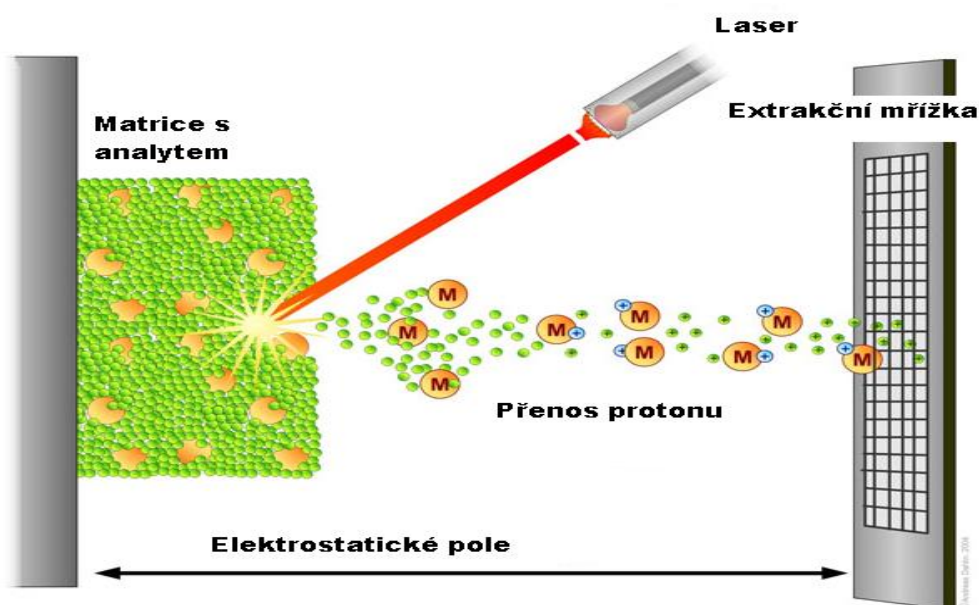
### 1.7.1 Hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice

Metoda MALDI se řadí mezi "měkké" ionizační techniky, které při ionizaci dodávají analytům malé množství vnitřní energie. Vzniká větší množství protonovaných nebo deprotonovaných molekul a menší počet fragmentů. Velmi často se tato ionizační technika vyskytuje v kombinaci s průletovým analyzátozem (TOF). Spojení těchto technik se rozvinulo v cenný nástroj detekce a charakterizace biopolymerů, jako jsou peptidy, bílkoviny, oligosacharidy a nukleotidy. Kombinace MALDI-TOF je preferována díky pulznímu charakteru iontového zdroje, který vyhovuje spojení s průletovým hmotnostním analyzátozem. Pro získání kvalitního spektra je důležité vybrat vhodnou matici k danému analytu. Často to jsou organické kyseliny, např.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxykyselinová (HCCA), 2,5-dihydroxybenzoová nebo sinapová. MALDI matrice jsou většinou krystalické pevné látky, které absorbují energii laserového paprsku o určité vlnové délce. Velmi krátké časové intervaly laserového pulzu zabraňují tepelné degradaci analytu.<sup>33,35-37</sup>

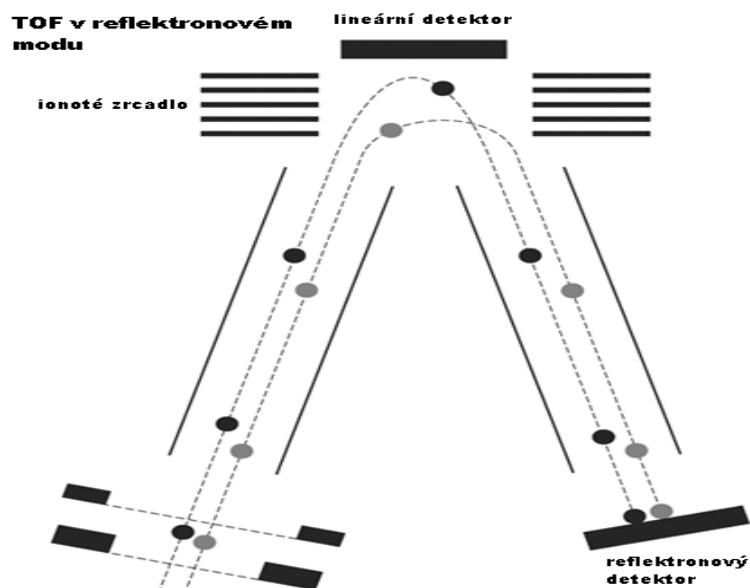
Vzorek se připravuje smícháním matrice a analytu na MALDI terči z nerezové oceli. Směs se nechá odpařovat za pokojové teploty. Poté je terč zaveden do přístroje a ozařován krátkými laserovými pulzy (Obrázek 12). K MALDI v ultrafialové (UV)

oblasti se používá dusíkový laser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ). Po ozáření vzorku matrice absorbuje energii z pulzu, který způsobí její desorpci. Částice odpařující se z matrice sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. K ionizaci analytu dochází pomocí přenosu protonu z excitovaných molekul matrice. MALDI spektra se vyznačují silnými signály jednou nabitých iontů, ve spektru lze nalézt protonovanou formu  $[M+H]^+$ , kterou doprovází adukty s alkalickými kovy  $[M+Na]^+$  a  $[M+K]^+$ . Alkalické kovy pocházejí buď jako příměs ze skla, reagentů nebo použitých rozpouštědel. Mezi deskou a mřížkovou elektrodou, které jsou od sebe vzdáleny několik centimetrů, jsou ionizované molekuly urychleny napěťovým pulzem a dále měřeny TOF analyzátozem. Ionty získávají stejnou energii a dostávají se do urychlovacího pole, kde analyzátor vyhodnocuje čas, za který iont překoná dráhu v letové trubici. Ionty, které mají stejnou počáteční energii a různou hmotnost doletí k detektoru v různých časech.<sup>33,35-37</sup>

K získání lepší citlivosti, přesnosti a rozlišení se používá průletový analyzátor v reflektroevém módu (Obrázek 13). Reflektroev neboli iontové zrcadlo prodlužuje délku letové trubice tím, že ionty odráží zpět po mírně vychýlené dráze k detektoru, nejčastěji mikrokanálové desce (MCP). Signál detektoru je zpracován počítačem a dále interpretován.<sup>33,35</sup>



Obrázek 12: Schéma ionizace MALDI.<sup>38</sup>

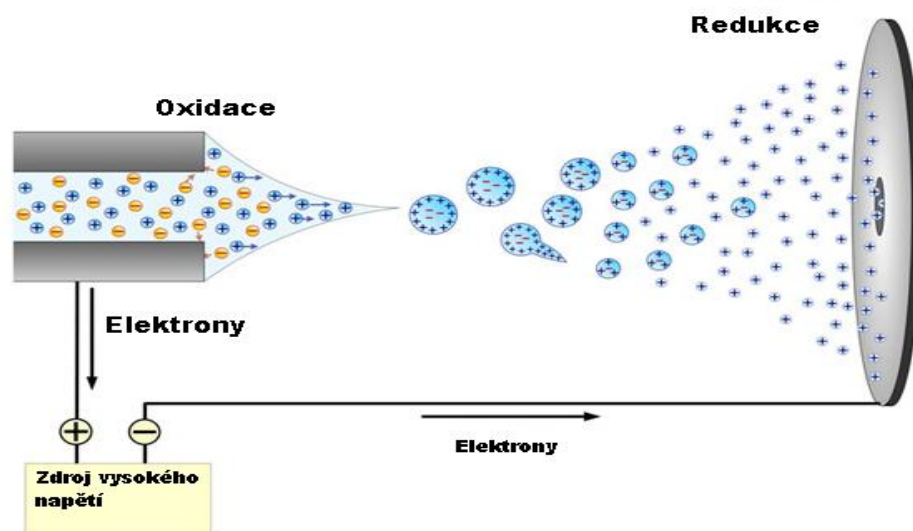


Obrázek 13: Schéma TOF analyzátoru s reflektorem.<sup>39</sup>

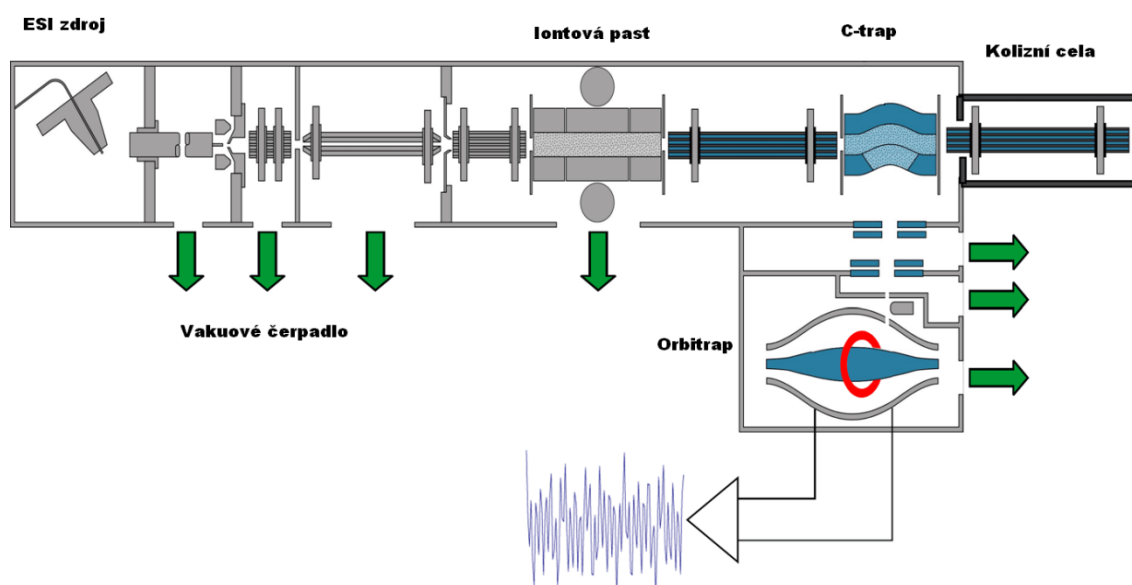
### 1.7.2 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

Podobně jako MALDI se elektrosprej řadí k "měkkým" ionizačním metodám. Často se využívá k analýze velkých biomolekul, jako jsou proteiny a oligonukleotidy. Při tomto typu ionizace mohou vznikat několikrát nabité ionty, tím pádem není dán hmotnostní limit. Spektra lze následně zpracovat dekonvolučními algoritmy, které převedou vícekrát nabité ionty na jednu nabitě.<sup>40-42</sup>

Nařaděný vzorek vstupuje do kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na konci kapiláry se tvoří kónický meniskus, ze kterého dochází k uvolňování kapaliny ve formě nabitého aerosolu. Přídavkem sušícího plynu dochází k rychlejšímu odpaření rozpouštědla. Postupně se zvyšuje hustota náboje až do doby překročení Rayleighova limitu, což má za následek tzv. "Coulombickou explozi", která se projeví rozštěpením kapky na části o menším poloměru (Obrázek 14). Tímto způsobem se tvoří ionty, které vstupují do hmotnostního analyzátoru. Jako analyzátor může být použit hybridní analyzátor lineární iontová past s orbitrapem (LTQ-orbitrap).<sup>40-42</sup>



Obrázek 14: Schéma ionizace ESI.<sup>38</sup>

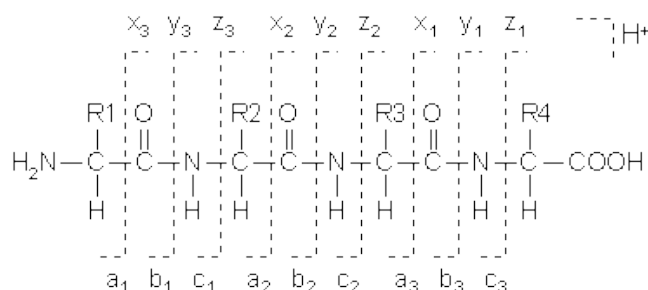


Obrázek 15: Schéma přístroje ESI-LTQ orbitrap.<sup>43</sup>

Přístroj ESI-LTQ orbitrap (Obrázek 15) je vhodným nástrojem k analýze peptidů. V iontové pasti dochází k vybrání prekursoru, který se nízkoenergetickou kolizně indukovanou disociací (CID) rozpadne na fragmenty. Ionty se také mohou rozštěpit pomocí vysokoenergetické (1 - 3 keV) kolizní disociace (HCD) v kvadrupólové kolizní cele. HCD vytváří immoniové ionty, díky kterým dochází k potvrzení AMK v sekvenci. Přesná hmotnost je změřena orbitrapem, který dosahuje vysokých rozlišení a citlivostí.<sup>44-47</sup>

### 1.7.3 "De novo" sekvenování

"De novo" sekvenování využívá tandemovou hmotnostní analýzu MS/MS. Spektra obsahují ionty série b a y, které vznikají štěpením peptidových vazeb (Obrázek 16). Rozdíl mezi b a y ionty je určen podle toho, na kterém peptidovém zbytku zůstane po rozštěpení vazby náboj. B-ionty obsahují N-koncovou část peptidu, zatímco y-ionty obsahují C-koncovou část peptidu. Číselné označení iontů uvádí počet fragmentů AMK. Tyto ionty se od sebe vzájemně liší o zbytky AMK, což umožňuje ze získaných spekter přímo odečíst sekvence. "De novo" sekvenování je vhodná metoda především k získání sekvencí, které nejsou v databázích. Nevýhodou je, že z jednoho spektra lze často navrhnout více možných sekvencí a nelze rozlišit AMK se stejnou hmotností.<sup>47,49,50</sup>



**Obrázek 16: Způsob štěpení peptidové vazby pomocí MS/MS. Rozštěpením peptidové vazby vzniknou částice obsahující N a C-koncovou část peptidu. Značení a, b, c se používá pro N-koncovou část a x, y, z pro C-koncovou část. Dolní index značení udává počet AMK v daném fragmentu.<sup>48</sup>**

### 1.7.4 Edmanovo odbourávání

Při této metodě dochází k postupnému odbourávání jednotlivých AMK z N-konce peptidu. Je založena na účinku fenyliothiokyanátu reagujícího s volnou  $\text{NH}_2$ -skupinou za vzniku fenylothiokarbamylderivátu. Ten se působením  $\text{HCl}$  změní na fenylothiohydantoinový derivát AMK a zůstane peptidický řetězec, který má o jednu AMK méně. Ve srovnání s tandemovou hmotnostní spektrometrií má Edmanovo odbourávání výhodu v rozlišení isoleucinu a leucinu, které mají stejnou hmotnost. Problém nastává při určení peptidů s N-koncovou modifikací, což bývá způsobeno acetylací této AMK nebo v případě, že je N-koncová AMK kyselina pyroglutamová.<sup>47,49,51,52</sup>

Pro některé peptidy byla sekvence nezávisle stanovena pomocí Edmanova odbourávání, které bylo provedeno v laboratoři proteinové analýzy ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Ing. Zdeňkem Voburkou na přístroji Procise-Protein Sequencing System (Applied Biosystems, USA).

## 1.8 Zjištění antimikrobiální aktivity

Všechny vzorky byly testovány na antimikrobiální aktivitu. Toto měření bylo provedeno RNDr. Vladimírem Fučíkem, CSc. ze skupiny antimikrobiálních peptidů ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Byla využita agarová difúzní metoda s bakterií *Micrococcus luteus*.

V příloze 3 je zobrazen výsledek agarového difúzního testu zjištěných peptidů. Po nanesení roztoků peptidů na agar došlo k usmrcení bakterií kultivovaných v agaru (vzniklé čisté místo), čímž byla potvrzena antimikrobiální aktivita studovaných peptidů.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo izolovat, analyzovat a určit sekvenci nových přírodních peptidů, které by vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Jako zdroj peptidů byly použity extrakty pocházející z jedových rezervoárů různých druhů čmeláků.

Peptidy byly izolovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi. Následně byly analyzovány laserovou ionizací za spoluúčasti matrice ve spojení s průletovým analyzátozem a ionizací elektrosprejem s hybridním LTQ-orbitrap analyzátozem. Byla zjištěna molekulová hmotnost izolovaných peptidů.

Pro nalezení sekvence peptidů byla vypracována metoda MS/MS *"de novo"* sekvenování. Dále byly tyto přírodní peptidy testovány, zda mají antimikrobiální vlastnosti proti  $G^+$  a  $G^-$  bakteriím.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Biologický materiál

- Čmelák zemní (BT) – (3x - dělnice) laboratorní chov doc. RNDr. Vladimíra Ptáčka, CSc. z Masarykovy univerzity v Brně
- Čmelák hájový (BL) – (3x - královna) laboratorní chov doc. RNDr. Vladimíra Ptáčka, CSc. z Masarykovy univerzity v Brně
- Čmelák zahradní (BH) – (1x - dělnice) Dobříš
- Čmelák skalní (BU) – (1x - královna) Bílé Karpaty
- Čmelák rokytový (BY) – (1x - dělnice) Horní Albeřice
- Čmelák luční (BL) – (1x - královna) Horní Albeřice
- Čmelák proměnlivý (HU) – (2x - dělnice) Prokopské údolí v Praze
- Pačmelák český (BC) – (2x - královny) Ranná v Českém středohoří

### 3.2 Chemikálie

- H<sub>2</sub>O pro HPLC (ÚOCHB AV, Praha, ČR)
- acetonitril (Chromasolv® pro HPLC, Sigma Aldrich, Německo)
- methanol (Chromasolv® pro LC-MS, Sigma Aldrich, Německo)
- kyselina trifluoroctová (TFA, p.a, Riedel-de Haën, Německo)
- kyselina mravenčí (FA, p.a., Lachema, Brno, ČR)
- matrice  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (Sigma Aldrich, Německo)
- aceton (p.a., Penta, Praha, ČR)
- směs peptidů Peptide calibration standard (Bruker Daltonics, Německo)
- směs peptidů LTQ ESI Positive calibration solution (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 3.3 Separace jedové žlázy

Preparace jedových váčků z jednotlivých druhů čmeláků byla provedena RNDr. Oldřichem Hovorkou, Ph.D. pod mikroskopem (Olympus SZ61, Velká Británie) v Petriho misce s vodou pomocí mikropinzet. Váček byl posléze v mikrozkuhavce typu

Eppendorf mechanicky narušen a suspendován v 25  $\mu$ l roztoku, který byl tvořen směsí 50 % ACN + 49,9 % H<sub>2</sub>O pro HPLC + 0,1 % TFA. Tkáň jedového váčku byla oddělena mikrocentrifugací (Mechanika Precyzyjna, Polsko).

### 3.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

Extrakt z jedového váčku byl nadávkován pomocí nástřikového ventilu (Rheodyne, USA) do HPLC systému serie 1200 (Agilent technologies, USA) vybaveného spektrometrickým detektorem s diodovým polem. Detekce byla prováděna při vlnových délkách ( $\lambda$ ) 220 nm, 254 nm a 280 nm. Tyto délky byly zvoleny jako vhodné k detekci peptidů, protože při 220 nm se detekují peptidové vazby,  $\lambda = 254$  nm je vhodná ke zjištění přítomnosti některých nízkomolekulárních organických látek a fenylalaninu a pomocí  $\lambda = 280$  nm se dá určit přítomnost tyrosinu a tryptofanu v peptidu.<sup>53</sup> Vzorek byl separován na chromatografické koloně Vydac C-18 – 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m (Grace Vydac, USA) s průtokem 1 ml/min s gradientovou elucí. Pro separace jednotlivých vzorků byla použita lineární gradientová eluce, při které se složení mobilní fáze změnilo z počátečního roztoku A (5 % ACN ve vodě s přidavkem 0,1 % TFA) během 60 minut na roztok B (70 % ACN ve vodě s 0,1 % TFA). V průběhu separace byly odebírány do mikrozkušavek frakce, které odpovídaly intenzivním píkům v chromatogramu.

Následně byly tyto frakce vysušeny za pomoci vakuového koncentrátoru (SpeedVac, Labconco, USA). K měření a vyhodnocování dat byl použit počítačový program ChemStation (Agilent technologies, USA) a pro další úpravu získaných chromatogramů program Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin®, USA). Po vysušení byly jednotlivé frakce rozpuštěny v 10  $\mu$ l směsi (50 % ACN + 49,9 % H<sub>2</sub>O pro HPLC + 0,1 % FA) a dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

### 3.5 Hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice

Vzorky pro MALDI analýzu byly připraveny nanesením 1  $\mu$ l matrice (nasycený roztok HCCA ve směsi 97 % aceton + 2,9 % H<sub>2</sub>O pro HPLC + 0,1 % TFA). Poté se nanesl 1  $\mu$ l vzorku nebo směs kalibračního standardu, vzniklý vzorek byl promíchán na MALDI terčiku a nechal se kokrystalizovat na vzduchu při laboratorní teplotě. K analýze byl použit přístroj Reflex IV (Bruker Daltonics, Německo). MALDI deska

byla vložena do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Následně byl k ionizaci/desorpci vzorku použit UV laser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) a vzniklé ionty byly dále urychleny napětím o velikosti 20 kV do TOF analyzátoru s reflektorem. Vzorek na MALDI terčiku byl sledován kamerou, což umožňovalo vybrat vhodné místo k ionizaci laserovým impulzem o relativní intenzitě v rozmezí 40 – 60 %. Získaná hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu do hodnoty 3000  $m/z$ . Spektra byla průměrována ze 150 laserových pulzů. Ke sběru dat byl využit počítačový program FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Německo) a k vyhodnocení dat program FlexControl 1.1.46.0 (Bruker Daltonics, Německo).

### 3.6 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

K ESI ionizaci byly extrakty jedových žláz naředěny 30  $\mu\text{l}$  roztoku (methanol :  $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1), 2  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku byly ještě jednou naředěny 20  $\mu\text{l}$  směsí rozpouštědel (methanol :  $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1). Poté byly vzorky dále promíchány na vortexu (Velp scientifica, Itálie) a odstředěny pomocí centrifugy (Eppendorf, USA). Takto připravené extrakty žláz byly dávkovány mikrostříkačkou (Hamilton, USA) pomocí nástřikového ventilu přístroje LTQ orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) do proudu mobilní fáze, jejíž průtok byl nastaven na 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  a složení (50 % metanolu + 50 %  $\text{H}_2\text{O}$  pro HPLC). Měření bylo prováděno při rozlišení  $10^5$ . Po vybrání vhodného prekurzoru byly ze získaného hmotnostního spektra odečteny přesné hmoty vícekrát nabitých iontů k dalšímu proměření fragmentačních spekter. Před fragmentací byla vyhledána nejvhodnější hodnota kolizní energie pro CID i pro HCD měření. Pro měřené hodnoty byl rozsah  $m/z$  při CID (1/3 Mr - 2000) a pro HCD (50 – 2000). Šířka izolačního okna byla zadána 10  $m/z$ . Data byla snímána počítačovým programem Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 3.7 "De novo" sekvenování

Do programu Peaks 4.5 (© Bioinformatics Solutions Inc., Kanada) byly importovány všechny záznamy MS/MS spekter získané pomocí ESI-LTQ orbitrapu z různých nábojových stavů určitého prekurzoru. Následně byly všechny data spojené do jednoho spektra vhodného k sekvenaci "de novo", kdy došlo k vyhodnocení rozdílů jednotlivých AMK mezi fragmentačními píky ve spektru.<sup>54</sup> Spektra byla převedena dekonvolučními algoritmy na jedenkrát nabité ionty. K optimalizaci parametrů metody "de novo" byl

použit vzorek jehož sekvence byla porovnávána s výsledky Edmanova odbourávání a sekvencemi publikovanými v literatuře.<sup>22</sup> Parametry s největší shodou byly nastaveny k určení ostatních vzorků s neznámou sekvencí. Hodnoty chybové tolerance prekurzoru byly 5 ppm a fragmentu 0,01 Da.

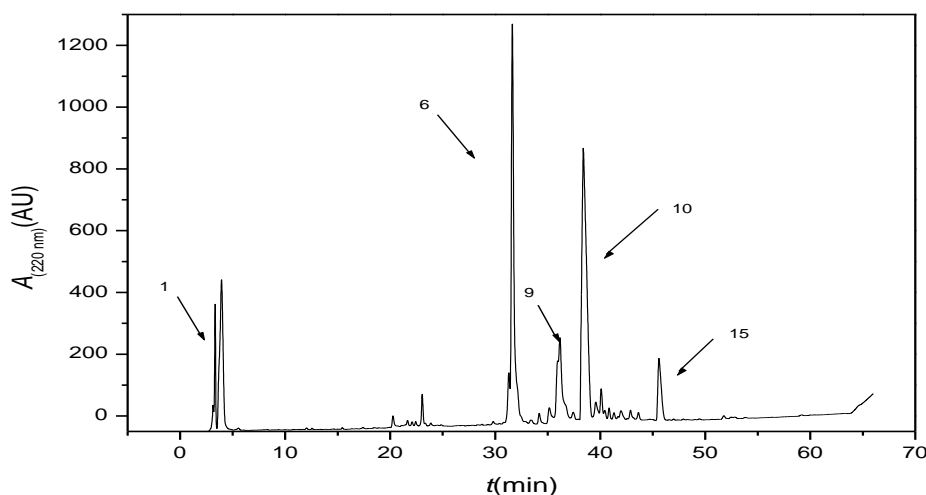
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Chromatografická separace extraktu

Z jedových extraktů čmeláků byly při separaci RP-HPLC odebrány nejintenzivnější frakce. Extrakt z jedového váčku čmeláka zemního poskytl chromatogram zobrazený na obrázku 17.

Bylo odebráno 15 frakcí, z čehož 5 frakcí poskytlo intenzivní píky, a to píky číslo 1, 6, 9, 10 a 15 s retenčními časy 3,4 min, 31,6 min, 36,2 min, 38,4 min a 45,6 min. První pík v chromatogramu je nástřikový, a proto nebyl dále proměřován. Po změření všech frakcí metodami MALDI a ESI se podařilo získat hmotnostní spektra z píků č. 10 a 15. Ostatní intenzivní píky, neposkytly hmotnostní spektra, která by se dala dále interpretovat, což může znamenat, že se jedná o vysokomolekulární látky, které se v měřeném rozpětí nezobrazily (píky č. 6 a 9).

V tabulce 1 jsou uvedena čísla odebíraných frakcí z určitého druhu čmeláka spolu s retenčními časy příslušných píků. Z průběhu některých chromatogramů zobrazených v příloze 4 - 10 lze dobře vidět, že jednotlivé píky představovaly směsi peptidů, což bylo potvrzeno i jejich další analýzou.



Obrázek 17: RP-HPLC chromatogram extraktu čmeláka zemního. Podmínky měření viz kapitola 3.4.

**Tabulka 1: Retenční časy intenzivních píků, které poskytly použitelná hmotnostní spektra. Jednotlivé chromatografické záznamy jsou zobrazeny v příloze 4 - 10.**

Čmelák zemní		Čmelák zahradní		Čmelák rokytový		Čmelák luční	
Obrázek 17		Příloha 4		Příloha 5		Příloha 6	
Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)
6	31,6	6	37,3	9	36,4	6	33,8
9	36,2	7	39,0	10	37,6	7	37,0
10	38,4	8	40,8	11	45,5	8	41,9
15	45,6	10	44,2				
Čmelák hájový		Čmelák skalní		Čmelák proměnlivý		Pačmelák český	
Příloha 7		Příloha 8		Příloha 9		Příloha 10	
Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)	Frakce č.	Retenční čas (min)
20	44,8	5	34,9	3	38,9	10	40,3
22	51,7	7	38,0	4	41,3	12	51,4
				5	42,0	13	54,6
				6	42,4		
				7	43,5		
				8	49,4		

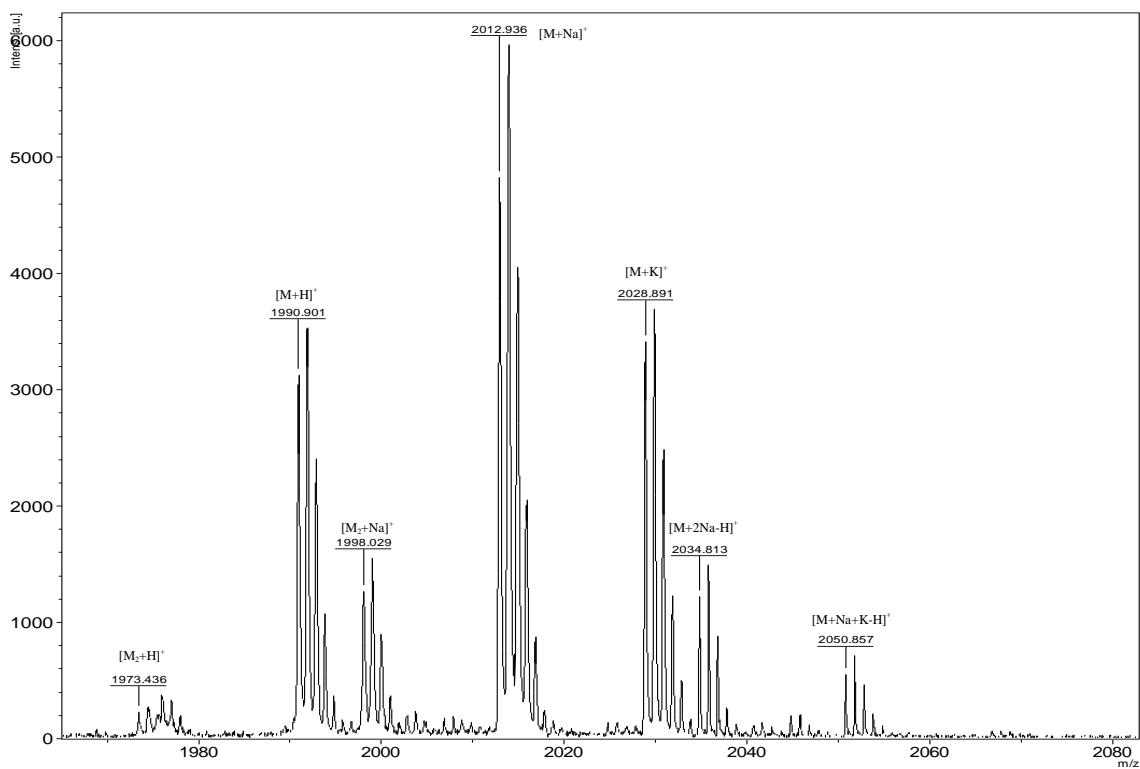
## 4.2 Analýza extraktu jedových žláz metodou laserové ionizace za spoluúčasti matrice

MALDI spektra zobrazují jedenkrát nabitě ionty spolu se sodnými a draselnými adukty. Ionty, které vytvářejí adukty, mohou pocházet ze skla použitých nádob, reagensů nebo rozpouštědel.

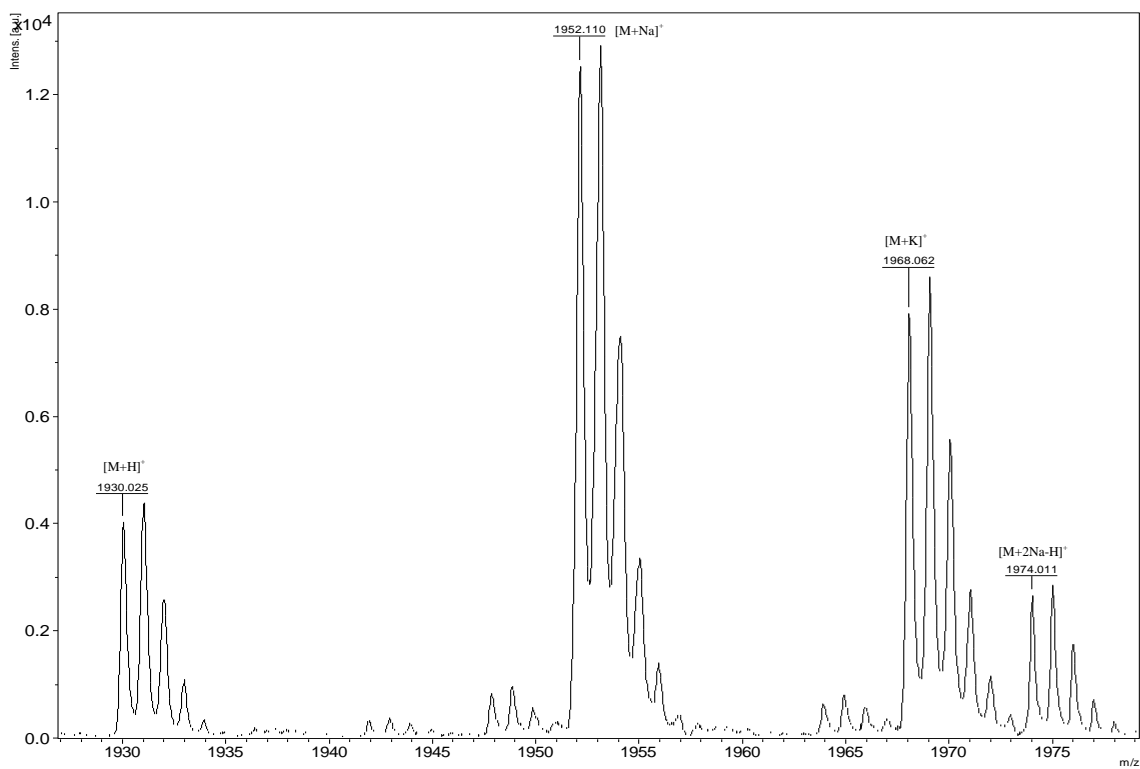
V hmotnostním spektru frakce č. 10 (Obrázek 18) je patrný intenzivnější peptid s relativní molekulovou hmotností 1989,9. Dále jsou ve spektru patrné i další píky s menší intenzitou, které mohou být způsobeny příměsí dalšího peptidu ( $M_r$  1972,4) ve frakci. První pík ve spektru s hodnotou  $m/z$  1990,9 náleží aduktu s protonem. Další pík má hodnotu  $m/z$  2012,9 a tvoří ho sodný adukt, poslední pík s hodnotou  $m/z$  2028,9 je adukt s draselným iontem. Zasolení vzorku lze pozorovat na dalších sodných a draselných aduktech  $[M+2Na-H]^+$  a  $[M+Na+K-H]^+$ .

Obrázek 19 zobrazuje MALDI spektrum frakce č. 15 s  $[M+H]^+$  s hodnotou  $m/z$  1930,0,  $[M+Na]^+$  s  $m/z$  1952,1 a  $[M+K]^+$  s  $m/z$  1968,1. Z těchto hodnot je patrné, že relativní molekulová hmotnost peptidu je 1929,0.

Ostatní hodnoty z měření metodou MALDI jsou zobrazeny v tabulce 2 i s odkazem na spektra.



Obrázek 18: MALDI spektrum píku č. 10 z extraktu jedové žlázy čmeláka zemního. Podmínky měření viz kapitola 3.5.



Obrázek 19: MALDI spektrum píku č. 15 z extraktu jedové žlázy čmeláka zemního. Podmínky měření viz kapitola 3.5.

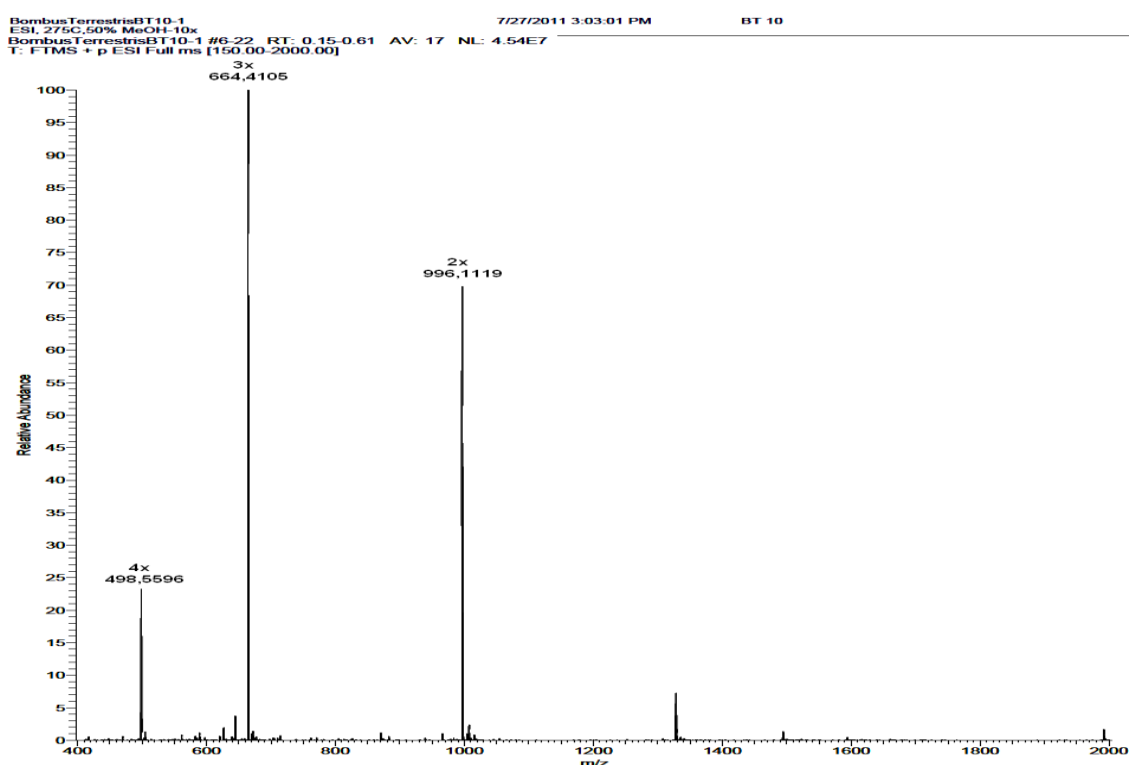
### 4.3 Analýza extraktu jedových žláz metodou elektrosprejové ionizace

Z hmotnostních spekter získaných elektrosprejovou ionizací vzorku (Obrázek 20 a 21) byly odečteny hodnoty  $m/z$  několikanásobně nabitých iontů, které byly dále fragmentovány a vyhodnocovány metodou "de novo" sekvenování.

Pro frakci č. 10 ze vzorku čmeláka zemního byly odečteny hodnoty  $m/z$  498,5596 (4x nabitý),  $m/z$  664,4105 (3x nabitý),  $m/z$  996,1119 (2x nabitý). Ve spektru je patrný i další pik, který zobrazuje fragment získaný fragmentací dalšího peptidu.

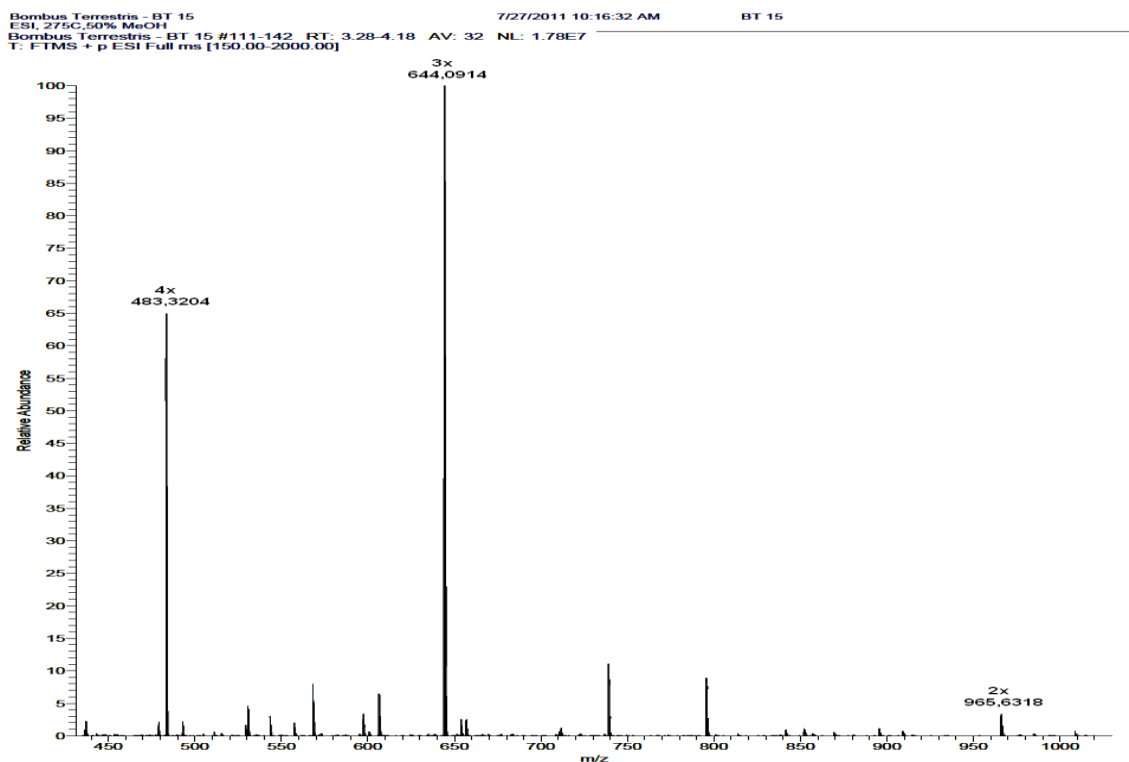
Z hmotnostního spektra frakci č. 15 (Obrázek 21) byly získané hodnoty nábojových stavů  $m/z$  483,3204 (4x nabitý),  $m/z$  644,0914 (3x nabitý) a  $m/z$  965,6318 (2x nabitý).

Obě frakce poskytly fragmentační spektra vhodná ke zpracování sekvenční metodou "de novo". Hodnoty nábojových stavů pro jednotlivé vzorky spolu s odkazem na získaná spektra jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek 20: ESI hmotnostní spektrum frakce č. 10 z extraktu jedu čmeláka zemního. Podmínky měření viz kapitola 1.7.2.



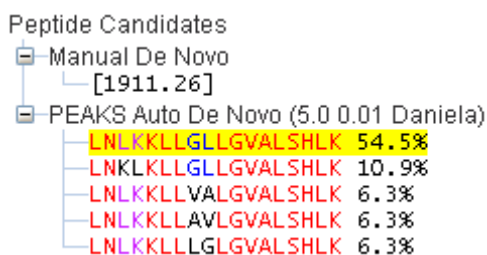


Obrázek 21: ESI hmotnostní spektrum frakce č. 15 z extraktu jedu čmeláka zemního. Podmínky měření viz kapitola 1.7.2.

#### 4.4 Sekvenace metodou "de novo"

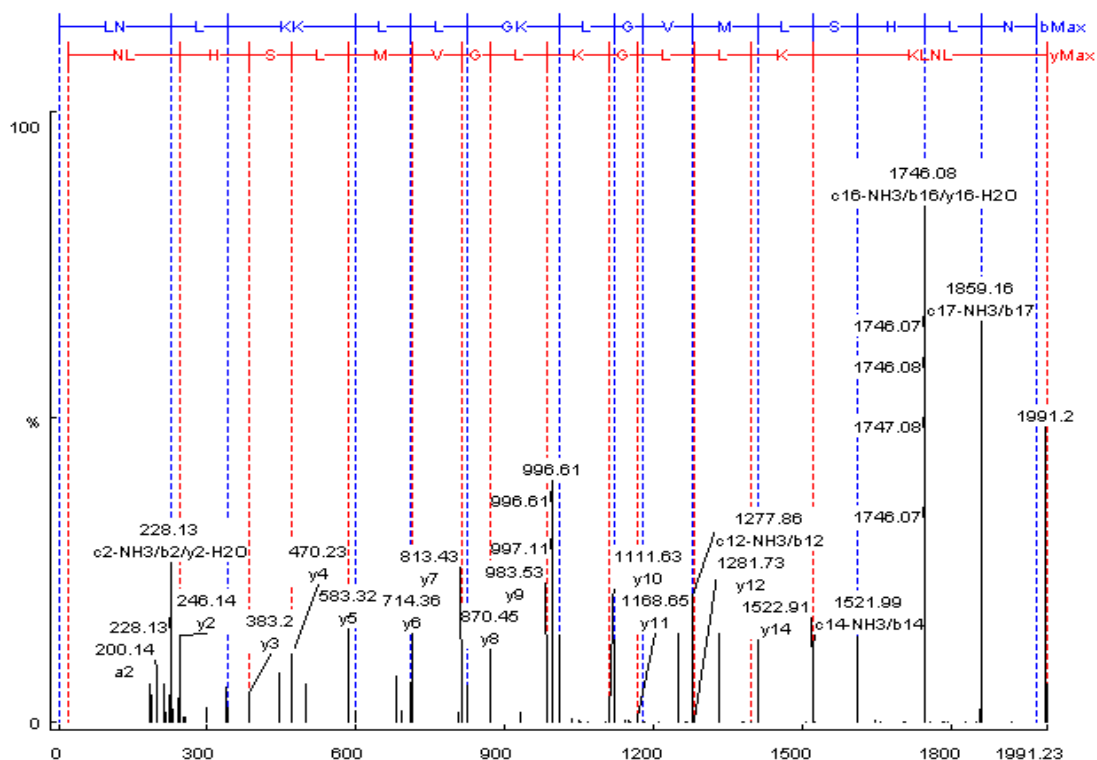
K optimalizaci metody "de novo" byly použity vzorky s již publikovanou sekvencí peptidu.<sup>22</sup> Zjištěné sekvence zkoumaných čmeláků i s odkazem na získané fragmentační spektra jsou prezentovány v tabulce 2.

Nevýhoda zjišťování sekvence metodou "de novo" spočívá v nemožnosti rozlišit stejné hmotnosti a to jak v případě jednotlivých AMK (leucin a isoleucin) tak i v jejich součtu např. glycin spolu s leucinem má stejné elementární složení, a tedy i hmotnost v porovnání s alaninem a valinem. S tím souvisí i navržení množství sekvencí. Jednotlivé AMK v navržených sekvencích programem Peaks 4.5 jsou rozlišeny barevnými kódy (Obrázek 22). Pravděpodobnost shody sekvence a získaného spektra spolu se zjištěnými sekvencemi jsou zobrazeny v tabulce 2.

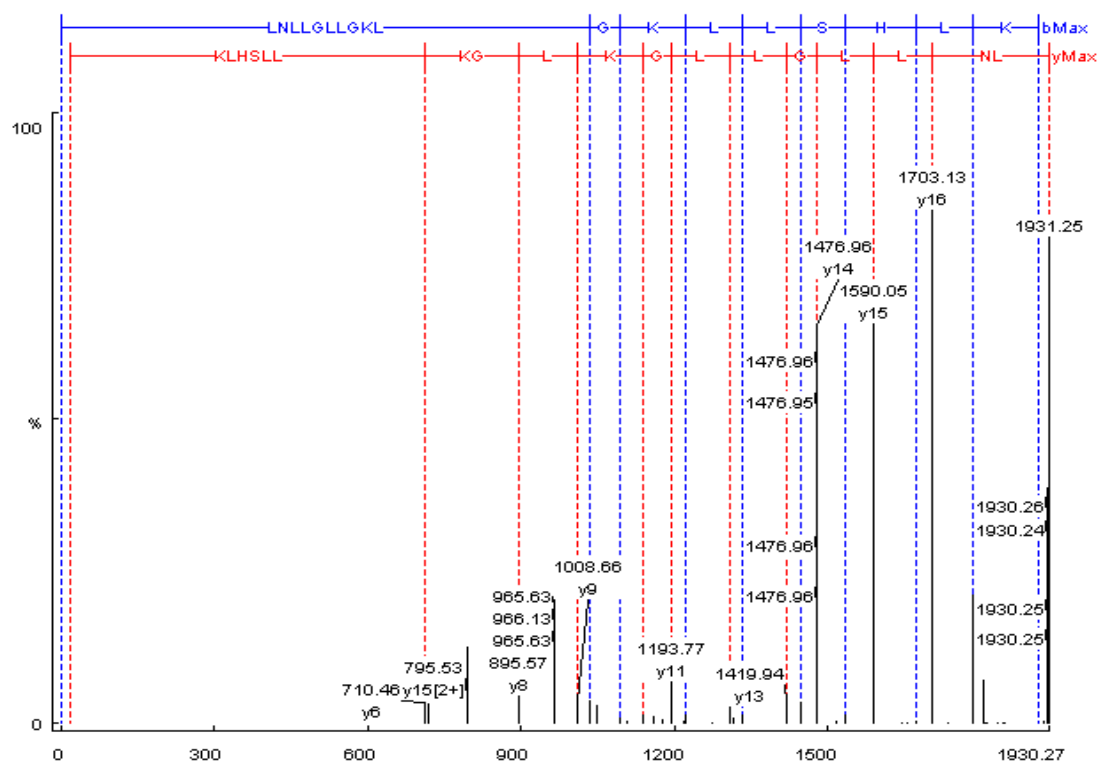


Obrázek 22: Navržené sekvence metodou "de novo" pomocí programu PEAKS 4.5. Barevný kód určuje, s jakou pravděpodobností se určitá AMK vyskytuje na daném místě v sekvenci: >90% 80-90% 60-80% <60%.

Pro peptid z frakce č. 10 byla metodou "de novo" sekvenování zjištěna sekvence H-LNLKLLGKLGVMLSHLN-OH a pro frakci č. 15 byla odečtena sekvence H-LNLLGLLGKLGKLLSHLK-OH. Obě získané sekvence se shodují s výsledky Edmanova odbourávání. Fragmentační spektra byla převedena na jedenkrát nabitě ionty pomocí algoritmů dekonvolučního programu. Ve spektrech zobrazených na obrázcích 23 - 24 je patrné rozdělení iontů do sérií b a y, a také navržená sekvence peptidu. V některých spektrech jsou při nižších hmotách patrné hodnoty imoniových iontů, které potvrzují výskyt jednotlivých AMK v sekvenci.



Obrázek 23: Fragmentační spektrum píku č. 10 z extraktu jedu čmeláka zemního. Spektrum získáno po dekonvoluci a zpracování fragmentů nábojových stavů peptidu s Mr 1990,231.



**Obrázek 24:** Fragmentační spektrum píku č. 15 z extraktu jedu čmeláka zemního. Spektrum získáno po dekonvoluci a zpracování fragmentů nábojových stavů peptidu s Mr 1929,273.

**Tabulka 2: Přehled peptidů izolovaných z jedových žláz čmeláků.**

retenční frakce č.	antimikrobiální čas (min) aktivita	MALDI				ESI			"De novo"			Edmanovo odbourávání		počet AMK	Spektra	
		m/z				nábojový stav	m/z fragmentů	Mr ESI	sekvence	% pravděpodobnosti	Mr "de novo"	sekvence	Mr sekvence			
[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	Mr MALDI													
Čmelák zemní																
BT 10	38,4	AKTIVNÍ	1990,9	2012,9	2028,9	1989,9	4x	498,5596	1990,2310	H-LNLKKLLGKLGVMLSHLN-OH	21,5%	1990,2126	H-LNLKKILGKIGVMSHLN-OH	1990,2130	18	Obrázek 18, 20, 22
							3x	664,4105								
							2x	996,1119								
BT 15	45,6	AKTIVNÍ	1930,0	1952,1	1968,1	1929,0	4x	483,3204	1929,2730	H-LNLLGLLGKLGKLLSHLK-OH	26,6%	1929,2504	H-LNILGLLGKIGKILSHLK-OH	1929,2500	18	Obrázek 19, 21, 23
							3x	644,0914								
							2x	965,6318								
Čmelák zahradní																
BH 6	37,3	AKTIVNÍ	2061,5	2083,6	2099,5	2060,5	5x	413,0534	2060,2540	H-FNFKFLAKVGLALSHLK-OH	24,8%	2060,2300	H-FNFKFLAKVGLALSHLK-OH	2060,2300	18	Příloha 11 - 13
							4x	516,0649								
							3x	687,7498								
							2x	1031,1200								
BH 7	39,0	AKTIVNÍ	2012,3	2034,3	2050,4	2011,3	5x	403,2611	2011,2940	H-KFFKLLGLLGVLSHLK-OH	24,9%	2011,2711	H-FKFKLLGLLGVLSHLK-OH	2011,2711	18	Příloha 14 - 16
							4x	503,8250								
							3x	671,4304								
							2x	1006,6404								
BH 7 (2)	39,0	AKTIVNÍ	2028,3	2050,4	2066,3	2027,3	4x	507,8048	2027,2110	H-FNFKLLGKLGKLLSHLK-OH	50,0%	2027,1933	H-FNFKLLGKIGIALSHLK-OH	2027,1930	18	Příloha 14, 15, 17
							3x	676,7374								
							2x	1014,6014								
BH 8	40,8	NEAKTIVNÍ	1933,3	1955,3	1971,3	1932,3	4x	484,0413	1932,1550	H-FNFKFLAKVGLALSHL-OH	41,1%	1932,1350	H-FNFKFLAKVGLALSHL-OH	1932,1350	17	Příloha 18 - 20
							3x	645,0521								
							2x	967,0725								
BH 10	44,2	AKTIVNÍ	1930,5	1952,6	1968,5	1929,5	4x	483,3200	1929,2770	H-LNLKKLLGLLGVLSHLK-OH	64,3%	1929,2504	H-LNKKLLGLLGVLSHLK-OH	1929,2504	18	Příloha 21 - 23
							3x	644,0964								
							2x	965,6303								

retenční frakce č.	antimikrobiální čas (min) aktivita	MALDI m/z				ESI			"De novo"			Edmanovo odbourávání		počet AMK	Spektra	
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	Mr MALDI	nábojový stav	m/z fragmentů	Mr ESI	sekvence	% pravděpodobnosti	Mr "de novo"	sekvence	Mr sekvence			
Čmelák rokytový BY 9	36,4	AKTIVNÍ	2063,1	2085,1	2101,2	2062,1	4x 3x 2x	516,5750 688,4302 1032,1398	2062,2900	H-KLLKDLLGKLVMLSHLN-OH	59,7%	2062,2701	H-IKLDILGKLVMLSHLN-OH	2062,2699	18	Příloha 24 - 26
BY 10	37,6	NEAKTIVNÍ	1961,0	1983,0	1999,0	1960,0	neposkytl spektra									Příloha 27, 28
BY 11	45,5	AKTIVNÍ	1960,2	1982,2	1959,2	1959,2	4x 3x 2x	490,8128 654,0819 980,6181	1959,2440	H-LNLKLLGTLGLLSHLN-OH	0,749	1959,2246	H-INLKKILGTLGLLSHLN-OH	1959,2244	18	Příloha 29 - 31
Čmelák luční BR 6	33,8	NEAKTIVNÍ	1717,6	1739,7	1755,6	1716,6	4x 3x 2x	430,2813 573,3724 859,5544	1717,1170	H-LNLKLLGKLGIALSH-OH	98,2%	1717,0979	H-INLKKLLGKIGIALSH-OH	1717,0977	16	Příloha 32 - 34
BR 7	37,0	AKTIVNÍ	1944,7	1966,7	1982,7	1943,7	4x 3x 2x	487,0633 649,0819 973,1178	1944,2450	H-LNLKLLGKLGIALSHLN-OH	62,2%	1944,2249	H-INLKKLLGKIGIALSHLN-OH	1944,2247	18	Příloha 35 - 37
BR 8	41,9	AKTIVNÍ	1974,6	1996,6	2012,6	1973,6	4x 3x 2x	494,5662 659,0858 988,1233	1974,2560	H-LNLKLLGTLGKVLSHLQ-OH	38,5%	1974,2355	H-INLKKILGTIGKVLSHLQ-OH	1974,2353	18	Příloha 38 - 40
Čmelák hájový BL 20	44,8	AKTIVNÍ	1930,4	1952,4	1968,3	1929,4	4x 3x 2x	483,3190 644,0897 965,6301	1929,2680	H-LNLLGLLGKLGKLLSHLK-OH	48,2%	1929,2504	H-LNILGLLGKIGKILSHLK-OH	1929,2502	18	Příloha 41 - 43
BL 22	51,7	NEAKTIVNÍ	1802,2	1824,2	1840,2	1801,2	4x 3x 2x	451,2959 601,3925 901,5842	1801,1770	H-LNLLGLLGKLGKLLSHL-OH	11,8%	1801,1554	H-LNILGLLGKIGKILSHL-OH	1801,1554	17	Příloha 44 - 46
Čmelák skalní BU 5	34,9	NEAKTIVNÍ	2074,4	2096,4	2112,4	2073,4	neposkytl spektra									Příloha 47, 48
BU 7	38,0	AKTIVNÍ	2173,4	2195,3	2211,3	2172,4	5x 4x 3x 2x	435,4895 544,1102 725,1434 1087,2100	2171,4350	H-LKLDLLGKLVLLSHLNK-OH	66,5%	2172,4087	H-LKLDILGKIKVLSHLN-OH	2172,4085	19	Příloha 49 - 51

retenční frakce č.	antimikrobiální čas (min) aktivita	MALDI m/z				ESI			"De novo"			Edmanovo odbourávání		počet AMK	Spektra	
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	Mr MALDI	nábojový stav	m/z fragmentů	Mr ESI	sekvence	% pravděpodobnosti	Mr "de novo"	sekvence	Mr sekvence			
Čmelák proměnlivý																
HU 3	38,9	AKTIVNÍ	1830,1	1852,1	1868,1	1829,1	4x 3x 2x	458,2978 610,7276 915,5856	1829,1820	H-VNLKDLLGKLGKVL AHL-NH <sub>2</sub>	89,3%	1829,1616	H-VNIKDIIGKLGKVL AHL-NH <sub>2</sub>	1829,1614	17	Příloha 52 - 54
HU 5	42,0	AKTIVNÍ	1743,0	1765,1	1781,1	1742,0	4x 3x 2x	436,5394 581,7170 872,0707	1742,1500	H-LNVLGLLGKLGKVL AHV-NH <sub>2</sub>	11,0%	1742,1295	H-INVLGILGKLGKVL AHV-NH <sub>2</sub>	1742,1293	17	Příloha 55 - 57
HU 6	42,4	AKTIVNÍ	1773,0	1795,1	1811,1	1772,0	4x 3x 2x	444,0420 591,7205 887,0760	1772,1600	H-LNVLSLLGKLGKVL AHV-NH <sub>2</sub>	37,9%	1772,1401	H-INVLSILGKLGKVL AHV-NH <sub>2</sub>	1772,1401	17	Příloha 58 - 60
HU 7	43,5	AKTIVNÍ	1803,1	1825,1	1841,1	1802,1	4x 3x 2x	451,5356 601,7117 902,0634	1802,1350	H-VNVLDVLAKVGKVL SHL-NH <sub>2</sub>	99,0%	1802,1143	H-VNVLDVLAKVGKVL SHL-NH <sub>2</sub>	1802,1143	17	Příloha 61 - 63
HU 8	49,4	AKTIVNÍ	1716,1	1738,0	1754,0	1715,1	3x 2x	572,7012 858,5471	1715,0990	H-LNVLVGLLGGKALSHL-NH <sub>2</sub>	90,1%	1715,0822	H-INVLVGLLGGKALSHL-NH <sub>2</sub>	1715,0822	17	Příloha 64 - 66
Pačmelák český																
BC 10	40,3	AKTIVNÍ	1904,2	1927,2	1943,2	1903,2	4x 3x 2x	476,8069 635,4068 952,6049	1903,2190	H-LNVSALLEKLVLSHL-NH <sub>2</sub>	95,0%	1903,1983	H-INVSAILEKLVLSHL-NH <sub>2</sub>	1903,1983	17	Příloha 67 - 69
BC 12	51,4	AKTIVNÍ	1767,1	1789,1	1805,1	1766,1	3x 2x	589,7004 884,0465	1766,0970	H-FSVLSALGKLLSHL-NH <sub>2</sub>	31,3%	1766,0819	H-FSVLSAIGKLLSHL-NH <sub>2</sub>	1766,0819	17	Příloha 70 - 72
BC 13	54,6	AKTIVNÍ	1763,2	1785,4	1801,3	1762,2	3x 2x	588,3762 882,0600	1762,1240	H-LSLLSLLGTLGKVL SHL-NH <sub>2</sub>	21,1%	1762,1081	H-ISILSLLGTLGKVL SHL-NH <sub>2</sub>	1762,1081	17	Příloha 73 - 75

## 5 DISKUZE

Vrozená imunitní obrana eukaryotních i prokaryotních buněk využívá antimikrobiální peptidy jako primární odpověď proti infekcím. AMP z hmyzu mají široký rozsah aktivity a zároveň nejsou cytotoxické. Vyznačují se amfipatickým charakterem a počet AMK se pohybuje od 12 – 40 (cit. 6).

Velikost sekvencí ze zjištěných peptidů (Tabulka 4) se pohybuje od 16 do 19 AMK a jejich amfipatický charakter je znázorněný pomocí tzv. Edmunsonovy kruhové projekce v příloze 76, v těchto helikálních kolech je patrné rozdělení kruhu na polární a nepolární část (naznačuje jejich možné antimikrobiální účinky) a také výskyt 1 – 5 lysinových zbytků obsažených v sekvencích (zajišťujících při fyziologickém pH kationický charakter  $\alpha$ -helixu, díky kterému dochází k lepšímu navázání peptidu na anionickou fosfolipidovou dvojvrstvu buněčné stěny bakteriální buňky). Lysin se vyskytuje v pozicích 9 a 12 v peptidech s amidovaným koncem a pro peptidy s volným karboxylem v pozicích 4, 5 a 9. Amidace C-konce peptidu také způsobuje zvýšení kationicity (vede k lepším antimikrobiálním účinkům).<sup>6</sup> V amidovaných peptidech je patrný častější výskyt valinu.

Porovnáním sekvencí zjištěných metodou "*de novo*" s metodou Edmanova odbourávání (Tabulka 2) se ukázaly nevýhody sekvenace "*de novo*" a to ve větším počtu navržených sekvencí. Pro vzorky BH 7 a BY 9 nebyla navržená správná sekvence, která byla zjištěna pomocí Edmanova odbourávání. Jedná se o přehození prvních dvou aminokyselin. Metoda "*de novo*" je s menší spotřebou vzorků daleko rychlejší a také má větší potenciál při zapojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v on-line módu než Edmanovo odbourávání.

Vzájemným srovnáním sekvencí získaných z jedových extraktů různých druhů čmeláku (Tabulka 4), byl pozorován opakující se trend v umístění určitých AMK na stejných pozicích v peptidech. Jako druhá AMK se často vyskytuje N, sedmá a desátá pozice je převážně obsazena L/I, na pozici osm a jedenáct se opakuje G a dále pak na konci peptidu od pozice 14 to jsou LSHL.

Čmeláky lze taxonomicky zařadit do říše živočichů, podříše mnohobuněčných, kmenu členovců, podkmenu vzdušnicovců, třídy hmyzu, podtřídy křídlatých, řádu blanokřídлых, podřádu štíhlopasých, čeledi včelovitých a rodu čmeláků.<sup>57</sup>

Na obrázku 25 je zobrazen fylogenetický strom rozdělení čmeláků do podrodů s vyznačenými zástupci. V tabulce 4 jsou jednotlivé měřené vzorky srovnávány s již publikovanými sekvencemi. Jedná se o pačmeláka ladního (*Metapsithyrus campestris*)<sup>8</sup>, čmeláka polního (*Bombus pascuorum*)<sup>4</sup>, čmeláka zemního (*Bombus terrestris*)<sup>22</sup>, čmeláka skalního (*Bombus lapidarius*)<sup>55</sup> a čmeláka pensylvánského (*Bombus pensylvanicus*)<sup>21</sup>.

V podrodě *Psithyrus* se vyskytují dva zástupci, pačmelák český a ladní, z každého byly získané tři peptidy. Srovnáním jednotlivých sekvencí těchto dvou čmeláků je patrné, že sekvence BC 12 a BMC 11 se shodují. V sekvenci peptidu BC 10 se na pozici 17 vyskytuje isoleucin, čímž se liší oproti sekvenci BMC 9, ve které je na stejné pozici umístěn leucin. U peptidu BC 13 je v sekvenci zařazen na pozici 3 isoleucin na rozdíl od sekvence BMC 12, ve které to je leucin.

Podrod *Bombus* obsahuje frakce BT 10 a BT 15 z čmeláka zemního, které jsou totožné s již dříve publikovanými peptidy označenými jako Peak 11 a Peak 12 (cit. 22). V tomto podrodě se oproti ostatním podrodům často vyskytuje na pozici 13 methionin.

Dalším podrodem je *Pyrobombus*. Odebrané frakce poskytly peptidy s 18 aminokyselinovými zbytky, kromě antimikrobiálně neaktivního vzorku BR 6, který má 16 AMK.

Podrod *Melanobombus* obsahuje jednoho měřeného zástupce a to čmeláka skalního. Vzorek BU 7 je totožný s dříve zjištěným Bombolitinem 7 (cit. 55). Také se u všech sekvencí opakuje od pozice 12 stejný konec peptidů a to VALSHLK.

Nejvíce zástupců zahrnuje podrod *Thoracobombus*, což vede také k větší rozdílnosti sekvencí. Tyto peptidy obsahují 16 AMK a zvláštností, která se opakuje v tomto podrodě na rozdíl od ostatních podrodů, je výskyt kyseliny asparagové na páté pozici.

Ve výsledných vzorcích čmeláků jsou obsaženy 3 sekvence antimikrobiálně neaktivních peptidů, jedná se o BL 22, BR 6 a BH 8. Zatímco u podrodového rozdělení antimikrobiálních peptidů se počet AMK nemění tak u neaktivních peptidů je sekvence zkrácena o 1 – 2 AMK oproti ostatním peptidům v daném podrodě.

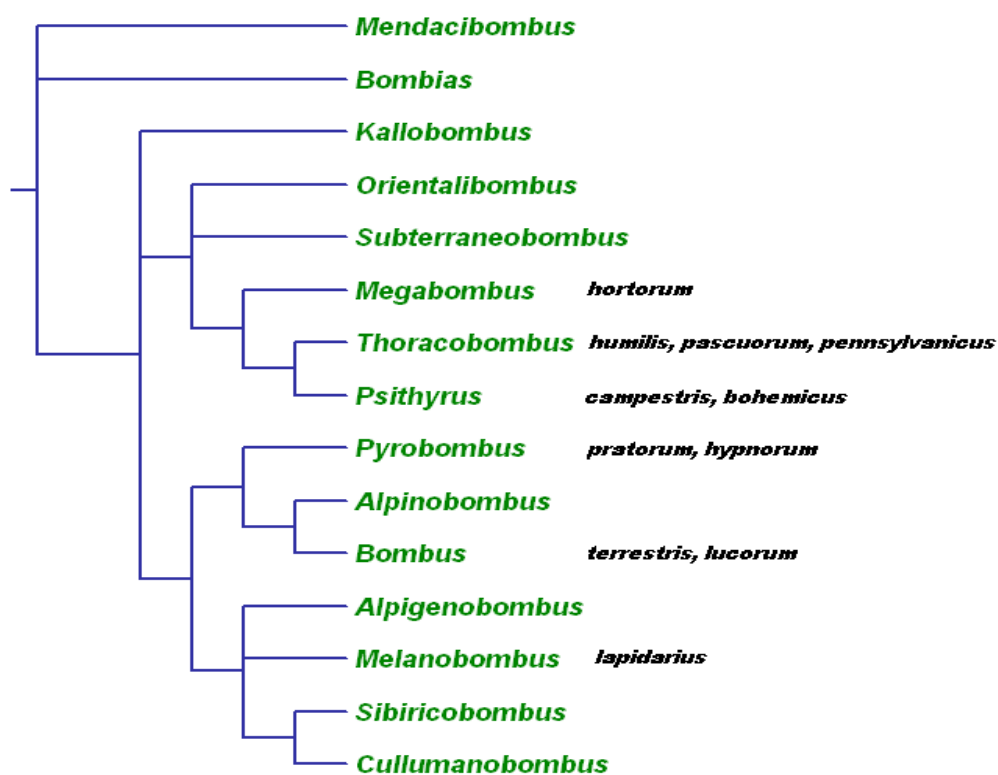
Dále jsou v tabulce 4 pro srovnání uvedeny peptidy nalezené ve vzorcích vos, sršňů a včel. Tyto vzorky se od vzorků čmeláků liší rozdílným počtem AMK, zvláště u včel, a také zatímco u čmeláků se složení peptidů vesměs podobá, v ostatních vzorcích se častěji vyskytují i jiné AMK jako například W, P, R, E, Q a T.



Tabulka 3: Srovnání zjištěných sekvencí. Oranžově jsou označeny AMK na stejné pozici u většiny vzorků, modře je vyznačena AMK valin a červeně je vyznačen lysin.

frakce		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
BT 10	H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N	OH
BT 15	H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	K	OH
BH 6	H-	F	N	F	K	K	F	L	A	K	V	G	I	A	L	S	H	L	K	OH
BH 7	H-	F	K	F	K	K	L	L	G	L	I	G	V	A	L	S	H	L	K	OH
BH 7 (2)	H-	F	N	F	K	E	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H	L	K	OH
BH 8	H-	F	N	F	K	K	F	L	A	K	V	G	I	A	L	S	H	L	K	OH
BH 10	H-	L	N	I	K	K	L	L	G	L	I	G	V	A	L	S	H	L	K	OH
BY 9	H-	I	K	L	K	D	I	L	G	K	L	K	V	M	L	S	H	L	N	OH
BY 11	H-	I	N	L	K	K	I	L	G	T	L	G	L	I	L	S	H	L	N	OH
BR 6	H-	I	N	L	K	K	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H	L	N	OH
BR 7	H-	I	N	L	K	K	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H	L	N	OH
BR 8	H-	I	N	L	K	K	I	L	G	T	I	G	K	V	L	S	H	L	Q	OH
BL 13	H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N	OH
BL 20	H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	K	OH
BL 22	H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	N	OH
BU 7	H-	L	K	L	K	D	I	L	G	K	I	K	V	I	L	S	H	L	N	OH
HU 3	H-	V	N	I	K	D	I	I	G	K	L	G	K	V	L	A	H	L	NH <sub>2</sub>	
HU 5	H-	I	N	V	L	G	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V	NH <sub>2</sub>	
HU 6	H-	I	N	V	L	S	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V	NH <sub>2</sub>	
HU 7	H-	V	N	V	L	D	V	L	A	K	V	G	K	V	L	S	H	L	NH <sub>2</sub>	
HU 8	H-	I	N	V	L	G	V	L	G	L	L	G	K	A	L	S	H	L	NH <sub>2</sub>	
BC 10	H-	I	N	V	S	A	I	L	E	K	L	K	K	V	L	S	H	I	NH <sub>2</sub>	
BC 12	H-	F	S	V	L	S	A	I	G	I	L	G	K	L	L	S	H	L	NH <sub>2</sub>	
BC 13	H-	I	S	I	L	S	I	L	G	T	L	G	K	V	L	S	H	L	NH <sub>2</sub>	

## Fylogenetický strom čmeláků



Obrázek 25: Fylogenetický strom čmeláků. Základem je rod *bombus*. Klasifikace byla provedena podle podobnosti výsledků z analýz sekvence genů DNA.<sup>56</sup>

**Tabulka 4: Srovnání sekvencí podle druhů čmeláků. Oranžově jsou označeny AMK na stejné pozici u většiny vzorků, modře je vyznačena AMK valin a červeně je vyznačen lysin. Pro srovnání jsou uvedeny sekvence AMP vos, sršňů a včel.**

frakce		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
<b>PSITHYRUS</b>																												
BC 10		H-	I	N	V	S	A	I	L	E	K	L	K	K	V	L	S	H	I									NH <sub>2</sub>
BC 12		H-	F	S	V	L	S	A	I	G	I	L	G	K	L	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
BC 13		H-	I	S	I	L	S	I	L	G	T	L	G	K	V	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
Metapsithyrus campestris <sup>8</sup>	BMC 9	H-	I	N	V	S	A	I	L	E	K	L	K	K	V	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
	BMC 11	H-	F	S	V	L	S	A	I	G	I	L	G	K	L	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
	BMC 12	H-	I	S	V	L	S	I	L	G	T	L	G	K	V	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
<b>BOMBUS</b>																												
BT 10		H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N								OH
BT 15		H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	K								OH
BL 13		H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N								OH
BL 20		H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	K								OH
BL 22		H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L									OH
B. terrestris <sup>22</sup>	Peak 7	H-				K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N									OH
	Peak 8	H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M													OH
	Peak 11	H-	L	N	L	K	K	I	L	G	K	I	G	V	M	L	S	H	L	N								OH
	Peak 12	H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L	K								OH
	Peak 13	H-	L	N	I	L	G	L	L	G	K	I	G	K	I	L	S	H	L									OH
<b>PYROBOMBUS</b>																												
BY 9		H-	I	K	L	K	D	I	L	G	K	L	K	V	M	L	S	H	L	N								OH
BY 11		H-	I	N	L	K	K	I	L	G	T	L	G	L	I	L	S	H	L	N								OH
BR 6		H-	I	N	L	K	K	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H										OH
BR 7		H-	I	N	L	K	K	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H	L	N								OH
BR 8		H-	I	N	L	K	K	I	L	G	T	I	G	K	V	L	S	H	L	Q								OH
<b>MELANOBOMBUS</b>																												
BU 7		H-	L	K	L	K	D	I	L	G	K	I	K	V	I	L	S	H	L	N	K							OH
B. lapidarius <sup>55</sup>	Bombolitin 6	H-	L	N	L	T	K	W	L	G	K	L	G	V	I	L	S	H	L	N	K							NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 7	H-	L	K	L	K	D	I	L	G	K	I	K	V	I	L	S	H	L	N	K							NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 8	H-	L	K	L	K	S	I	L	G	K	L	G	V	I	L	S	H	L	N	K							NH <sub>2</sub>
<b>MEGABOMBUS</b>																												
BH 6		H-	F	N	F	K	K	F	L	A	K	V	G	I	A	L	S	H	L	K								OH
BH 7		H-	F	K	F	K	K	L	L	G	L	I	G	V	A	L	S	H	L	K								OH
BH 7 (2)		H-	F	N	F	K	E	L	L	G	K	I	G	I	A	L	S	H	L	K								OH
BH 8		H-	F	N	F	K	K	F	L	A	K	V	G	I	A	L	S	H	L									OH
BH 10		H-	L	N	I	K	K	L	L	G	L	I	G	V	A	L	S	H	L	K								OH
<b>THORACOBOMBUS</b>																												
HU 3		H-	V	N	I	K	D	I	I	G	K	L	G	K	V	L	A	H	L									NH <sub>2</sub>
HU 5		H-	I	N	V	L	G	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
HU 6		H-	I	N	V	L	S	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
HU 7		H-	V	N	V	L	D	V	L	A	K	V	G	K	V	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
HU 8		H-	I	N	V	L	G	V	L	G	L	L	G	K	A	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
B. pascuorum <sup>4</sup>	BP 1	H-	A	N	I	K	D	I	L	G	K	I	G	K	V	L	A	H	L									NH <sub>2</sub>
	BP 2	H-	I	N	L	K	A	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
	BP 3	H-	V	N	I	K	D	I	L	G	K	V	A	K	V	L	A	H	L									NH <sub>2</sub>
	BP 4	H-	I	S	V	L	S	I	L	G	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
	BP 5	H-	I	N	V	L	G	M	L	G	L	L	G	K	A	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
	BP 6	H-	I	N	V	L	G	V	L	G	L	L	G	K	A	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
Megabombus pensylvanicus <sup>21</sup>	Bombolitin 1	H-	I	K	I	T	T	M	L	A	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 2	H-	S	K	I	T	D	I	L	A	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 3	H-	I	K	I	M	D	I	L	A	K	L	G	K	V	L	A	H	V									NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 4	H-	I	N	I	K	D	I	L	A	K	L	V	K	V	L	G	H	V									NH <sub>2</sub>
	Bombolitin 5	H-	I	N	V	L	G	I	L	G	L	L	V	K	A	L	S	H	L									NH <sub>2</sub>
<b>Vosy</b>																												
Polistinae wasps <sup>11</sup>	PDD-A	H-	I	N	W	K	K	I	F	G	K	V	K	N	L	V												NH <sub>2</sub>
	PDD-B	H-	I	N	W	L	K	L	G	K	K	I	L	G	A	L												NH <sub>2</sub>
	MP	H-	I	N	W	L	K	L	G	K	K	M	M	S	A	L												NH <sub>2</sub>
	PMM	H-	I	N	W	K	K	I	A	S	I	G	K	E	V	L	K	A	L									NH <sub>2</sub>
Polistes major major <sup>16</sup>	PMM 1	H-	K	R	R	P	P	G	F	T	P	F	R															NH <sub>2</sub>
	PMM 2	H-	I	N	W	K	K	I	A	S	I	G	K	E	V	L	K	A	L									NH <sub>2</sub>
	PMM 3	H-	F	L	S	A	L	L	G	M	L	K	N	L														NH <sub>2</sub>
<b>Sršně</b>																												
Vespa crabro <sup>13</sup>	Mastoparan C	H-	L	N	L	K	A	L	L	A	V	A	K	K	I	L												NH <sub>2</sub>
Vespa basalis <sup>13</sup>	Mastoparan B	H-	L	K	L	K	S	I	V	S	W	A	K	K	V	L												NH <sub>2</sub>
Vespa mandarinia <sup>13</sup>	Mastoparan M	H-	I	N	L	K	A	I	A	A	L	A	K	K	L	L												NH <sub>2</sub>
Vespula lewisii <sup>13</sup>	Mastoparan	H-	I	N	L	K	A	L	A	A	L	A	K	K	I	L												NH <sub>2</sub>
<b>Včely</b>																												
Apis mellifera <sup>13</sup>	Melitin A. m.	H-	G	I	G	A	V	L	K	V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q</	

## 6 ZÁVĚR

V této práci byly proměřeny jedové extrakty různých druhů čmeláků ve snaze nalézt antimikrobiálně aktivní peptidy. Po izolaci peptidů ze vzorků pomocí RP-HPLC byla provedena analýza hmotnostní spektrometrií (MALDI a ESI) a MS/MS fragmentace s následným vyhodnocením dat sekvenční metodou "de novo".

Zkoumáno bylo 25 frakcí z 8 druhů čmeláků, z čehož byly 3 sekvence již dříve publikovány. Z původních 25 peptidů jich 5 nevykazovalo antimikrobiální aktivitu. Povedlo se charakterizovat 17 nových antimikrobiálních peptidů.

Porovnáním zjištěných sekvencí (Tabulka 3) vyplývá opakující se tendence v umístění stejných aminokyselin na shodné pozice v peptidu, například G na 11, S na 15, H na 16 a L na 7, 14 a 17 pozici.

Ve vzorku čmeláka zahradního byly nalezeny čtyři AMP, jsou to BH 6, BH 7, BH 7(2) a BH 10. Další AMP byly nalezeny v jedovém extraktu čmeláka rokytového označené jako BY 9 a BY 11. Čmelák luční poskytl sekvence dvou AMP pojmenovaných BR 7 a BR 8. Jeden AMP získány z čmeláka hájového je BL 20. Pět AMP bylo objeveno v extraktu čmeláka proměnlivého a to HU 3, HU 5, HU 6, HU 7 a HU 8. Posledním vzorkem byl pačmelák český se třemi sekvencemi označenými jako BC 10, BC 12 a BC 13.

## LITERATURA

1. Bals, R.; Wilson, J. M.: Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 711-720 (2003)
2. Bals, R.: Antimikrobielle peptide und peptidantibiotika. *Medizinische Klinik* **95**, 496-502 (2000)
3. Ganz, T.: The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology* **43**, 300-304 (2003)
4. Ježek, R.; Janechová, D.; Cvačka, J.; Slaninová, J.; Voburka, Z.; Hovorka, O.; Fučík, V.; Borovičková, L.; Maloň, P.; Čeřovský, V.: New peptides with antimicrobial activity isolated from the venom of the bumblebee *Bombus pascuorum* (Hymenoptera: Apidae). In: *Biologically Active Peptides*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2009, p. 51-54.
5. Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A.: Amphipathic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science* **1**, 4-30 (2000)
6. Neubauerová, T.; Macková, M.; Macek, T.; Koutek, B.: Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické Listy* **103**, 460-468 (2009)
7. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W.: Peptide antimicrobial agents. *American Society for Microbiology* **19**, 491-511 (2006)
8. Janechová, D.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha (2008)
9. Toke, O.: Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science* **80**, 717-735 (2005)
10. Čeřovský, V.: Antimikrobiální peptidy – terapeutika budoucnosti? *Vesmír* **90**, 87-89 (2011)
11. Čeřovský, V.; Slaninová, J.; Fučík, V.; Hulačová, H.; Borovičková, L.; Ježek, R.; Bedárová, L.: New potent antimicrobial peptides from the venom of *Polistinae* wasps and their analogs. *Peptides* **29**, 992-1003 (2008)
12. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y.: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **55**, 27-55 (2003)
13. Nentwig-Kuhn, L.: Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 2651-2668 (2003)
14. Royet, J.: Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molecular Immunology* **41**, 1063-1075 (2004)
15. Bulet, P.; Hetru, Ch.; Dimarcq, J. L.; Hoffmann, D.: Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 329-344 (1999)
16. Čeřovský, V.; Pohl, J.; Yang, Z.; Alam, N.; Attygalle, A.B.: Identification of three novel peptides isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polistes major major*. *Journal of Peptide Science* **13**, 445-450 (2007)
17. Habermann, E.: Bee and wasp venoms. *Science* **177**, 314-322 (1972)
18. Kastin, J. A.: *Handbook of biologically active peptides*. Amsterdam, Academic Press 2006
19. Hugues, M.; Romey, G.; Duval, D.; Vincent, J.P.; Lazdunski, M.: Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 1308-1312 (1982)

20. Patočka, J.: Vosí bodnutí. *Vesmír* **83**, 392-394 (2004)
21. Argiolas, A.; Pisano, J.J.: Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 1437-1444 (1985)
22. Cvačka, J.; Voburka, Z.; Hovorka, O.; Nováková, K.; Valterová, I.; Čerovský, V.: Mass spectrometry of peptides from bumblebee venom reservoirs. In: *Biologically Active Peptides*, Praha: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2007, p. 29-32.
23. Peggion, E.; Mammi, S.; Schievano, E.: Conformation and interactions of bioactive peptides from insect venoms: The bombolitins. *Peptide Science* **43**, 419-431 (1997)
24. [http://www.bombus.cz/barvy1\\_cs.html](http://www.bombus.cz/barvy1_cs.html) [cit. 07.03.2012]
25. Thorp, R. W.; Horning, D. S.; Dunning, L. L.: Bumble bees and cuckoo bumble bees of California (Hymenoptera: Apidae). In: *Bulletin of the California insect survey*. Daly, H. V. (ed). USA: University of California press, 1983, p. 1-87
26. Macek, J.; Straka, J.; Bogusch, P.; Dvořák, L.; Bezděčka, P.; Tyrner, P.: *Blanokřídli České republiky I*. Praha, Academia 2010
27. <http://www.bwars.com/index.htm> [cit. 07.03.2012]
28. <http://www.commanster.eu/commanster/Insects/Flies/SuFlies/Physocephala.rufipes2.html> [cit. 07.03.2012]
29. Vaňková, H.: Peptidové mapy. *Chemické Listy* **93**, 120-127 (1999)
30. Kowalska, S.; Krupczyńska, K.; Buszewski, B.: Some remarks on characterization and application of stationary phases for RP-HPLC determination of biologically important compounds. *Biomedical Chromatography* **20**, 4-22 (2006)
31. Claessens, H.A.: *Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography*. Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven (1999)
32. Kalousek, V.; Pavlíček, Z.: *Biofyzikální chemie*. Praha, SNTL 1980
33. Bogdanov, B.; Smith, R. D.: Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 168-200 (2005)
34. Harvey, D. J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrometry reviews* **18**, 349-450 (1999)
35. Kaufmann, R.: Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *Journal of Biotechnology* **41**, 155-175 (1995)
36. Welker, M.; Fastner, J.; Erhard, M.; von Döhren, H.: Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental toxicology* **17**, 367-374 (2002)
37. Gross, J. H.: *Mass spectrometry*. Berlin, Springer 2004
38. <http://www.adographics.com/galleri.html> [cit. 07.03.2012]
39. <http://www.currentprotocols.com/protocol/nc1001> [cit. 07.03.2012]
40. Cech, N. B.; Enke, Ch. G.: Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 362-387 (2001)
41. Hanuš, V.; Herman, Z.; Lemr, K.: Hmotnostní spektrometrie a velké molekuly. *Vesmír* **82**, 312-316 (2003)
42. Sakairi, M.; Yergey, A. L.; Siu, K. W. M.; Le Blanc, J. C. Y.; Guevremont, R.; Berman, S. S.: Electrospray mass spectrometry: Protonated molecule intensities versus Hydration free energies in amino acids. *Analytical Sciences* **7**, 199-202 (1991)
43. [http://sjsupport.thermofinnigan.com/techpubs/manuals/LTQ-Orbitrap-XL\\_Hardware.pdf](http://sjsupport.thermofinnigan.com/techpubs/manuals/LTQ-Orbitrap-XL_Hardware.pdf) [cit. 07.03.2012]

44. Olsen, J. V.; de Godoy, L. M. F.; Li, Guoqing.; Macek, Boris.; Mortensen, Peter.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M.: Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* **4**, 2010-2021 (2005)
45. Olsen, J.V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S.; Mann, M.: Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods* **4**, 709-712 (2007)
46. Dayon, L.; Pasquarello, C.; Hoogland, Ch.; Sanchez, J. Ch.; Scherl, A.: Combining low- and high-energy tandem mass spectra for optimized peptide quantification with isobaric tags. *Journal of Proteomics* **73**, 769-777 (2010)
47. Wysocki, V. H.; Resing, K. A.; Zhang, Q.; Cheng, G.: Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211-222 (2005)
48. [http://www.matrixscience.com/help/fragmentation\\_help.html](http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html) [cit. 07.03.2012]
49. Standing, K. G.: Peptide and protein "de novo" sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 595-601 (2003)
50. Taylor, J. A.; Johnson, R. S.: Sequence database searches via "de novo" peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1067-1075 (1997)
51. Graves, P. R.; Haystead, T. A. J.: Molecular biologist 's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 39-63 (2002)
52. Voet, D.; Voetová, J. G.: *Biochemie*. Praha, Victoria Publishing 1995
53. Mentlein, R.; Lucius, R.: Methods for the investigation of neuropeptide catabolism and stability in vitro. *Brain Research Protocols* **1**, 237-246 (1997)
54. Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, Ch.; Liang, Ch.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G.: PEAKS: powerful software for peptide "de novo" sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 2337-2342 (2003)
55. Favreau, P.; Menin, L.; Michalet, S.; Perret, F.; Cheneval, O.; Stöcklin, M.; Bulet, P.; Stöcklin, R.: Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* **47**, 676-687 (2006)
56. Williams, P. H.; Cameron, S. A.; Hines, H. M.; Cederberg, B.; Rasmont, P.: A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie* **39**, 46-74 (2008)
57. Jelínek, J.; Zicháček, V.: *Biologie pro gymnázia*. Olomouc, Nakladatelství Olomouc 2002
58. <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html> [cit. 07.03.2012]