

**Disertační práce**

**STUDIE IMUNITNÍ ODPOVĚDI LAREV  
MASAŘKY *SARCOPHAGA BULLATA***

**RNDr. Alice Mášová**

Katedra biochemie,  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy  
a  
Ústav organické chemie a biochemie  
Akademie věd České republiky

Praha 2008

## Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli a vedoucímu Dr. Jiřímu Jiráčkovi, mému skvělému manželovi Martinovi a svým úžasným rodičům Renatě a Jindřichovi Ciencialovým. Každý z nich má na této práci svůj podíl, bez kterého by nemohla vzniknout a za to jim patří můj velký dík.

Dále bych ráda poděkovala dalším milým spolupracovníkům, kteří mi v průběhu práce pomáhali. Mgr. Miloslavu Šandovi a Dr. Ireně Selicharové za pomoc s proteomickou částí práce, Mgr. Radku Šindelkovi za ochotu mě naučit RT-qPCR. Další kolegové mi pomáhali se syntézou peptidů, testováním antimikrobiálních aktivit a s analýzami; Jitka Viková, Ing. Tereza Neubauerová, Prof. Martina Macková, Dr. Bohumír Koutek, Mgr. Jiří Kindl, Dr. Josef Cvačka, Dr. Miloš Buděšinský, Dr. Václav Kašička, Ing. Zdeněk Voburka, Dr. Miroslav Ledvina a Jarmila Titzenthalerová. Dr. Lence Žákové děkuji za pomoc s přípravou nádherných posterů a Ing. Blance Železné za krásné připomínky při kontrole rukopisu této práce.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala naší skupině v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za vytvoření přátelského prostředí, ochotu pomoci a všestrannou podporu.

Tato práce byla provedena v rámci výzkumného záměru AV ČR Z4 055 905 a byla podporována granty FRVŠ ČR 315/2005, GA ČR 203/05/083 a 203/05/2539 a výzkumným centrem Chemické genetiky LC060777 Ministerstva školství, mládeže a sportu ČR.

# Obsah

<b>PODĚKOVÁNÍ</b>	<b>2</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD</b>	<b>7</b>
<b>1.1. IMUNITNÍ ODPOVĚĚ HMYZU</b>	<b>8</b>
1.1.1. BUNĚČNÁ ODPOVĚĚ	9
1.1.2. HUMORÁLNÍ ODPOVĚĚ	10
<b>1.2. ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY</b>	<b>12</b>
1.2.1. KATIONICKÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY	13
1.2.1.1. LINEÁRNÍ AMFIPATICKÉ PEPTIDY TVOŘÍCÍ $\alpha$ -ŠROUBOVICE	13
1.2.1.2. PEPTIDY BOHATÉ NA CYSTEIN A DISULFIDOVÉ MŮSTKY	14
1.2.1.3. PEPTIDY BOHATÉ NA URČITOU AMINOKYSELINU	18
1.2.2. POSTRANSLAČNÍ MODIFIKACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ	18
<b>1.3. MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ</b>	<b>20</b>
1.3.1. OBECNÁ KRITÉRIA PRO PŮSOBENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ	20
1.3.2. SPECIFITA A SELEKTIVNÍ TOXICITA ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ	21
1.3.3. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS ÚČINKU ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDŮ	22
1.3.4. SYNERGISMUS ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ	24
<b>1.4. ZDROJE HMYŽÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ</b>	<b>24</b>
1.4.1. HMYZ S NEDOKONALOU PROMĚNOU	25
1.4.2. HMYZ S DOKONALOU PROMĚNOU	25
1.4.2.1. MASAŘKA <i>SARCOPHAGA BULLATA</i>	29
<b>1.5. EXPRESE ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ</b>	<b>30</b>
1.5.1. KONSTITUTIVNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY	31
1.5.2. INDUCIBILNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY	31
1.5.2.1. TOLL SIGNALIZAČNÍ KASKÁDA	32
1.5.2.2. IMD SIGNALIZAČNÍ KASKÁDA	32
<b>1.6. EXPRESE DALŠÍCH GENŮ ODPOVĚDNÝCH ZA IMUNITNÍ ODPOVĚĚ HMYZU</b>	<b>34</b>
1.6.1. ANALÝZA ZMĚN TRANSKRIPTOMU <i>DROSOPHILY</i>	34
1.6.2. ANALÝZA ZMĚN PROTEOMU <i>DROSOPHILY</i> A JINÉHO HMYZU	37
<b>2. CÍLE PRÁCE</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b>	<b>41</b>
<b>3.1. POUŽITÝ MATERIÁL</b>	<b>41</b>
<b>3.2. CHOV LAREV MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i></b>	<b>42</b>
<b>3.3. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO INOKULA</b>	<b>42</b>
<b>3.4. PŘÍPRAVA KULTUR PRO INDUKCI</b>	<b>42</b>
<b>3.5. INDUKCE LAREV MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i></b>	<b>42</b>
<b>3.6. IZOLACE Z LAREV MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i></b>	<b>43</b>
3.6.1. IZOLACE HEMOLYMFY Z LAREV	43
3.6.2. IZOLACE HEMOCYTŮ Z LAREV	43
3.6.3. IZOLACE TUKOVÉHO TĚLESA Z LAREV	43
3.6.4. HOMOGENIZACE CELÝCH LAREV	43
<b>3.7. SEPARACE HEMOLYMFY CENTRIFUGACÍ A SRÁŽENÍM</b>	<b>44</b>
<b>3.8. FRAKCIONACE HEMOLYMFY NA KOLONKÁCH CHROMABOND C-18</b>	<b>44</b>

<b>3.9. CHROMATOGRAFICKÉ METODY</b>	<b>45</b>
3.9.1. ANALYTICKÉ RP-HPLC	45
3.9.2. PREPARATIVNÍ RP-HPLC: IZOLACE PEPTIDŮ, MENŠÍCH PROTEINŮ POPŘ. FRAKČÍ	45
<b>3.10. TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY</b>	<b>46</b>
3.10.1. PŘÍPRAVA INOKULA PRO TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY	46
3.10.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ Z IZOLOVANÝCH FRAKČÍ PRO TESTOVÁNÍ	46
3.10.3. MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY POMOCÍ PŘÍSTROJE BIOSCREEN C	46
<b>3.11. ELEKTROFORETICKÉ METODY</b>	<b>47</b>
3.11.1. 1D-SDS-PAGE	47
3.11.2. ELEKTROFORÉZA V TRIS-TRICINOVÉM PUFRU	48
3.11.3. PŘENOS PROTEINŮ A PEPTIDŮ NA MEMBRÁNU PVDF	49
3.11.4. 2D-ELEKTROFORÉZA	49
3.11.4.1. PŘÍPRAVA VZORKU NA 2D-ELEKTROFORÉZU	49
3.11.4.2. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE	50
3.11.4.3. ELEKTROFORÉZA V GRADIENTOVÉM GELU	50
3.11.4.4. ANALÝZA 2D GELŮ	51
3.11.5. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CZE)	51
3.11.5. PREPARATIVNÍ VOLNÁ ELEKTROFORÉZA (FFE)	52
<b>3.12. SYNTÉZA <math>\beta</math>-ALANYL-TYROZINU A JEHO ANALOGŮ</b>	<b>52</b>
3.12.1. SYNTÉZA $\beta$ -ALANYLTYROZINU A JEHO ANALOGŮ NA PEVNÉ FÁZI	52
3.12.2. SYNTÉZA $\beta$ -ALANYL-L-TYROZYL- $\beta$ -D-FRUKTOPYRANÓZY	53
<b>3.13. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE</b>	<b>53</b>
3.13.1. ESI-MS	53
3.13.2. MALDI-MS	53
3.13.3. IDENTIFIKACE PEPTIDŮ A PROTEINŮ Z PROTEOLYTICKÝCH ŠTĚPENÍ	54
<b>3.14. NMR SPEKTROMETRIE</b>	<b>55</b>
<b>3.15. KVANTITATIVNÍ PCR</b>	<b>55</b>
3.15.1. IZOLACE RNA	55
3.15.2. PŘÍPRAVA CDNA	55
3.15.3. REAL-TIME qPCR (RT-qPCR)	55
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>57</b>
<hr/>	
<b>4.1. IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V HEMOLYMFĚ LAREV MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i></b>	<b>57</b>
4.1.1. IZOLACE HEMOLYMFY Z LAREV MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i>	57
4.1.2. SEPARACE NA CHROMABOND C18 KOLONKÁCH	58
4.1.3. ANALYTICKÉ RP-HPLC	58
4.1.3.1. SRÁŽENÍ HEMOLYMFY OKYSELENÝM METHANOLEM	59
4.1.3.1. SRÁŽENÍ HEMOLYMFY SÍRANEM AMONNÝM	61
4.1.4. ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA	62
4.1.5. CHARAKTERIZACE AKTIVNÍCH PROTEINOVÝCH A PEPTIDOVÝCH FRAKČÍ	64
<b>4.2. <math>\beta</math>-ALANYL-TYROZIN A JEHO SYNTETICKÉ ANALOGY</b>	<b>66</b>
<b>4.3. ANALÝZA ZMĚN EXPRESE VYBRANÝCH GENŮ <i>SARCOPHAGA BULLATA</i> PO INDUKCI IMUNITNÍ ODPOVĚDI POMOCÍ REAL-TIME qPCR</b>	<b>70</b>
4.3.1. IZOLACE RNA Z LAREV	70
4.3.2. POROVNÁNÍ ÚROVNĚ GENOVÉ EXPRESE V INDUKOVANÝCH A KONTROLNÍCH LARVÁCH	70
4.3.2.1. CELÉ TĚLO LAREV	70
4.3.2.2. TUKOVÉ TĚLESO LAREV	72
4.3.2.3. HEMOCYTY LAREV	73
<b>4.4. PROTEOMICKÁ ANALÝZA ZMĚN PROTEINŮ MASAŘKY <i>SARCOPHAGA BULLATA</i> PO INDUKCI IMUNITNÍ ODPOVĚDI</b>	<b>74</b>
4.4.1. PROTEOMICKÁ ANALÝZA INDUKCE IMUNITNÍ ODPOVĚDI V HEMOCYTECH	74
4.4.2. PROTEOMICKÁ ANALÝZA INDUKCE IMUNITNÍ ODPOVĚDI V TUKOVÝCH TĚLESECH	80

<b>5. DISKUZE</b>	<b>86</b>
<b>6. SHRNUÍ</b>	<b>98</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>99</b>
<b>PŘÍLOHA</b>	<b>112</b>

## Seznam použitých zkratk

1-DE – jednorozměrná elektroforéza  
2-DE – dvoudimenzionální elektroforéza  
AMP – antimikrobiální peptidy  
APS – persíran amonný  
CAPS – 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová kyselina  
CZE – kapilární elektroforéza  
CFU – jednotka tvořící kolonii, z anglického „colony - forming unit“  
DIPEA – N,N-diisopropylethylamin  
DMSO – dimethyl sulfoxid  
DTT – dithiothreitol  
ESI – ionizace elektrosprejem, z anglického „electrospray ionization“  
FFE – volná elektroforéza, z anglického „free flow electrophoresis“  
Fmoc – 9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina  
HBTU – 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát  
CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-amonio]-1-propansulfonát  
IPG strip – proužek s imobilizovaným pH gradientem, z anglického „immobilized pH gradient strip“  
LB – Luria-Bertani  
LPS – lipopolysacharid  
MALDI-TOF – ionizace laserem za účasti matrice s analýzou doby letu, z anglického „matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight“  
MIC – minimální inhibiční koncentrace, z anglického „minimum inhibitory concentration“  
NMP – N-methylpyrolidon  
NMR – nukleární magnetická rezonance  
MS – hmotnostní spektrometrie  
PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu  
PPO – profenoloxidáza  
PVDF – polyvinyliden-difluoridová  
Q-TOF – „quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem“  
RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinná chromatografie na reverzní fázi, z anglického „Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography“  
RT-qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, z anglického „Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction“  
SBP – z anglického „storage binding protein“  
SDS – dodecylsulfát sodný  
tBu – terc-butylová skupina  
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin  
TFA – kyselina trifluoroctová  
TIS – triisopropylsilan  
Tricin – N-tris(hydroxymethyl)methylglycin  
Tris – tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Dále jsou užívány zkratky podle doporučení IUPAC-IUB. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě.

# 1. Úvod

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) uvádí že rezistence k antimikrobiálním látkám je stále závažnější zdravotní problém. Nadměrné používání antibiotik nejen k léčbě mikrobiálních infekcí, ale také k prevenci infekcí nebo dokonce výživě hospodářských zvířat vedlo k alarmujícímu nárůstu rezistence bakterií vůči současným antibiotikům [1]. Antibiotika jsou přirozené látky produkované mikroorganismy (někdy i vyššími rostlinami či živočichy), které potlačují růst jiných organismů. K „producentům“ antibiotik patří bakterie, houby, řasy, lišejníky aj. V nějaké formě se antibiotika musela používat již ve starém Egyptě, protože v mumiích se našly stopy tetracyklinu. Ve středověku prý lidé používali k léčbě hnisavých ran plesnivý chléb. Skutečný rozvoj antibiotik však začal až Flemingovým objevem penicilinu roku 1929. Cesta od zjištění, že kolonie plísně *Penicillium notatum* na Petriho miskách brání růstu zlatého stafylokoka *Staphylococcus aureus*, však byla ještě velmi dlouhá. Klinicky byl penicilin použit poprvé až koncem druhé světové války při léčení zraněných spojeneckých vojáků. Další antibiotika pak již byla objevována jako na běžícím pásu. S možností rezistence se tehdy příliš nepočítalo [2].

Rezistence bakterie *Salmonella typhimurium* k tetracyklinům vzrostla z 0% v roce 1948 k 98% v roce 1998. V roce 1998 bylo přes 30% stafylokových bakteriemií způsobeno methicillin-rezistentním kmenem bakterie *Staphylococcus aureus* ve srovnání s 2% v roce 1994 [3]. Kdykoli byla na trh zavedena nová antibakteriální látka, dříve či později se začaly objevovat rezistentní kmeny. Snad nejdéle zůstal zcela účinný vankomycin, ale ani to již neplatí. Každou hodinu zabíjí bakteriální infekce na naší planetě okolo 1500 lidí a z toho polovina jsou děti mladší pěti let [4]. Tato zjištění vedou ke snaze najít nové účinné antimikrobiální látky, které by ničily mikroorganismy a přitom by se vůči nim obtížně vytvářela rezistence.

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou součástí přirozené (neadaptivní) imunity a jsou důležitou součástí imunitní obrany. Jsou produkovány rostlinami, zvířaty, hmyzem a jednobuněčnými organismy. Antimikrobiální peptidy jsou schopné ovlivnit růst a množení jak bakterií, virů, kvasinek, a některé jsou schopny působit i na rakovinné buňky [5]. Potenciál antimikrobiálních peptidů a proteinů v klinické praxi zahrnuje nejen jejich využití jako antimikrobiálních látek a využití jejich synergistického účinku s již

používanými antibiotiky, ale také jejich použití jako imunostimulačních a endotoxiny neutralizujících látek [6,7].

Třída hmyzu se zdá být novým, slibným zdrojem přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. Hmyz je druhově nejpočetnější skupinou živočichů. Odhady odborníků o celkovém počtu hmyzích druhů na Zemi se pohybují v rozmezí od dvou do třiceti milionů. Jestliže uvážíme rozmanitost prostředí ve kterém hmyz žije a množství patogenů, kterým je konstantně vystavován, musí být hmyz vybaven účinným obranným mechanismem, který zajišťuje resistenci hmyzu vůči patogenům. V průběhu evoluce si hmyz vyvinul komplexní a účinný přirozený imunitní systém založený především na rychlé syntéze peptidů a malých organických molekul [8]. V posledních letech byly právě z rozličných druhů hmyzu izolovány peptidy, které vykazovaly zajímavé *in vitro* aktivity proti mikroorganismům rezistentním ke konvenčním antibiotikům [9]. Právě tyto peptidy by se mohly stát vzorem pro tvorbu nových terapeutických zbraní v boji s mikroorganismy. Zároveň je za pomoci moderních biochemických a genetických metod (čipy a proteomika) věnována velká pozornost studiu imunitní odpovědi hmyzu. Od bezobratlých k obratlovcům má přirozená imunita zarážející podobnost což svědčí o jejím společném evolučním původu [10].

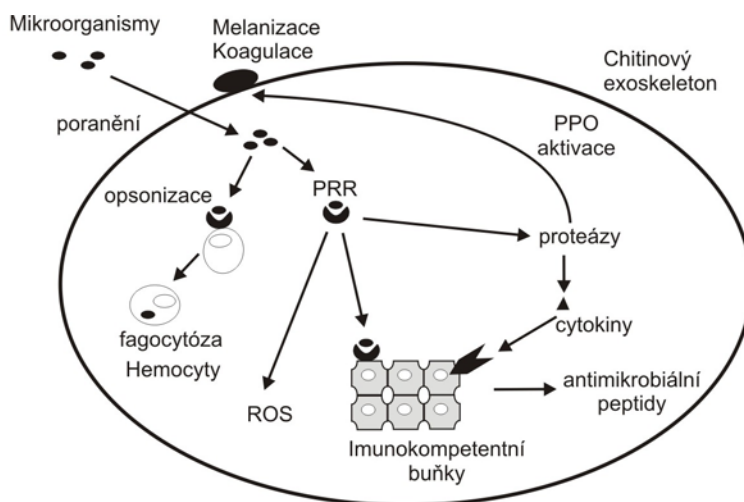
### **1.1. Imunitní odpověď hmyzu**

Hmyz patří mezi bezobratlé, plně odkázané na přirozenou imunitu. Setkává se s různými patogeny, nejenom bakteriálními, ale i houbami, viry, protozoy a jinými mnohobuněčnými parazity. Prvotní ochranná bariéra hmyzu je mechanická, tvořena chitinovou kutikulou - vnějším exoskeletonem. Také trávicí a dýchací ústrojí, dvě hlavní cesty vstupu infekce, jsou potaženy chitinovou vrstvou [11].

Vrozený imunitní systém je u hmyzu tvořen tukovým tělesem, lymfatickými žlázami a hemocyty. Tukové těleso je funkčním analogem savčích jater a je odpovědné za tvorbu antimikrobiálních peptidů a proteinů vylučovaných do hemolymfy. Lymfatické žlázy jsou párové orgány a jejich hlavním příspěvkem k imunitě je předpokládaná tvorba hemocytů. Imunitní obrana je zajišťována také buňkami povrchových epitelů dýchacího, trávicího a reprodukčního ústrojí, malpigických trubic (vylučovací orgány hmyzu) a slinných žláz [12,13].



Pokud patogen vnikne do tělesné dutiny hmyzu (hemocoel), je vystaven buněčné a humorální odpovědi. Buněčné a humorální odpovědi jsou propojené, přičemž mnoho humorálních faktorů ovlivňuje funkci hemocytů. Právě tyto buňky kolující v hemolymfě zprostředkovávají buněčnou odpověď. Cévní soustava hmyzu je otevřená, funkci srdce zastává velká hřbetní céva, která pumpuje krvomízu (hemolymfu) směrem k mozgovým gangliím, odkud se hemolymfa dostává dále do celého těla. V těle hemolymfa volně omývá vnitřní orgány. Humorální odpověď zahrnuje srážení hemolymfy (hemokoagulace), melanizaci (tvorba černého pigmentu melaninu např. při vzniku kukly) a produkci antimikrobiálních peptidů [14,15]. Humorální odpovědi se dále účastní reaktivní kyslíkové intermediáty (ROS- „reactive oxygen species“) (Obrázek 1).

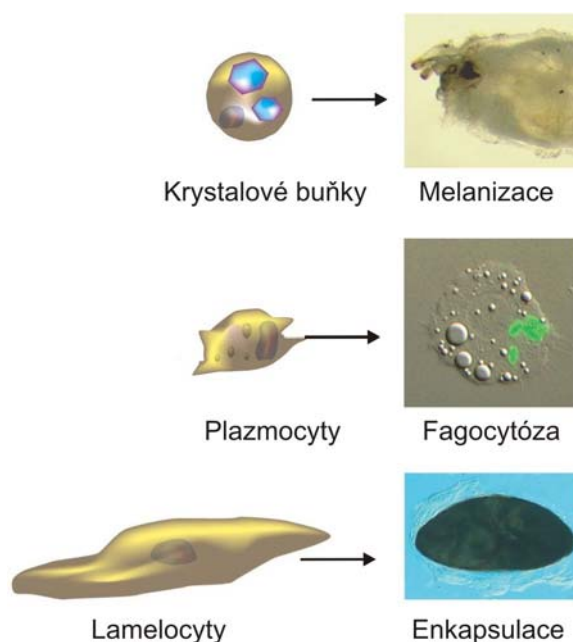


**Obrázek 1.** Schéma imunitní odpovědi hmyzu převzato z práce Royeta [16]. (ROS, reaktivní kyselinové radikály; PRR, „pattern recognition receptor“; opsonizace znamená obalování patogenu látkami usnadňující fagocytózu; PPO, profenoloxidáza).

### 1.1.1. Buněčná odpověď

Buněčnou imunitní odpověď zprostředkovávají hemocyty, které jsou u *Drosophily* klasifikovány dle morfologických kritérií na plazmocyty, lamelocyty a krystalové buňky (Obrázek 2). Plazmatocyty tvoří 90-95% všech hemocytů a zastávají obdobnou funkci jako fagocyty u savců, pohlcují apoptické buňky a usmrcené mikroorganismy. Způsob jejich rozpoznání nebyl doposud zcela objasněn. Lamelocyty jsou relativně velké buňky a jsou odpovědné za enkapsulaci parazita, jež je příliš velký na fagocytózu. Krystalové buňky tvoří 5% hemocytů a mají úlohu při tvorbě melaninu. Zralé krystalové buňky produkují

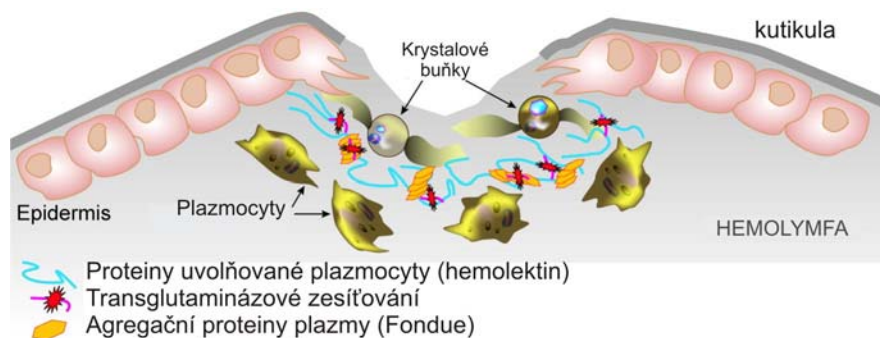
profenoloxidázu, kterou skladují v krystalické formě v cytoplazmě, z které vzniká fenoloxidáza což je klíčový enzym při melanizační kaskádě [13,15].



**Obrázek 2.** Typy hemocytů u *Drosophily* a jejich funkce. Převzato z práce Lemaitra a Hoffmanna [13].

### 1.1.2. Humorální odpověď

U hmyzu je rychlá humorální imunitní odpověď spuštěna poraněním nebo mikrobiální infekcí. Srážení hemolymfy (Obrázek 3) u hmyzu, který má otevřený oběhový systém, je jedním z nejdůležitějších obranných mechanismů zabraňující vykrvácení po poranění a napomáhá chránit hmyz před nekontrolovatelným rozmnožením mikroorganismů hemocoelu [17]. Lektiny jsou proteiny, které vážou polysacharidové struktury ve stěně patogenu, jejich plný význam v imunitní odpovědi hmyzu nebyl doposud zcela odhalen [11]. Hemolektin je produktem plazmocyty a je hlavní součástí fibril zachytávající hemocyty v místě poranění. Předpokládá se, že profenoloxidáza a transglutamináza se podílejí na mechanismu tvrdnutí koagulační zátky. Dalším faktorem účastnícím se srážení hemolymfy je abundanční protein Fondue [13,14,18].

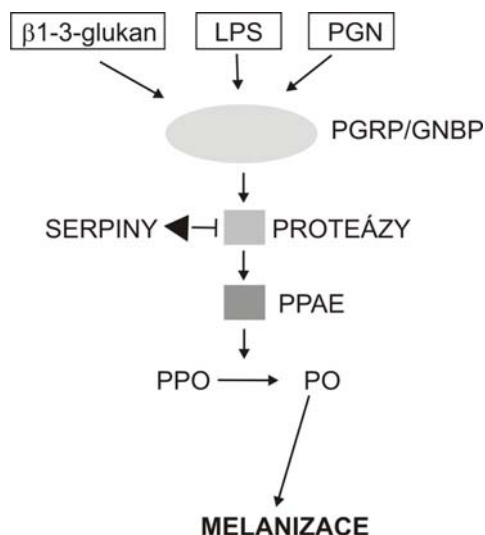


**Obrázek 3.** Srážení hemolymfy u *Drosophily*. Obrázek převzat z práce Lemaitra a Hoffmanna [13].

Profenoloxidázový systém (Obrázek 4) tvořený kaskádou serinových proteáz je aktivován kontaktem vazebných proteinů s (1→3)-β-D-glukany, peptidoglykany nebo lipopolysacharidy, hlavními složkami buněčných stěn patogenů (hub a bakterií). Serinové proteázy (např. PPAE, profenoloxidázu aktivující enzym) štěpí zymogeny profenoloxidáz na fenoloxidázy, známé též jako tyrozinázy. Meziprodukty reakce katalyzované fenoloxidázou jsou toxické chinony a kyslík. Výsledkem profenoloxidázového systému je tvorba melaninu, černého pigmentu působícího spolu s kyslíkem na fagocytované patogeny, aktivaci srážecích faktorů hemolymfy, sklerotizaci kutikuly, hojení a enkapsulaci cizorodého materiálu [16,11]. Profenoloxidáza byla izolována a následně charakterizována z hemolymfy řady druhů hmyzu, například z housenky bource morušového *Bombyx mori* [19], housenky lišaje tabákového *Manduca sexta* [20], octomilky *Drosophila* [21], larev masačky *Sarcophaga bullata* [22] nebo z včely medonosné *Apis mellifera* [23]. Obranná funkce profenoloxidázy a melaninu u hmyzu byla shrnuta Sugumaránem [24]. Dále bylo zjištěno, že enzym profenoloxidáza obsahuje sekvence podobné thiol-esterové oblasti proteinů C3 a C4, které jsou součástí komplementové kaskády u obratlovců [20]. V hemolymfě larvy *Manduca sexta* byla po stimulaci imunitní odpovědi detekována tvorba komplexu profenoloxidázy, fenoloxidázy a interleukinu 1 [25]. V kutikule housenky *Bombyx mori* byla objevena profenoloxidáza, která má zřejmě obrannou funkci ve vnějším obalu hmyzu [26]. Leclerc a kolektiv [27] nedávno demonstrovali, že PAE1 mutant *Drosophily*, který nemá profenoloxidázu aktivující enzym, nemá zhoršenou resistenci k mikrobiálním infekcím. Aktivace profenoloxidázy tudíž není nezbytná pro potlačení mikrobiální infekce

u octomilky. Zhao a kolektiv [28] prezentovali široké spektrum antimikrobiálních aktivit látek *in vitro* vytvořených fenoloxidázou housenky *Manduca sexta*.

Antimikrobiální peptidy jsou tvořeny v buňkách tukového tělesa, v hemocytech a epiteliálních buňkách. Tyto peptidy se dále dělí podle náboje a struktury [11,16,8,29,30].



**Obrázek 4.** Schéma profenoloxidázové kaskády převzato z práce Royeta [16] (SERPINY, inhibitory serinových proteáz; PPO, profenoloxidáza; PO, fenoloxidáza; PPAE, profenoloxidázu aktivující enzym; LPS, lipopolysacharid; PGN, peptidoglykan; PGRP, „peptidoglycan recognition protein“).

## 1.2. Antimikrobiální peptidy

Největší skupinou antimikrobiálních peptidů jsou kationické molekuly, které jsou velmi rozšířené jak v živočišné tak v rostlinné říši [31]. Dosud bylo charakterizováno přes 800 látek a polovina z nich byla izolována z hmyzu [29]. Jejich společnou charakteristikou je, že obsahují méně než 50 aminokyselin a celkový náboj mají od +2 do +10 v důsledku přítomnosti aminokyselin Lys a nebo Arg. Jejich struktura podmiňuje antimikrobiální efekt namířený proti Gram-pozitivním, ale také Gram-negativním bakteriím, u kterých působí přímo na jejich membrány [5].

Anionické antimikrobiální peptidy byly dosud izolovány převážně ze savčích tkání. Do této skupiny peptidů řadíme fosforylované deriváty neuropeptidových prekurzorů (enkelytin izolovaný z tkání skotu [32] a lidský peptid B [33]) a skupinu molekul bohatých

na kyselinu asparagovou (dermicidin izolovaný z tkání člověka [34]). Tyto peptidy byly detekovány v případech infekcí vyvolaných Gram-pozitivními bakteriemi [29].

Aromatické dipeptidy představují nízkomolekulární sloučeniny jako *N*- $\beta$ -alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin (5-*S*-GAD) izolovaný z larev masařky *Sarcophaga peregrina* [35],  $\beta$ -alanyl-tyrozin izolovaný z masařky *Neobelliera bullata* [4] a *p*-hydroxyaldehyd kyseliny skořicové izolovaný z ploskohřbetky *Acantholyda parki* [36].

Další skupinou antimikrobiálních peptidů jsou peptidové deriváty proteinů vázajících kyslík. Mezi ně řadíme derivát hemocyaninu izolovaný z garnáta [37], derivát hemoglobinu nalezený v hemolymfě klíštěte [38] a derivát lidského laktoferrinu [39].

Anionické peptidy, aromatické peptidy a deriváty proteinů vážících kyslík mají významně slabší antibakteriální účinek než peptidy kationické. Mechanismus jejich účinku se může od kationických peptidů a jiných antibiotik lišit, avšak nebyl doposud zcela prozkoumán [29].

### **1.2.1. Kationické antimikrobiální peptidy**

Kationické peptidy rozdělujeme na základě převažujících struktur do tří tříd: lineární amfipatické peptidy tvořící  $\alpha$ -helixy, peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky a lineární peptidy bohaté na určitou aminokyselinu (prolin, glycin, tryptofan nebo histidin) [40,41,42].

#### **1.2.1.1. Lineární amfipatické peptidy tvořící $\alpha$ -šroubovice**

Zástupcem této třídy jsou cecropiny – skupina 3-4 kDa velkých, lineárních peptidů, tvořících dva  $\alpha$ -helikální segmenty (silně bazická *N*-koncová doména a dlouhé hydrofobní *C*-koncové šroubovice) spojené krátkou smyčkou (Tabulka 1). První cecropin (Obrázek 5) byl charakterizován v 80. letech 20. století u motýla *Hyalophora cecropia* [43].

Dále mezi tyto peptidy řadíme magainin izolovaný z kůže drápatky *Xenopus laevis*. Relativně novou skupinou těchto kationických peptidů jsou buforiny (2-4 kDa) izolované z ropuchy [31], které jsou strukturně podobné cecropinům. Cecropiny, magaininy a buforiny jsou obranou proti široké škále bakterií, hub a parazitů. U savců včetně člověka

byly izolovány  $\alpha$ -helikální antimikrobiální peptidy patřící do rodiny cathelicidinů, které jsou produkovány hlavně fagocyty. Spektrum jejich účinku je stejné jako u cecropinů [44].



**Obrázek 5.** Trojrozměrná struktura cecropinu

#### 1.2.1.2. Peptidy bohaté na cystein a disulfidové můstky

Do této skupiny patří velká řada antimikrobiálních peptidů s hmotností 2-8 kDa charakteristická přítomností více cysteinů tvořících disulfidové můstky (Tabulka 2). První skupinou jsou menší peptidy, které obsahují jeden disulfidový můstek. Patří sem thanatin (Obrázek 6) izolovaný z kněžice *Podisus maculiventris* [45] vykazující 40% sekvenční podobnost s brevininem izolovaným z žabí kůže nebo ranacycliny izolované z kůže skokana zeleného *Rana esculenta* [46].

Dále sem patří peptidy obsahující dva disulfidové můstky; androctonin ze škorpióna, tachyplesin z ostrorepa a protegrin I z prasete. Tyto 2-kDa velké peptidy tvoří vlásenkové struktury a působí proti bakteriím a houbám [47].



**Obrázek 6.** Trojrozměrná struktura thanatinu

**Tabulka 1.**  $\alpha$ -Helikální lineární antimikrobiální peptidy.

Peptid	Sekvence	Zdroj
Andropin	VFIDILDKVNAIHNAAQVGIGFAKPFKELINPK	octomilka ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
BLP-1	GIGASILSAGKSALKGLAKGLAEHFAN <sup>a</sup>	kuňka východní ( <i>Bombina orientalis</i> )
Bombinin	GIGALSAKGALKGLAKGLAEHFAN <sup>a</sup>	kuňka žlutobřichá ( <i>Bombina variegata</i> )
Bombolitin	IKITTMLAKLGKVLAVH <sup>a</sup>	čmelák ( <i>Megabombus pennsylvanicus</i> )
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIIRDGIIKAGPAVAVVGGATQIAK <sup>a</sup>	můra ( <i>Hyalophora cecropia</i> )
Cecropin	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVIGSAKAI <sup>a</sup>	bourec morušový ( <i>Bombyx mori</i> )
Cecropin	WNPFKELERAGQRVRDAVISAAPAVATVGQAAAIARG <sup>a</sup>	lišaj tabákový ( <i>Manduca sexta</i> )
Cecropin C	GWLKKGKRIERIGQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG <sup>a</sup>	octomilka ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR <sup>a</sup>	prase divoké ( <i>Sus scrofa</i> )
Ceratotoxin A	SIGSALKKALPVAKKIGKIALPIAKAALP	vrtule velkohlavá ( <i>Ceratititis capitata</i> )
Clavanin A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV <sup>a</sup>	pláštěnec ( <i>Styela clava</i> )
CRAMP	ISRLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQPE	myš domácí ( <i>Mus musculus</i> )
Dermaseptin 1	ALWKTMLKKGTMALHAGKAALGAAANTISQGTQ	žába ( <i>Phyllomedusa sauvageii</i> )
Enbocin	WNYFKEIERAVARTRDAVISAGPAVATVAAATSVAS <sup>a</sup>	bourec morušový ( <i>Bombyx mori</i> )
FALL-39	FALLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	člověk ( <i>Homo sapiens</i> )
Lycotoxin I	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL <sup>a</sup>	pavouk ( <i>Lycosa carolinensis</i> )
Magainin 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	drápatka vodní ( <i>Xenopus laevis</i> )
Melittin	GIGAVLKVLTGGLPALISWIKRKRQQ <sup>a</sup>	včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Misgurin	RQRVEELSKFSKKGAAARRRK	piskoř dálnovýchodní ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL <sup>a</sup>	drápatka vodní ( <i>Xenopus laevis</i> )
Pleurocidin	GWGSFFKKAHVGVGKAALTHYL	platýz zlatý ( <i>Pleuronectes americanus</i> )
Styelin	GWFGKAFRSVSNFYKHKTYIHAGLSAATLLG	pláštěnec ( <i>Styela clava</i> )

<sup>a</sup> C-koncový amid

Dále sem patří velká skupina 4 kDa velkých defensinů, které byly izolovány z hmyzu, savců a rostlin (Obrázek 7). Defensiny u rostlin a bezobratlých obsahují celkem tři (hmyzí defensiny) až čtyři (drosomycin z *Drosophily* a rostlinné defensiny) disulfidové můstky a mají podobnou strukturu tvořenou  $\alpha$ -šroubovicí spojenou s  $\beta$ -listem dvěma disulfidovými můstky (tzv. CS $\alpha\beta$  motiv). U savců rozlišujeme  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\theta$ -defensiny charakterizované antiparalelním postavením  $\beta$ -listů stabilizovaných třemi disulfidovými můstky [47,48].



**Obrázek 7.** Trojrozměrná struktura lidského  $\beta$ -defensinu (vlevo) a hmyzího defensinu (vpravo).

V roce 1999 byla definována nová skupina cyklických peptidů se třemi disulfidovými můstky a  $\beta$ -listy označená jako cyklotoidy. Poprvé byly izolovány z rostlin, dále i z bakterií a živočichů. Mají široké spektrum biologických aktivit od hemolytické, antimikrobiální, antivirové po insekticidní a jsou také inhibitory trypsinů [49].

Lysozomy představují skupinu hydroláz, které jsou přítomné ve všech žijících organismech. Jsou to velké polypeptidy bohaté na cysteiny (cca 14 kDa) a štěpí peptidoglykan v buněčné stěně Gram-pozitivních bakterií [50].



**Tabulka 2.** Antimikrobiální peptidy s disulfidovými můstky.

Peptid	Sekvence	Zdroj
<b>Jeden disulfidový můstek</b>		
Bovine dodecapeptide	RLCRIVVIRVCR	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
Brevinin-1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKC	japonská žába ( <i>Rana brevipoda porsa</i> )
Thanatin	GSKKPVPPIIYCNRRRTGKCQRM	ploštice ( <i>Podisus maculiventris</i> )
<b>Dva disulfidové můstky</b>		
Androctonin	RSVCRQIKICRRRRGGCYKCTNRPY	štír tlustorepý ( <i>Androctonus australis</i> )
Protegrin I	RGGRLCYCRRRFCVCGR	prase divoké ( <i>Sus scrofa</i> )
<b>Tři disulfidové můstky: <math>\alpha</math>-defensinová rodina</b>		
Cryptdin 1	LRDLVCYCRSRGCKGRERMNGTCRKGHLLYTLCCR	myš domácí ( <i>Mus musculus</i> )
HNP-1 ( $\alpha$ -defensin)	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	člověk ( <i>Homo sapiens</i> )
RK-1	MPCSCKKYCDPWEVIDGSCGLFNSKYICCREK	králík divoký ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )
<b>Tři disulfidové můstky: <math>\beta</math>-defensinová rodina</b>		
$\beta$ -Defensin-1	DFASCHTNGGICLPNRCPGHMIQIGCIFRPRVKCCRSW	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
TAP	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCRKK	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
<b>Tři disulfidové můstky: hmyzí defensiny</b>		
Defensin	GFGCPLDQMQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR	vážka ( <i>Aeschna cyanea</i> )
Royalisin	VTCDLLSKFGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEKGVCI- -RKTSFKDLWDKYF	mateří kašička ( <i>Apis mellifera</i> )
Sapecin	LTCEIDRSLCLLHCRLKGYLRAYCSQQKVCRCVQ	masařaka ( <i>Sarcophaga peregrina</i> )
<b>Více než tři disulfidové můstky</b>		
Drosomycin	DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPSL- -KCWCEGC	octomilka ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
Tachycitin	YLAFRCGRYSPCLDDGPNVNLVSCCSFYNCHKCLARLE- -NCPKGLHYNAYLKVCDWPSKAGCTSVNKECHLWKTGRK	ostrorep východoasijský ( <i>Tachypleus tridentatus</i> )

### 1.2.1.3. Peptidy bohaté na určitou aminokyselinu: prolin, glycin, tryptofan nebo histidin

Tuto skupinu (Tabulka 3) tvoří 2-3 kDa velké peptidy s velkým zastoupením specifické aminokyseliny, většinou kladně nabitě či hydrofobní. Z hmyzu byly izolovány antimikrobiální a antifungální peptidy bohaté na prolin mezi něž patří např. drosocin a metchnikowin z octomilky *Drosophila melanogaster*, pyrrhocoricin (Obrázek 8) z plošnice *Pyrrhocoris apterus* a metalnikowin z kněžnice *Palomena prasina* [51]. Peptidy bohaté na aminokyselinu glycin diptericiny [12] a attaciny [52] byly objeveny u řádu dvoukřídlých, apidaeciny (2 kDa) a abaeciny (4 kDa) u včely medonosné *Apis mellifera* [53]. Ze savců byly izolováni zástupci těchto peptidů s převažující aminokyselinou histidinem jako například histatin u člověka [40] nebo tryptofanem indolicin u skotu [54].



**Obrázek 8.** Trojrozměrná struktura pyrrhocoricinu.

### 1.2.2. Postranlační modifikace antimikrobiálních peptidů

Některé antimikrobiální peptidy jsou postranlačně modifikovány a tyto modifikace ovlivňují jejich antimikrobiální aktivitu. Glykosylace byla popsána u peptidů bohatých na aminokyselinu prolin mezi něž patří diptericin, drosocin a pyrrhocoricin. Intramolekulární disulfidové můstky jsou charakteristické pro defensiny. Snad nejběžnější postranlační modifikací je amidace např. u cecropinů, apidaecinů a diptericinů. V některých případech C-koncová amidace peptidů zvyšovala antimikrobiální aktivitu. Výskyt D-aminokyseliny byl popsán v bombininu z kuňky žlutobřiché *Bombina variegata*, pravděpodobně je důvodem ochrana před aminopeptidázami. Dalšími méně častými modifikacemi jsou halogenace (misgurin), fosforylace serinu (enkelytin) či hydroxylace lysinu u cecropinu B [40].

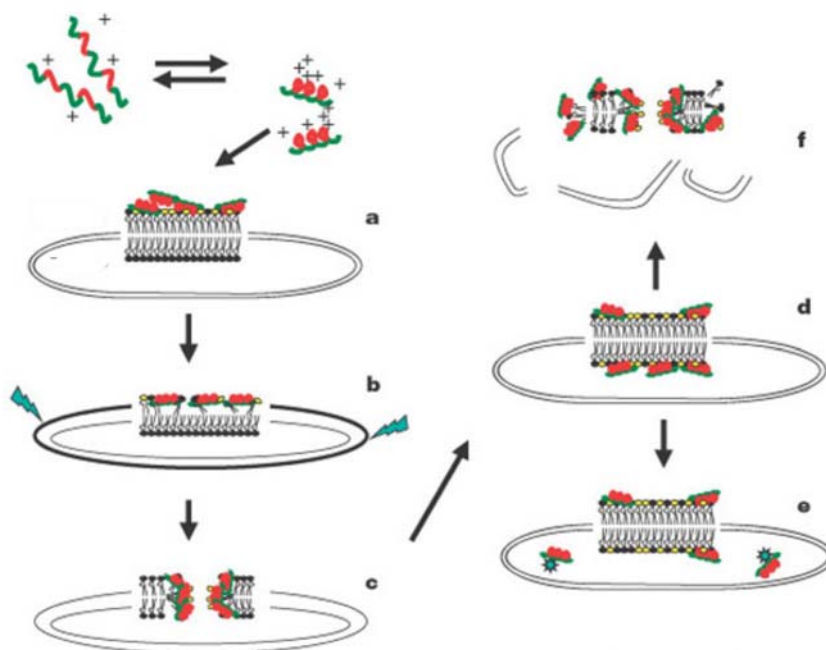
**Tabulka 3.** Lineární peptidy bohaté na určitou aminokyselinu.

Peptid	Sekvence	Zdroj
Abaecin	YVPLPNVPQGRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY	včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Apidaecin IA	GNNRPVYIPQPRPPHPRI <sup>a</sup>	včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Bactenecin 5	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLRFP	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
Diptericin	DEKPKLILPT <sup>b</sup> PAPPNLPQLVGGGGGNRKGDFGVSVDAHQKV- -WTSNDRHSIGVT <sup>b</sup> PGYSQHLGGPYGNSRPDYRIGAGYSYNF <sup>a</sup>	moucha ( <i>Phormia terranova</i> )
Drosocin	GKPRPYSPRPT <sup>b</sup> SHPRPIRV	octomilka ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
Enkelytin	KRFAEPLPSEEEGES <sup>c</sup> YS <sup>c</sup> KEVPEMEKRYGGFM <sup>a</sup>	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
Formaecin 1	GRPNPVNNKPT <sup>b</sup> PHPRL	australský mravenec ( <i>Myrmecia gulosa</i> )
Histatin I	DS <sup>c</sup> HEKRHHGYRRKFHEKHSHKFEFPFYGDYGSNYLYDN	člověk ( <i>Homo sapiens</i> )
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR <sup>a</sup>	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )
Lebocin 1	DLRFLYPRGKLPVPT <sup>b</sup> PPPFNPKPIYIDMGNRY	bourec morušový ( <i>Bombyx mori</i> )
Metchnikowin	HRHQGPIFDTRPSPFNPNQPRPGPIY	octomilka ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP	prase divoké ( <i>Sus scrofa</i> )
Prophenin	AFPPPNVPGPR(FPPPNFPGPR) <sub>3</sub> FPPPNFPGPP- -FPPPIFPGPW FPPPPFRPP PFGPPRF <sup>a</sup>	prase divoké ( <i>Sus scrofa</i> )
Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPT <sup>b</sup> PPRPIYNRN	ruměnice pospolná ( <i>Pyrrhocorus apterus</i> )
Tenecin	HHDGHLGGHQGTGHQGGQGGHGGQGGHGGHGGHGGQGGPG- -DGHLGGHQQGIGGTGGQQHGQHGP GTGAGHQGGYKTHGH	potemník moučný ( <i>Tenebrio molitor</i> )

<sup>a</sup> C-koncový amid, <sup>b</sup> glykosylovaný threonin, <sup>c</sup> fosfoserin

### 1.3. Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů

Mechanismus působení úzce souvisí se schopností antimikrobiálních peptidů interagovat s biologickými membránami. Peptidy buď narušují jejich stabilitu a spojitost, nebo jimi pronikají a ovlivňují metabolické funkce buňky. Složení biologických membrán je důležitým faktorem ovlivňujícím specifitu rozpoznání patogenu od hostitelských buněk. Model Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Obrázek 9) vysvětluje aktivitu většiny antimikrobiálních peptidů což bude podrobně vysvětleno v dalších kapitolách [31,55].



**Obrázek 9.** SMH model působení antimikrobiálních peptidů. Obrázek převzat z práce Zasloffa [31]: **a**, vnější membrána je pokryta peptidy („carpeting“); **b**, integrace peptidů do membrány a zároveň ztenčování membrány; **c**, tvorba přechodných děr („wormhole“) do membrány; **d**, přenos lipidů a peptidů na vnitřní stranu membrány; **e**, difuze peptidů k intracelulárnímu cíli (v některých případech); **f**, rozpad membrány na fragmenty, fyzické rozrušení membrány cílových buněk.

#### 1.3.1. Obecná kritéria pro působení antimikrobiálních peptidů

Pro působení antimikrobiálních peptidů jsou důležité jejich konformace, náboj, hydrofobicita, hydrofobní moment, amfipaticita a polární úhel. Je důležité zdůraznit, že tato kritéria jsou v rovnováze a navzájem na sobě závislá, změna jednoho je obvykle

vykompenzována změnou ostatních. Extrémní odchylky v těchto vlastnostech mohou vést ke snížení antimikrobiální aktivity a selektivní toxicity [56]. Prakticky všechny antibakteriální peptidy tvoří při vazbě na membránu amfipatické struktury, nejčastější strukturou je  $\alpha$ -šroubovice [55].

Kationické antimikrobiální peptidy obsahují méně než 50 aminokyselin. Díky přítomnosti aminokyselin lysinu nebo argininu je jejich celkový náboj od +2 do +10 [5]. Minimální velikost kladného náboje pro interakci peptidu s membránou patogenu, která je nabita záporně, je právě +2. Nižší hodnoty již nejsou dostatečné pro signifikantní selektivitu k mikroorganismům. Zvyšování kladného náboje antimikrobiálních peptidů záměnou aminokyselin může v určitém rozsahu zvýšit jejich antimikrobiální účinky [57]. Někdy však může zvýšení kladného náboje naopak plně potlačit antimikrobiální aktivitu a zvýšit například hemolytické účinky namířené proti hostitelským buňkám [56].

Hydrofobicita, která je dána procentem hydrofobních aminokyselin v peptidovém řetězci, se většinou pohybuje kolem 50%. Přestože je nezbytná pro efektivní membránovou permeabilizaci, zvyšování hydrofobicity silně koreluje s toxicitou vůči savcím buňkám a ztrátou specifity vůči buňkám mikrobiálním [57].

Polární úhel vyjadřuje prostorové uspořádání hydrofóbních a hydrofilních aminokyselin, které tvoří domény kooperující při permeabilizaci membrány. Polární úhel se také ukázal být v úzkém vztahu s celkovou stabilitou a poločasem rozpadu membránových pórů indukovaných těmito peptidy [56].

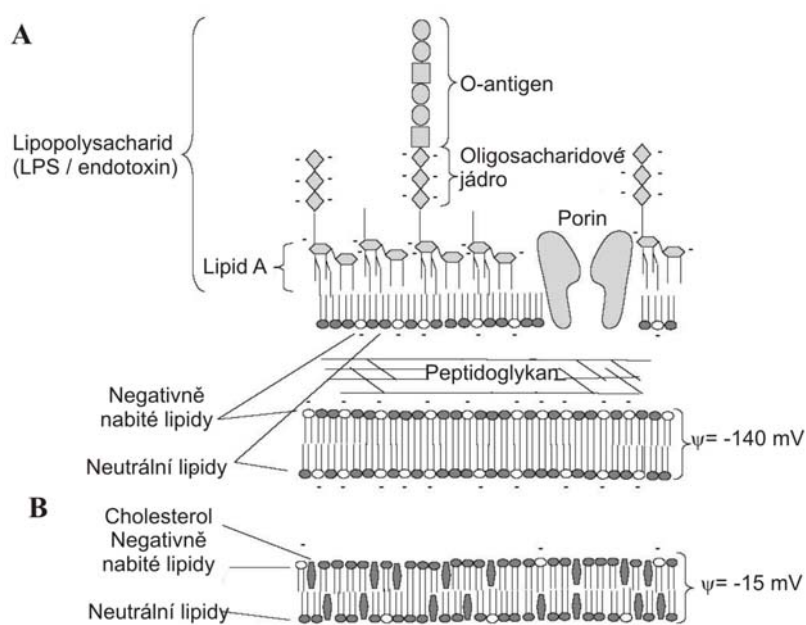
### **1.3.2. Specifita a selektivní toxicita antimikrobiálních peptidů**

Působení peptidů proti bakteriálním infekcím chrání hostitele a proto je kladen důraz na selektivní působení antimikrobiálních peptidů pouze proti patogenům, především proti bakteriím. Toto rozpoznání umožňují rozdíly ve struktuře, složení a transmembránovém potenciálu mezi prokaryotní (bakteriální) a eukaryotní membránou.

Všechny biologické membrány jsou tvořeny fluidní mozaikou fosfolipidů. Fosfolipidy jsou amfipatické (amfifilní) povahy, to znamená že v rámci molekuly obsahují současně hydrofobní i hydrofilní část. Bakterie jsou navíc obaleny buněčnou stěnou, jejíž složení se liší u Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií a hub.

Buněčné membrány bakterií jsou bohaté na fosfolipidy s negativním nábojem (fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin). K celkovému negativnímu náboji přispívají také složky bakteriální stěny. Těmito složkami jsou fosfolipidy, glykolipidy,

lipoproteiny a u Gram-negativních jsou to navíc lipopolysacharidy (Obrázek 10A). Naproti tomu dvojvrstva buněčné membrány vyšších živočichů obsahuje ve velké míře zwitterionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu, které dávají membráně náboj neutrální (Obrázek 10B). Rozdílná distribuce jednotlivých molekul ve vnitřní a vnější straně membrány vytváří nábojovou asymetrii, vedoucí k tvorbě transmembránového potenciálu ( $\Delta\psi$ ). Například normální savčí buňka vykazuje  $\Delta\psi$  od  $-90$  do  $-110$  mV. U patogenních bakterií v logaritmické fázi růstu je to  $-130$  až  $-150$  mV. Hodnota transmembránového potenciálu je důležitým faktorem pro elektrostatické přiblížování kationického peptidu k membráně [56].



**Obrázek 10. A:** Zobrazení hlavní charakteristiky buněčného obalu Gram-negativních bakterií: vysoké zastoupení negativně nabitých lipidů, anionický charakter lipopolysacharidů a velice záporný transmembránový potenciál. **B:** Pro složení eukaryotické membrány je typické nižší zastoupení anionických lipidů stejně jako vysoké procento cholesterolů. (Obrázek převzat z práce Mcphee a Hancocka [5]).

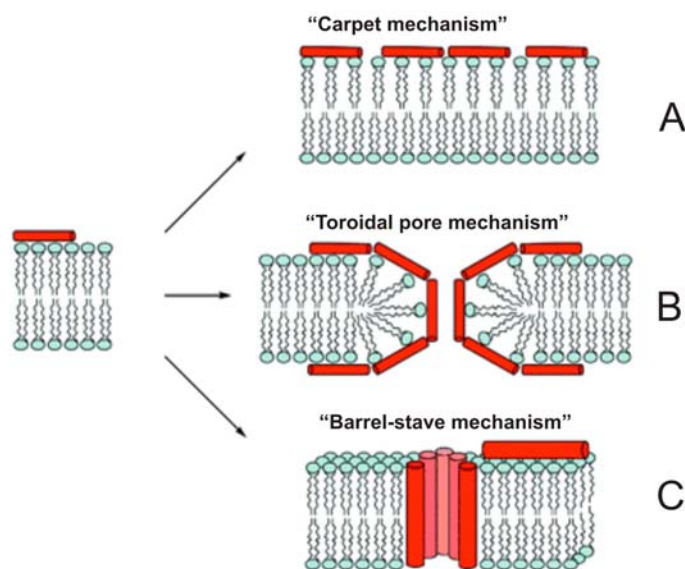
### 1.3.3. Molekulární mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Prvním krokem při působení antimikrobiálních peptidů je přiblížení a interakce s buněčnou membránou. Hnacím mechanismem jejich migrace k bakteriální membráně jsou elektrostatické interakce a membránový potenciál. Následuje několik možností

navození buněčné smrti: fatální depolarizace membrány, vytváření selektivních kanálů nebo „děr“ a ztráta buněčného obsahu, aktivace destrukčních procesů, jež zahrnuje aktivace hydroláz buněčné stěny, narušení funkce membrány translokací lipidů a nakonec proniknutí peptidu k intramolekulárnímu cíli [31].

Peptidy, které narušují celistvost biomembrán jsou převážně ze skupiny  $\alpha$ -helikálních peptidů [58]. Tvorba iontově selektivních kanálů může vést ke ztrátě transmembránového potenciálu a tedy energetické funkce biomembrány [59]. Větší „díry“ mohou vést ke ztrátě životně důležitých látek z cytoplazmy a způsobují smrt.

Včlenění antimikrobiálních peptidů do bakteriální membrány paralelně s dvojvrstvou mezi hydrofobní a hydrofilní část vytváří místo, kde se následně agregují další molekuly peptidu. Po dosažení kritické koncentrace se peptidy reorientují za tvorby vodivých kanálů, které umožňují únik protonů a jiných iontů, popřípadě větších molekul z buňky. To je princip mechanismů vzniku tzv. „sudové skruže“ („barrel-stave mechanism“) na Obrázku 11C u peptidů se strukturou  $\beta$ -listu nebo  $\alpha$ -šroubovice. Jiným mechanismem je tvorba tzv. „toroidního (prstencového) póru“ („toroidal pore mechanism“) na Obrázku 11B u  $\alpha$ -helikálních peptidů (např. magaininu) [56]. Poněkud odlišný je tzv. „kobercový mechanismus“ („carpet-mechanism“) na Obrázku 11A, kdy dochází k agregaci peptidů vně membrány a po dosažení kritické koncentrace je membrána prolomena [55].



**Obrázek 11.** Mechanismus tvorby póru v membráně antimikrobiálními peptidy. **A**, nespecifický mechanismus (rozrušení membrány např. detergenty); **B**, a **C**, specifické mechanismy typické pro některé antimikrobiální peptidy, které takto přenesou přes membránu aniž by ji nevratně porušili.

Některé antimikrobiální peptidy jako pyrrolicin, apidaecin a drosocin jsou však translokovány membránou bez jejího znatelného narušení. Uvnitř buňky způsobují například inhibici bakteriálního chaperonu DnaK („heat shock proteinu“) [60-62]. Některé peptidy silně narušují syntézu DNA a inhibují syntézu RNA a proteinů, nebo způsobují jejich nesprávnou translaci (indolicin, attacin) [5,52]. Alternativně mohou antimikrobiální peptidy sloužit k potlačení aktivity proteáz účastnících se zánětlivých procesů. Příkladem je inhibice serinové proteázy furinu histatinem 3 [63] nebo inhibice kathepsinu L probactenecinem 5 z hovězích neutrofilů [64].

#### **1.3.4. Synergismus antimikrobiálních peptidů**

Mikrobiologické a biofyzikální studie většinou testují biologické aktivity jednotlivých antimikrobiálních peptidů za účelem minimalizace experimentální variability. Nicméně v přírodě se antimikrobiální peptidy nevyhnutelně vyskytují ve směsi a mohou současně interagovat s mikrobiálními patogeny. Příkladem jsou směsi peptidů uvnitř fagolysosómu nebo v extracelulárním prostoru. V roce 2001 Yan a Hancock demonstrovali synergické působení různých antimikrobiálních peptidů s lysozymem [65].

#### **1.4. Zdroje hmyzích antimikrobiálních peptidů**

Hmyz je druhově nejpočetnější a nejvíc rozmanitou skupinou živočichů [8]. Existuje přibližně 800000 druhů hmyzu a asi 80% druhů bylo dosud identifikováno a klasifikováno. Hmyz se setkává v průběhu životního cyklu s širokým spektrem mikroorganismů. Úžasná rozmanitost a evoluční úspěch hmyzu dokazuje, že mají účinnou obranu proti mikroorganismům. V posledních letech byly právě z rozličných druhů hmyzu izolovány peptidy, které vykazovaly zajímavou aktivitu *in vitro* proti mikroorganismům rezistentním ke konvenčním antibiotikům [9]. Právě tyto peptidy by se mohly stát vzorem pro tvorbu nových terapeutických zbraní v boji s mikroorganismy.

Hmyz můžeme rozdělit na druhy, které procházejí přeměnou nedokonalou (hemimetabolie) a přeměnou dokonalou (holometabolie).



### 1.4.1. Hmyz s nedokonalou proměnou

Hemimetabolie znamená, že mezi vajíčkem a dospělcem se jedinec vyskytuje jako nymfa, která se vyvíjí postupným svlékáním. Larvální stadia se již podobají dospělcům. Jako příklad hemimetabolního hmyzu můžeme jmenovat ploštice (*heteroptera*), vážky (*odonata*) a sarančata (*caelifera*). Z ploštice ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* (Obrázek 12) byl izolován antimikrobiální peptid pyrrhocoricin [66].



Obrázek 12. *Pyrrhocoris apterus*.

Dálšími zástupci řádu ploštic, ze kterých byly izolovány antimikrobiální látky jsou kněžnice *Podisus maculiventris* (Obrázek 13) a *Palomena prasina* (Obrázek 14). Z kněžnice travozelené *Palomena prasina* byl izolován peptid metalnikowin I [67] a kněžnice *Podisus maculiventris* byla zdrojem peptidu thanatinu o 21 aminokyselinách [45].



Obrázek 13. *Podisus maculivetrus*.



Obrázek 14. *Palomena prasina*.

### 1.4.2. Hmyz s dokonalou proměnou

Holometabolie znamená, že hmyz prochází čtyřmi stádii života. Mezi stádiem larvy a imága prochází stádiem kukly. Během této metamorfózy je ničena většina tkání a vytvářejí se zcela nové. Nejdůležitější činností larválního stádia je příjem potravy a růst. Jakmile po několika svlékáních larva doroste konečné velikosti, promění se v kuklu. Dokonalou přeměnou prochází několik řádů hmyzu: řád brouci (*Coleoptera*, 350 000

druhů), blanokřídlí (*Hymenoptera*, 200 000 druhů), motýli (*Lepidoptera*, 165 000 druhů) a také dvoukřídlí (*Diptera*, 150 000 druhů).

Larvy potemníka brazilského *Zophobas atratus* poskytly například zástupce skupiny defensinů coleopteracin [68]. Dva nové defensiny byly izolované z larev listokaze *Anomala cuprea* (Obrázek 15) [69]. Z imunizované hemolymfy zástupce blanokřídlých, včely medonosné *Apis mellifera* (Obrázek 16) byly izolovány malé (2 kDa) antimikrobiální peptidy bohaté na prolin nazvané apidaeciny [53].



**Obrázek 15.** *Anomala cuprea*.



**Obrázek 16.** *Apis mellifera*.

Studium motýlů trvalo téměř padesát let než se podařilo izolovat a charakterizovat látky zapojené do mechanismu humorální imunity. Bylo dokazáno, že můra *Hyalophora cecropia* (Obrázek 17), zavíječ voskový *Galleria mellonella* a lišaj tabákový *Manduca sexta* syntetizují jako odpověď na bakteriální indukci tři hlavní skupiny peptidů: cecropiny (4 kDa), attaciny (20-22 kDa) a lysozomy (14 kDa) [70,71,50].

Řád dvoukřídlí (Diptera) je na světě zastoupen více než 100 000 druhy ve 131 čeledích. Také z řádu dvoukřídlých, jehož zástupci jsou *Drosophila melanogaster* (Obrázek 18) a *Sarcophaga peregrina* z čeledi *Drosophilidae* (octomilkovití) a *Sarcophagidae* (masařkovití) byly izolovány antimikrobiální peptidy. Dvoukřídlí se rozmnožují až na výjimky pohlavně a vajíčka kladou přímo na živný podklad. Nejvýznamnějšími a nejvyužívanějšími ve výzkumu antimikrobiálních peptidů jsou právě čeledi octomilkovití (*Drosophilidae*) a masařkovité (*Sarcophagidae*).



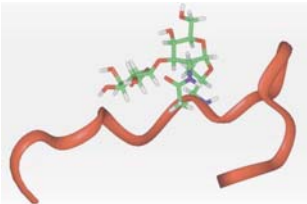
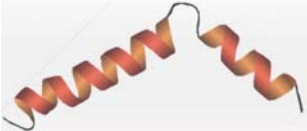
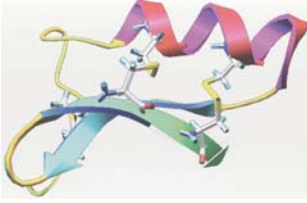
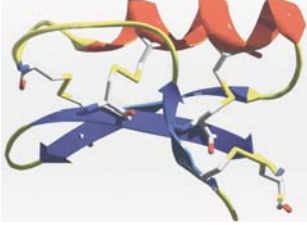
**Obrázek 17.** *Hyalophora cecropia*.



**Obrázek 18.** *Drosophila melanogaster*.

U octomilky byla provedena řada studií a byly izolovány peptidy s příslušnou antimikrobiální či antifungální aktivitou. Souhrn je uveden v Tabulce 4 [12,13,15,72,73].

**Tabulka 4.** Antimikrobiální peptidy octomilky *Drosophila melanogaster*. Převzato z práce Lemaitra a Hoffmanna [13]. MIC, minimální inhibiční koncentrace tj. nejnižší koncentrace látky, která úplně inhibuje růst bakterie; nd, neidentifikována 3D struktura.

Peptid	Cílový mikroorganismus	MIC	3D struktura
Diptericin	G-negativní bakterie	0,5 $\mu\text{M}$	nd
Attacin	G-negativní bakterie	nd	nd
Drosocin	G-negativní bakterie	40 $\mu\text{M}$	
Cecropin	G-negativní bakterie	20 $\mu\text{M}$	
Defensin	G-pozitivní bakterie	1 $\mu\text{M}$	
Drosomycin	houby	100 $\mu\text{M}$	
Metchnikowin	houby	10 $\mu\text{M}$	nd

V 80. letech minulého století se skupina S. Natoriho zabývala studiem masařky *Sarcophaga peregrina*, organismem z čeledi masařkovitých. Z larev této masařky byly izolovány sarcotoxiny I, II, a III. Larvy byly ve třetím instaru indukovány bakteriální

suspenzi *Escherichia coli* nebo jen hypodermickou jehlou [74]. Podle *N*-terminální sekvence byly jednotlivé typy sarcotoxinů zařazeny do tří skupin antimikrobiálních peptidů: cecropiny (sarcotoxin I), attaciny (sarcotoxin II) a diptericiny (sarcotoxin III). Bylo také zjištěno, že na rozdíl od sapecinů jsou tyto peptidy syntetizovány v tukovém tělese. Jejich antimikrobiální účinky se při testování projevily pouze v účinku na Gram-negativní bakterie jako *Escherichia coli* a *Shigella sonnei* [75]. Mechanismus jejich působení spočívá v interakci s membránou. U sarcotoxinu I byla konkrétně zjištěna inhibice aktivního transportu a snížení koncentrace ATP [76]. Aromatický dipeptid *N*- $\beta$ -alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylanin (*5-S-GAD*) byl izolován z larev masařky *Sarcophaga peregrina* [35]. *5-S-GAD* je tvořen tyrozinázou z  $\beta$ -alanyl-tyrozinu a glutathionu v tukovém tělese a vykazuje účinnost proti Gram-pozitivní i Gram-negativní infekci. Předpokládá se, že uvolňování peroxidu vodíku touto sloučeninou je nezbytné pro její antimikrobiální efekt [35].

Larvy masařky *Sarcophaga peregrina* indukují tvorbu sapecinu jako odpověď na injekci bakteriální suspenze nebo poranění hypodermickou jehlou [77]. Sapecin patří do rodiny defensinů a byl poprvé izolován ze zárodečné buněčné linie masařky *Sarcophaga peregrina* NIH-Sape-4 [78]. Jeho aktivace probíhá v zárodečné linii a ve stádiu kukly bez vnějšího stimulování. Existuje předpoklad, že vedle antimikrobiální aktivity má podobnou funkci jako růstový faktor [77]. Sapeciny vykazují antimikrobiální aktivitu proti široké škále mikroorganismů. Na Gram-pozitivní bakterie jsou účinné přibližně dvakrát více než na Gram-negativní bakterie. Sapecin interaguje s kardiolipinem jako jednou ze složek biologické membrány. Zvýšený obsah tohoto lipidu v membráně vyvolává zvýšenou schopnost sapecinů interagovat s membránou [79,80]. Dále byly z buněčné linie NIH-Sape-4 izolovány dva homology sapecinu, sapecin B a C [81]. Sapecin C obsahuje stejný počet aminokyselin jako sapecin A při sekvenční identitě 73 %. Naproti tomu sapecin B obsahuje pouze 34 aminokyselin a větší podobnost má s charybdotoxinem, který byl izolovaný z krevního řečiště škorpióna. Podobně jako charybdotoxin vykazuje sapecin B mimo jiné schopnost regulovat draslíkové ( $K^+$ ) kanály v mozku. Sapecin B byl izolován z mozečku masařky avšak tyto kanály ( $K^+$ ) byly dosud identifikovány pouze u octomilky [82].

Jestliže byly larvy masařky *Sarcophaga peregrina* injektovány cizorodými buňkami došlo k sekreci 26/29 kDa proteázy z hemocytů do hemolymfy. Tato proteáza může přispívat k odstranění cizorodých látek z hemolymfy [83]. Dosud izolované obranné látky z masařky *Sarcophaga peregrina* jsou shrnuty v Tabulce 5.

**Tabulka 5.** Vybrané obranné molekuly masařky *Sarcophaga peregrina*. Převzato z práce Natoriho a kolektivu [84].

Název obranné molekuly	Zdroj	Mr [kDa]	Aktivita
Sapeciny (A, B, C)	hemocyty	4	G-pozitivní bakterie
Sarcotoxin I (A, B, C, D, E)	tukové těleso	3,5	G-negativní bakterie
Sarcotoxin II (A, B, C)	tukové těleso	24	G-negativní bakterie
Sarcotoxin III	tukové těleso	7	G-negativní bakterie
5-S-GAD	tukové těleso	0,573	G-neg.,G-poz. bakterie
AFP	tukové těleso	7	houby
<i>Sarcophaga</i> lektin	tukové těleso	30-32	váže galaktózu
Granulocytin	konstitutivní	20	váže mucin
26/29 kDa proteáza	konstitutivní	26,29	posttranslační modifikace

#### 1.4.2.1. Masařka *Sarcophaga bullata*

Masařka šedá *Sarcophaga (Neobelliera) bullata* Parker 1916 (Obrázky 19 a 20) patří do čeledi masařkovitých *Sarcophagidae*, do řádu dvoukřídlých *Diptera*. Jedná se o všeobecně známou, statnou mouchu o velikosti 10-20 mm. Základní zbarvení těla je šedé, přičemž zadeček může být černobíle kostkovaný nebo šedý. Polokulovité oči jsou červené nebo nahnědlé, celé tělo je řídky kryto černými štětinami. Masařka je hojná ve volné přírodě i v blízkosti člověka, živí se květními šťávami, občas ale konzumuje zdechliny a napadá dešťovky, hlemýždě a jiný hmyz. Snáší vajíčka, ze kterých se ihned líhnou larvy, některá literatura dokonce uvádí přímo živorodost. Na tomto místě je ale dobré si připomenout i jednu zvláštní vlastnost muších larev. Mohou napadat zhnisané rány, kde se živí převážně hnísem a buněčným detritem a tak ránu čistí. Toto využíval například Napoleonův chirurg Larrey při tažení do Egypta, za první světové války pak americký chirurg Bayer a dnes tato metoda opět zažívá renezanci (<http://fotoblog.in/kat/dvoukridli-diptera>).



**Obrázek 19.** *Sarcophaga bullata*.



**Obrázek 20.** Larvy masařky *Sarcophaga bullata*.

$\beta$ -Alanyl-tyrozin byl objeven u masařky *Sarcophaga (Neobelieria) bullata* Levenbookem a kol. [85] a Meylaersovou a kol. [4]. Byl nazývan také sarcofagin a pro jeho toxický efekt proti dospělcům také paralyisin [86]. Vykazuje antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím v milimolárních koncentracích. Nejnižší minimální inhibiční koncentrace byla stanovena na 8 mM proti bakteriím rodu *Bacillus*. Dále byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace u bakterie *Escherichia coli* 30 mM, u bakterie *Staphylococcus aureus* 24 mM. Experimentálně bylo zjištěno, že při třikrát vyšší koncentraci má  $\beta$ -alanyl-tyrozin efekt již baktericidní [4].

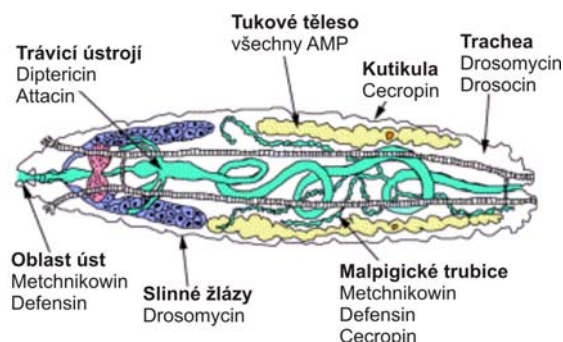
### **1.5. Expresa antimikrobiálních peptidů**

Antimikrobiální peptidy i proteiny jsou buď exprimovány konstitutivně nebo je jejich exprese indukována podnětem, kterým může být průnik patogenu do těla nebo poranění. U hmyzu s nedokonalou proměnou jsou antimikrobiální peptidy produkovány konstitutivně a skladovány v hemocytech a při infekci jsou uvolňovány do hemolymfy. U hmyzu s dokonalou proměnou je transkripce antimikrobiálních peptidů inducibilní. Antimikrobiální peptidy jsou při infekci rychle syntetizovány v tukovém tělese nebo epiteliích střeva a dýchacího ústrojí [16]. Identifikace mutantu octomilky *Drosophila* u něhož se neindukuje gen kódující antimikrobiální peptidy vedla k objevu dvou signálních drah Toll a Imd, které regulují transkripci většiny genů účastnících se imunitní obrany u much [87,88]. Konstitutivní exprese před infekcí se vyskytuje především v reprodukčním ústrojí much, zatímco larvy vykazují zejména inducibilní expresi v epiteliích trávicího a respiračního traktu [89].

Při systémové (celkové) infekci jsou antimikrobiální peptidy a proteiny většinou exprimovány v tukovém tělese a hemocytech. Lokální infekce může vyvolat expresi



antimikrobiálních peptidů v povrchových epitelech, které jsou v kontaktu s mikroorganismy (epidermis, trávicí, respirační a reprodukční trakt, viz. Obrázek 21) [90,91]. Předběžné studie naznačují, že exprese genů kodujících antimikrobiální peptidy v těchto tkáních je kontrolována Imd signální kaskádou [92].



**Obrázek 21.** Místa exprese antimikrobiálních peptidů v larvě *Drosophily*. Obrázek převzat z práce Tzoua a kolektivu [91].

### 1.5.1. Konstitutivní antimikrobiální peptidy

Mezi konstitutivní antimikrobiální látky izolované z hmyzu patří lysozym [47]. U *Drosophily* je konstitutivně exprimován drosomycin ve slinných žlázách a samičích spermatékách (orgán samic k přijetí a uchování spermií) a cecropin v samčích ejakulačních trubcích. Konstitutivní exprese jednoho antimikrobiálního peptidu může v některých případech zachovat rezistenci vůči infekci u imunodeficientního mutanta *Drosophily* [93]. U masařky *Sarcophaga peregrina* byly charakterizovány tyto obranné látky: antifungální peptid (AFP), granulocytin, 26/29 kDa proteáza [84,83]. Dipeptid  $\beta$ -alanyl-tyrozin byl izolován z masařky *Sarcophaga (Neobelliera) bullata* [4].

### 1.5.2. Inducibilní antimikrobiální peptidy

Jestliže mikroorganismy proniknou do hemocoelu (tělesná dutina obsahující hemolymfu, fungující jako část oběhového systému hmyzu) dochází k systémové infekci a rychlé syntéze několika typů antimikrobiálních peptidů v tukovém tělísku a hemocytech. Některé peptidy byly detekované v hemolymfě přibližně 2-4 hodiny po začátku infekce [94]. Geny kódující antimikrobiální peptidy lze rozdělit podle kinetiky aktivace do dvou skupin jako „časné“ či „pozdní“ geny [95]. Navíc většina genů kodujících antimikrobiální

peptidy je ztlumena během 12-24 hodin. Okamžitá odpověď na infekci závisí na rozpoznání mikrobiálních molekul (tzv. PAMP, „pathogen associated molecular pattern“) rozpustnými nebo membránovými receptory (tzv. PRR, „pattern recognition receptor“). Například peptidoglykan (PGN) u Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií a  $\beta$ -1,3-glukan hub je rozpoznáván proteinem rozpoznávajícím peptidoglykan („PGRPs“). Třináct různých „PGRPs“ genů bylo objeveno v genomu *Drosophily* [15]. Gram-negativní vazebné proteiny („GNBPs“) mají silnou afinitu k bakteriálnímu lipopolysacharidu (LPS), hlavní součásti buněčné stěny Gram-negativních bakterií a  $\beta$ -1,3-glukanu, který je složkou buněčné stěny hub [16]. Signál je dále přenesen Toll, „immune deficiency“ (Imd) a Jun *N*-terminální kinázovou (JNK) kaskádou. Tyto signalizační kaskády jsou zodpovědné za expresi antimikrobiálních peptidů [95,13] (Obrázek 22).

#### **1.5.2.1. Toll signalizační kaskáda**

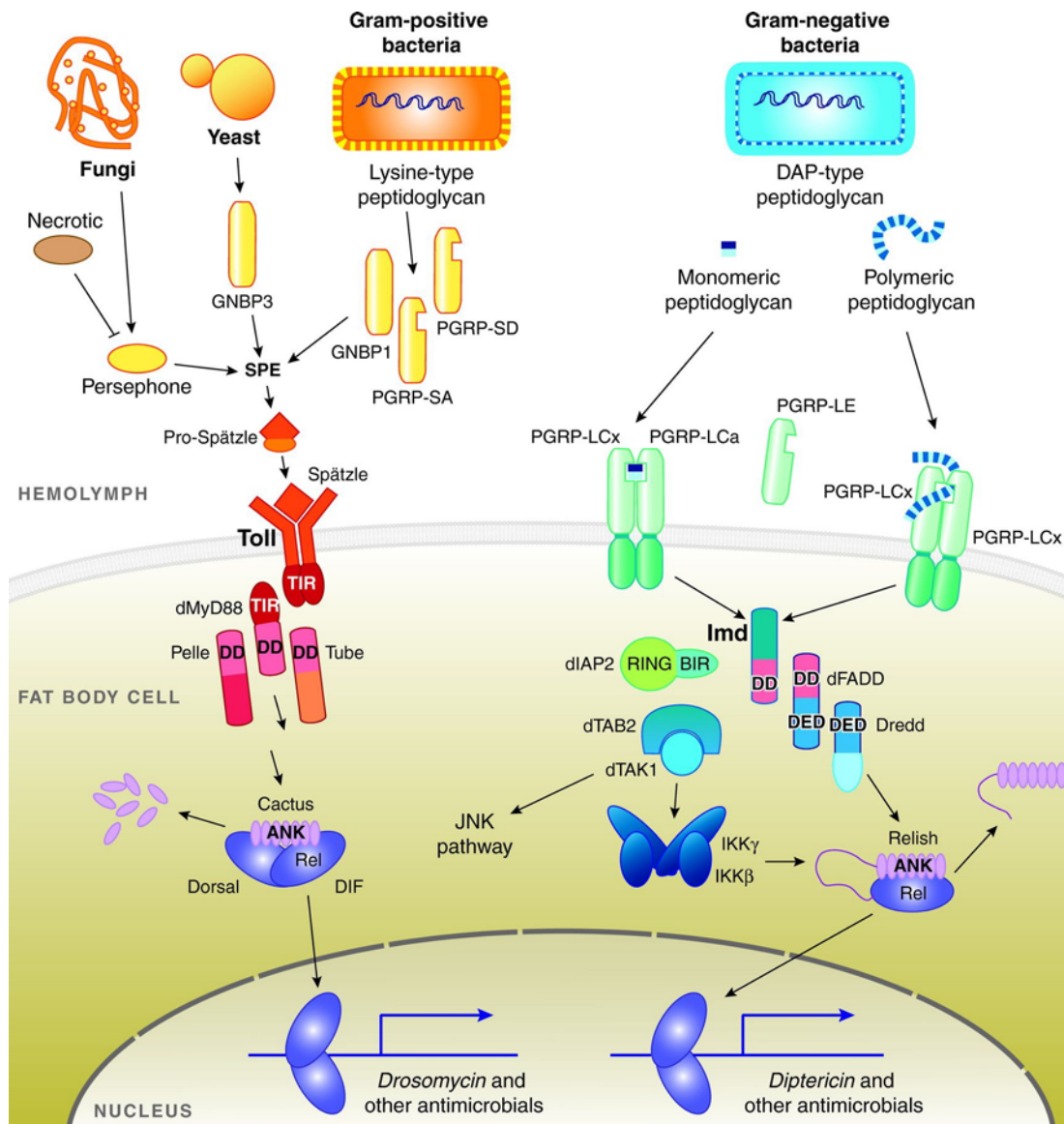
Signalizační cesta Toll („toll“ je v anglickém překladu mýtné) byla paralelně identifikována u savců a u octomilky *Drosophila melanogaster*, dále i u rostlin a ostatních živočichů (homology savčích „Toll-like-receptors“) [96]. Většina komponent této kaskády byla určena a upořádána do signalizační kaskády při studiu dorso-ventrální (hřbetní-břišní) organizace v embryu *Drosophily* [97]. Signalizační kaskáda Toll je aktivována Gram-pozitivními bakteriemi a houbami. Ligand „Spätzle“, který je štěpený serinovými proteázami, se naváže na Toll receptor a aktivuje tak signalizační kaskádu. Výsledkem kaskády je uvolnění NF- $\kappa$ B podobného/Rel-transkripčního faktoru Dif („dorsal related immunity factor“)/Dorsal a jeho translokace do jádra, kde se spustí transkripce genu specifického antimikrobiálního peptidu. Oblast promotoru genů kodujících antimikrobiální peptidy obsahuje sekvenční element podobný savčímu NF- $\kappa$ B. U octomilky tato cesta reguluje geny odpovědné za expresi antimikrobiálních peptidů proti houbám a Gram-pozitivním bakteriím. Hlavními zástupci peptidových skupin jsou defensin účinný proti Gram-pozitivním bakteriím a drosomycin a metchnikowin účinné proti houbám [12,91,72,89,88].

#### **1.5.2.2. Imd signalizační kaskáda**

Odpověď na infekci způsobenou Gram-negativními bakteriemi je kontrolována odlišnou cestou. Imd signalizační kaskáda se podobá savčí kaskádě TNF- $\alpha$  („tumor



necrosis factor- $\alpha$ “) a vrcholí expresí antimikrobiálních peptidů attacinu, cecropinu, drosocinu a dipterocinu, které vykazují značnou účinnost proti Gram-negativním bakteriím. Imd cesta je zahájena aktivací peptidoglykanového rozpoznávacího proteinu, který interaguje s peptidoglykanem obsaženým v bakteriální stěně výše zmíněných bakterií a končí uvolněním Rel-transkripčního faktoru Relish, který je opět translokován do jádra a aktivuje transkripci výše uvedených peptidů [12,72,91,98].



**Obrázek 22.** Model aktivace Toll a Imd signální kaskád převzato z práce Lemaitra a Hoffmanna [13].

## **1.6. Exprese dalších genů odpovědných za imunitní odpověď hmyzu**

Ačkoliv hlavní složkou imunitní obrany hmyzu jsou antimikrobiální peptidy jejichž syntéza je indukovaná infekcí, celkový počet genů odpovědných za imunitní odpověď *Drosophily* je daleko větší („*Drosophila* immune responsive genes“ či DIGRs). Tyto geny zahrnují komponenty dalších imunitních reakcí (melanizace a srážení), rozpoznávací (opsoniny) a signalizační molekuly, stresové faktory, transportéry železa a proteiny neznámých funkcí [89]. Hlavní signalizační kaskády jsou Toll a Imd, ale exprese 25% „DIGRs“ je na nich nezávislá [95]. Další kaskády jako je JNK a Janus kináza (JAK)-STAT ovlivňují expresi „DIGRs“. U JAK-STAT cesty se předpokládá, že ovlivňuje signalizační molekuly imunitního systému (cytokiny), které podporují fagocytózu (opsoniny), proliferaci a diferenciaci hemocytů a také se účastní obrany proti virům [13]. Toll, Imd a JNK signalizační kaskády ovlivňují krvetvorbu (Toll cesta), buněčnou přestavbu a hojení ran (JNK cesta) a apoptózu (Imd cesta) [89].

Nedávné rozsáhlé analýzy na úrovni transkriptomu a proteomu odhalily, že kromě antimikrobiálních peptidů je po indukci zvýšená exprese dalších proteinů a peptidů [99, 87, 17, 100-103]. Dále bylo identifikováno 17 členů DIM rodiny („*Drosophila* immune molecule“) [100]. Hlavní výzvou je pochopit příspěvek těchto imunitních molekul k imunitní obraně, testování jejich specifity proti jednotlivým patogenům a určení jejich potenciální součinnosti [13]. Anotace sekvence genomu dělá z octomilky *Drosophila melanogaster* vynikající model pro studium principů přirozené imunity.

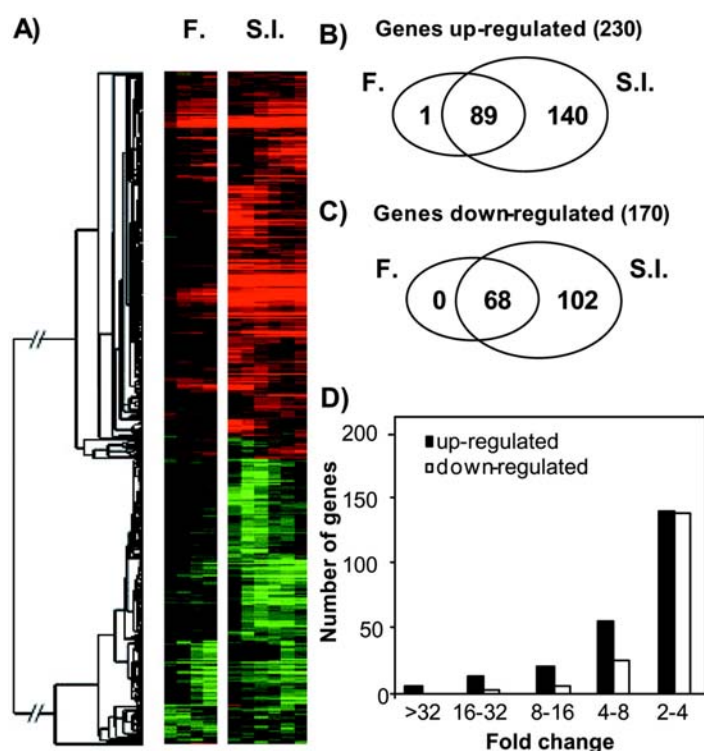
### **1.6.1. Analýza změn transkriptomu *Drosophily***

Se zavedením analýzy genomu pomocí čipových technologií (microarray technology) se významným způsobem posunula citlivost určování genetických změn.

V roce 2001 byly publikovány dvě práce De Gregoria a kol. [87] a Irvinga a kol. [99] popisující rozsáhlou analýzu změn genomu při imunitní odpovědi *Drosophily* pomocí oligonukleotidových čipů.

Práce De Gregoria a kol. [87] popisuje analýzu u dospělých much po indukci bakteriální suspenzí obsahující směs bakterií *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* nebo po fungální infekci přirozeným patogenem *Beauveria bassina*. Autoři sledovali změny 1/2, 3, 6, 12 a 48 hodin po bakteriální infekci a 12, 24, 48 a 96 hodin po fungální infekci. Z 13197 testovaných genů, bylo zjištěno 230 indukovaných a u 170 byla potlačena exprese

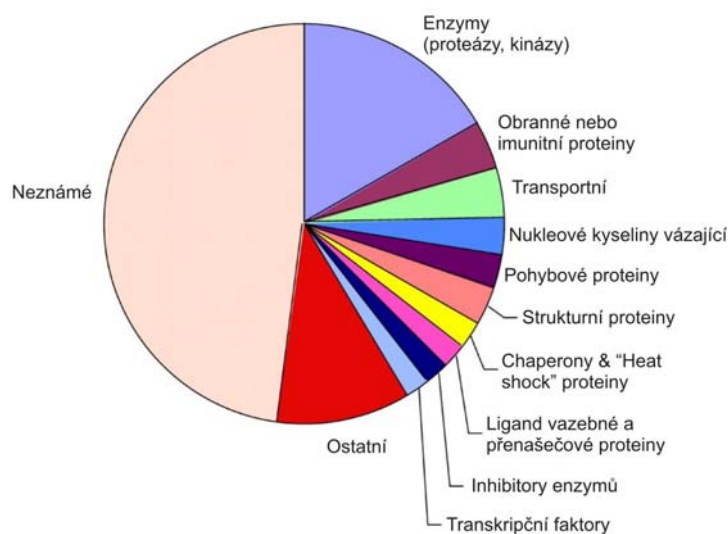
(Obrázek 23). Indukce byla prokázána nejen u antimikrobiálních peptidů, ale také u genů kódujících rozpoznávací proteiny (PRR), proteiny podobné komplementu, některé serpiny (inhibitory serinových proteáz) a některé serinové proteázy, enzymy účastníci se aktivace profenoloxidázy a komponenty signalizačních kaskád Toll a Imd. Dále byly objeveny indukované geny proteinů, u nichž se předpokládala určitá role v imunitní odpovědi. Patří mezi ně například transferin, lysozomální enzymy (kathepsin,  $\beta$ -galaktosidáza) a lipáza. Potlačena byla exprese některých serinových proteáz a serpinů, larválních sérových a kutikulárních proteinů.



**Obrázek 23.** Čipová analýza imunitní odpovědi masařky *Drosophila* publikována De Gregoriem a kol. [87]. **A:** Červeně jsou znázorněny indukované geny („up-regulated“) a zeleně geny jejichž exprese byla potlačena („down-regulated“). (F. znamená fungální a S.I. „septic injury“, tj. bakteriální infekci). **B:** Počet genů indukovaných po imunizaci, **C:** Počet genů jejichž exprese byla indukcí potlačena, **D:** Graf znázorňující kolikrát byla indukcí exprese genů potlačena („down-regulated“) nebo („up-regulated“) indukována.

Práce Irvinga a kol. [99] popisuje analýzu odpovědi u dospělých much po indukcii suspenzí bakterií *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* nebo po fungální infekci přirozeným patogenem *Beauveria bassina*. Autoři sledovali změny 6, 12 a 48 hodin

po bakteriální infekci a 3 dny po fungální infekci. Infekce Gram-pozitivními nebo Gram-negativními bakteriemi dávaly podobné výsledky. Analýza prokázala, že 8459 genů z 13600 genů na čipu je exprimováno stejně u kontrolních much. Bakteriální a fungální infekce indukovala nejméně dvojnásobně expresi 543 genů. Indukovány byly například geny aktinu, proteinu vázajícího kalcium, proteinů buněčné adheze, chaperonů, „heat-shock“ proteinů, inhibitorů enzymů, růstových faktorů, přenašečových proteinů, pohybových proteinů, proteinů vázajících nukleové kyseliny a strukturálních proteinů (Obrázek 24).



**Obrázek 24.** Geny *Drosophily* indukované dvakrát a více během mikrobiální infekce rozdělené podle funkčních skupin, převzato z práce Irvinga a kol. [99].

Čipová analýza imunitně indukovaných hemocytů *Drosophily* byla publikována Johansonem a kol. v roce 2005 [17]. V této práci byla použita buněčná linie mbn-2 podobná hemocytům octomilky *Drosophila melanogaster* a *Drosophila* GeneChip firmy Affymetrix. K indukci imunitní odpovědi byla použita suspenze bakterie *Escherichia coli* nebo čistý lipopolysacharid (LPS). V průběhu infekce byla sledována také morfologie buněk. Výsledky ukázaly, že hemocyty reagují odlišně při infekci živými bakteriemi a při indukci části bakteriální stěny. Z 13197 genů na čipu bylo 4970 detekováno v kontrolních mbn-2 buňkách. Buňky indukované lipopolysacharidem exprimovaly 5188 genů, zatímco při infekci bakteriemi jich bylo 4308. Exprese 387 genů byla indukována a exprese 539 genů tlumena. Na rozdíl od De Gregoria a kol. [87] nebyla detekována indukce genů enzymů aktivujících profenoloxidázu.

### 1.6.2. Analýza změn proteomu *Drosophily* a jiného hmyzu

Ačkoliv analýza celkové genové exprese pomocí DNA čipů je velice účinný technologický nástroj, funkce biologických systémů jsou především pod kontrolou proteinů a to nejen skrze jejich množství a lokalizaci, ale také pomocí postranlačních modifikací (fosforylace, glykosylace a proteolytické štěpení). Pro lepší pochopení mechanismů biologických pochodů je vhodné provést také proteomickou analýzu [104] [105]. Proteomika využívá kombinace 2D-elektroforézy umožňující vizualizovat velké množství rozdělených proteinů a hmotnostní spektrometrie umožňující jejich identifikaci (Obrázek 25).

V roce 2002 byla použita 2D-elektroforéza ke studiu proteinů australského cvrčka *Oedaleus australis* [106]. V roce 2003 byly publikovány první práce zabývající se proteomickou analýzou hemolymfy larev octomilky *Drosophila melanogaster* [102,107]. E. Vierstraetové a kol. [102] používali „IPG stripy“ s rozmezím pH 4-7 a identifikovali 40 proteinů a S. de Moraes Guedes a kol. [107] při použití „IPG stripů“ s rozmezím pH 3-10 identifikovali 105 proteinů. Analýzou proteomu hemolymfy komára *Anopheles gambiae* se podařilo identifikovat 28 proteinů z celkového počtu 280 proteinových spotů na 2D gelu [108].

Proteomickou analýzou systémové imunitní odpovědi *Drosophily* se zabývají skupiny E. Vierstraetové a kol. [101,109,110] a F. Levyové [100,103]. Vierstraetová a kol. indukovali larvy *Drosophily* injekcí lipopolysacharidu (LPS) nebo sterilním poraněním. Pomocí techniky dvou fluorescenčních značek (2D-DIGE) analyzovali proteiny hemolymfy 25 minut a 4 hodin po injekci LPS a 25 minut po sterilní injekci. Identifikovali 10 rozdílných proteinů v hemolymfě *Drosophily* 25 minut po indukci pouze LPS [101]. Další práce této skupiny studovala použitím stejné techniky imunitní odpověď po indukci larev *Drosophily* Gram-pozitivní bakterií *Micrococcus luteus* a kvasinkou *Sacharomyces cerevisiae*. Infekce použitím bakterie *Micrococcus luteus* indukovala 20 rozdílných proteinů a infekce kvasinkou *Sacharomyces cerevisiae* 19 rozdílných proteinů [110].

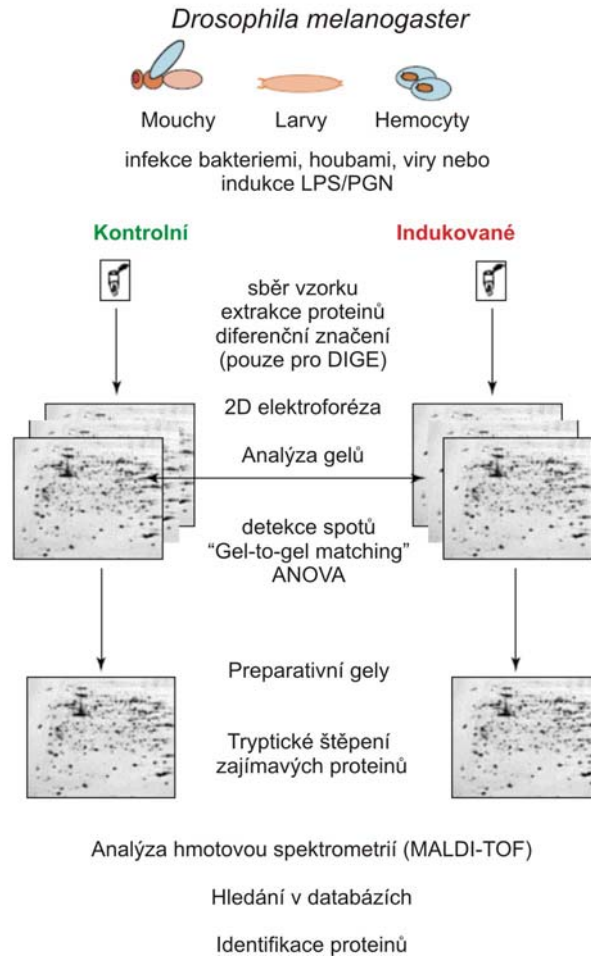
Levyová a kol. indukovali dospělé mouchy *Drosophily* Gram-negativní (*Escherichia coli*) nebo Gram-pozitivní (*Micrococcus luteus*) bakterií, ale také přirozeným houbovým patogenem *Beauvaria bassina*. Autoři analyzovali proteiny hemolymfy 6 hodin po bakteriální a 72 hodin po fungální infekci a u více než 70-ti proteinů detekovali indukci nebo potlačení exprese nejméně pětkrát. Mezi těmito proteiny identifikovali proteázy,

inhibitory proteáz (např. serpiny), rozpoznávací proteiny, enzymy aktivující profenoloxidázu. Byly také identifikovány proteiny s potenciální funkcí v imunitní odpovědi: protein-vazající odorant, peptidylglycin a transferin [103]. Peptidomickou analýzou hemolymfy indukovaných much pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a MALDI-TOF hmotové spektrometrie autoři identifikovali 28 většinou antimikrobiálních peptidů a členů DIM rodiny („*Drosophila immune molecule*“) [100].

Proteomickou analýzou buněčné linie *mbn-2* podobné hemocytům octomilky *Drosophila melanogaster* bylo identifikováno 24 buněčných proteinů jejichž exprese byla indukována nebo potlačena po 30-ti minutách nebo 6-ti hodinách po injekci bakteriálního lipopolysacharidu [111].

Verleyen a kol. identifikovali pomocí 2D-nanoLC MS/MS techniky v hemolymfě octomilky *Drosophila melanogaster* 43 „DIMs“ („*Drosophila immune induced molecules*“) 12 hodin pod indukci larev ve třetím instaru směsí bakterií *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* [112].

U larev bource morušového *Bombyx mori* byla provedena proteomická studie proteinů indukovaných lipopolysacharidem v hemolymfě a tukovém tělesu [113]. Autoři zjistili 24 hodin po indukci jediný signifikantně indukovaný protein v tukovém tělesu a čtyři v hemolymfě. Jediný indukovaný protein v tukovém tělesu a jeden z proteinů v hemolymfě byl určen jako serpin-2. Další dva indukované proteiny v hemolymfě nebyly identifikovány a čtvrtý polypeptid byl určen jako attacin [113].



**Obrázek 25.** Schéma diferenční proteomické analýzy imunitní odpovědi *Drosophila*.  
Obrázek převzat z publikace Engstroma a kolektivu [114].

## 2. Cíle práce

1. Identifikace a charakterizace antimikrobiálně aktivních látek v hemolymfě larev masařky *Sarcophaga bullata*.
2. Analýza změn exprese vybraných genů masařky *Sarcophaga bullata* za použití real-time qPCR po indukci imunitní odpovědi v celém těle larev, hemocytech a tukových tělesech.
3. Proteomická analýza imunitní odpovědi hemocytů a buněk tukového tělesa larev masařky *Sarcophaga bullata* metodou 2D-elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.



### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Použitý materiál

Luria-Bertani (LB) medium	Oxoid, UK
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich, USA
Trifluoroctová kyselina	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Fluka, Švýcarsko
N,N'-metylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsulfát sodný	Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný	Fluka, Švýcarsko
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard pro elektroforézu	Bio-Rad, USA
Nízkomolekulární proteinový standard	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Blue G-250	Fluka, Švýcarsko
Coomassie Blue R-250	Fluka, Švýcarsko
CAPS	Sigma-Aldrich, USA
CHAPS	Sigma-Aldrich, USA
IPG stripy	Amersham Biosciences, Švédsko
Jodacetamid	Bio-Rad, USA
Fmoc-aminokyseliny	Novabiochem, Švýcarsko
Rink Amide AM pryskyřice	Novabiochem, Švýcarsko
2-chlorotrietylóvá pryskyřice	Novabiochem, Švýcarsko
DNA-free kit	Ambion, USA
RNasin	Promega, USA
MMLV reverzní transkriptáza	Promega, USA
TriReagent	Molecular Research Center, USA
Taq-polymeráza	Promega, USA
SYBRGreen	Molecular Probes, USA

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA.

### **3.2. Chov larev masařky *Sarcophaga bullata***

Použitým organismem byly larvy masařky *Sarcophaga bullata* (Parker 1916) ve třetím instaru. Zdrojem larev pro jednotlivé pokusy byl zavedený chov na Ústavu organické chemie a biochemie pod vedením paní Jarmily Titzenthalerové. Larvy (200-300 kusů) rostly na hovězích játrech uchovaných ve specialních aluminiových krabičkách [115]. Pro indukci a izolaci antimikrobiálních látek byly použity larvy, které ukončily období žíru a vstoupily do období toulavého chování.

### **3.3. Příprava zásobního inokula**

Pro indukci i měření antimikrobiální aktivity bylo použito zásobní bakteriální inokulum. K tomuto účelu byly použity kmeny bakterií v exponenciální fázi růstu (*Escherichia coli* DBM 3001, *Staphylococcus aureus* DBM 3002 a *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3081) kultivované v Luria-Bertani (LB) tekutém médiu při 37°C (pro bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*) nebo 28°C (pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa*) s třepáním 5-8 hodin. Získané suspenze byly přeneseny do mikrozkušavek spolu se sterilním glycerolem v poměru 1:1 a zamraženy na teplotu -80°C.

### **3.4. Příprava kultur pro indukci**

Zásobní inokulum bylo rozmraženo při laboratorní teplotě. Zkušavka o objemu 50 ml byla naplněna asi 20 ml LB tekutého média a bylo přidáno inokulum. Kultivace probíhala při odpovídající teplotě (37°C nebo 28°C, 150 otáček/min) přibližně 5-8 hodin. Následovala centrifugace ve vychlazené centrifuze při 4°C, 3000 x g 10 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla rozpustěna ve fyziologickém roztoku tak, aby výsledná absorbance při vlnové délce 550 nm byla 1,5-1,8.

### **3.5. Indukce larev masařky *Sarcophaga bullata***

Samotná indukce spočívala v injektování 1 µl bakteriální suspence skleněnou kapilárou nebo v bodnutí sterilním entomologickým špendlíkem do zadečku larvy. Injektovaným bakteriálním kmenem byly kmeny *Escherichia coli* DBM 3001, *Staphylococcus aureus* DBM 3002 či *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3081. Larvy byly

před injekcí znehybněny ponecháním 5-10 minut na ledu. Po injekci byly ponechány na ledu dalších 10 minut, aby se zamezilo nadměrnému krvácení z rány. Po 1/2, 3, 6, 12 nebo 22 hodinách byla z takto indukovaných larev izolována hemolymfa a hemocyty či tuková tělesa nebo byly použity pro pokus celé larvy.

### **3.6. Izolace z larev masařky *Sarcophaga bullata***

Celkový postup izolace látek je pro lepší orientaci v textu znázorněn na Obrázku 28 ve výsledkové části (strana 58).

#### **3.6.1. Izolace hemolymfy z larev**

Před sběrem hemolymfy byly larvy znehybněny ponecháním na ledu 5 – 10 minut. Entomologickým špendlíkem byla propíchnuta hlavička a jemným stlačením těla larvy byla vymáčknuta hemolymfa do vychlazené mikrozkušavky. Počet larev zpracovaných v jednom dni se pohyboval v rozmezí 50 – 300.

#### **3.6.2. Izolace hemocytů z larev**

Hemolymfa byla izolována na ledu z indukovaných a kontrolních larev 1/2, 3, 6 a 22 hodin po indukci. Hemocyty byly odděleny od hemolymfy centrifugací (10 minut při 1000 x g a 4°C). Hemocyty byly dvakrát opláchnuty pufrům (50 mM Hepes pH 7,4 s 90 mM NaCl) a poté hluboce zmrazeny.

#### **3.6.3. Izolace tukového tělesa z larev**

Tuková tělesa byla izolovaná z indukovaných a kontrolních larev 1/2, 6 a 22 hodin po indukci. Larvy byly uspány použitím plynného CO<sub>2</sub>. Přední a zadní části larvy byly odstříhány nůžkami. Tuková tělesa byla vyjmuta z larev pod binokulárním mikroskopem a přendána do fyziologického roztoku na Petriho misce umístěné na ledu. Malphigické trubice a trachee byly opatrně odstraněny pinzetou. Izolace tukových tělísek prováděl Mgr. Jiří Kindl (ÚOCHB AV ČR v.v.i.).

#### **3.6.4. Homogenizace celých larev**

Celá těla indukovaných a kontrolních larev byla zpracována 3, 6, 12 a 22 hodin po indukci. Nejméně dvě larvy byly použity pro každý typ indukce a čas. Larvy byly

hluboce zmrazeny tekutým dusíkem a poté homogenizovány na prášek tloučkem v předchlazené třecí misce.

### **3.7. Separace hemolymfy centrifugací a srážením**

V prvním kroku byla izolovaná hemolymfa odstředována 10 minut při 1000 x g a 4°C kvůli odstranění zbytků tkáně a buněk (Peleta 1, Obrázek 28, stránka 58). Supernatant 1 byl přenesen do čisté zkumavky. Ve druhém kroku probíhalo srážení proteinů ze supernatantu 1 buď roztokem síranu amonného (nasycení do 70 %) nebo okyseleným methanolem (90% methanolu, 9% vody, 1% kyseliny octové) ve čtyřnásobném přebytku. Po dalším odstředění (30 minut při 13 000 x g, 4°C) byl supernatant 2 přenesen do čisté zkumavky, zatímco peleta 2 byla uskladněna při -70°C.

### **3.8. Frakcionace hemolymfy na kolonkách Chromabond C-18**

Na kolonce Chromabond C-18 (Macherey-Nagel, Německo) byl supernatant 2 rozdělen na hydrofilní a hydrofobní frakci. Kolonka byla aktivována promytím roztokem 80% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyseliny v deionizované vodě a následně 0,1% trifluoroctové kyseliny v deionizované vodě. Objem promývacích roztoků byl 3 x 2ml každého roztoku. Dále se postup lišil podle toho, zda byl ke srážení použit síran amonný (A) nebo okyselený methanol (B).

**A.** Po srážení síranem amonným byl supernatant 2 zředěn deionizovanou vodou a ihned nanesen na aktivovanou kolonku Chromabond C18. Poté se kolonka promývala 3 x 2 ml 0,1% TFA (hydrofilní frakce). Tím byl odstraněn síran amonný (odsolení) a ostatní hydrofilní součásti hemolymfy, které se nezachytily na kolonce. Při následném promývání kolonky 3 x 2 ml 80% acetonitrilu s 0,1% TFA (hydrofobní frakce) se uvolnily zachycené peptidy a menší proteiny. Hydrofilní a hydrofobní frakce byly odpařeny na přístroji CentriVap Concentrator (Labconco, USA).

**B.** Po srážení kyselým methanolem byl nejprve supernatant 2 vysušen na přístroji CentriVap Concentrator. Sušina byla rozpuštěna v 0,1% TFA a byla nanesená na aktivovanou kolonku Chromabond C18. Stejně jako v předchozím případě se kolonka promývala 3 x 2 ml 0,1% TFA. Tím se z kolonky uvolnily hydrofilní frakce hemolymfy. Hydrofobní frakce byla uvolněna promýváním 3 x 2 ml 80% acetonitrilu s 0,1% TFA. Opět byl k odpaření rozpouštědel použit přístroj CentriVap Concentrator (Labconco, USA).

### 3.9. Chromatografické metody

#### 3.9.1. Analytické RP-HPLC

Analytické RP-HPLC bylo použito k porovnání složení hydrofobních a hydrofilních frakcí získaných z indukovaných a neindukovaných larev. Použity byly kolony Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, průměr částic 5  $\mu\text{m}$ , Watrex, ČR) pro frakce srážené síranem amonným a Vydac 218TP54 (250 x 4 mm, průměr částic 5  $\mu\text{m}$ , Vydac, USA) pro hydrofobní a hydrofilní frakce po srážení okyseleným methanolem. Na kolonu bylo nanášeno 40  $\mu\text{g}$  frakce (20  $\mu\text{l}$  z 2 mg/ml). Chromatogramy byly analyzovány softwarem CSW® (DataApex, s.r.o, ČR). Průběh gradientu acetonitrilu ve vodě s 0,1% TFA je uveden v tabulce 6. Byl použit průtok 1 ml/min.

**Tabulka 6.** Složení elučního roztoku při analytické RP-HPLC

Čas (min)	0	1	50	60	68	68	70
Acetonitril (%)	0,8	0,8	36	50	80	80	0,8

#### 3.9.2. Preparativní RP–HPLC: izolace peptidů, menších proteinů popř. frakcí

Frakce získané promýváním kolonky Chromabond C-18 80% acetonitrilu s 0,1% TFA nebo pouze s 0,1% TFA byly děleny pomocí RP-HPLC na semipreparativní koloně Vydac C18 (250 x 10 mm, průměr částic 10  $\mu\text{m}$ ) při průtoku 3 ml/min nebo analytické koloně Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, průměr částic 5  $\mu\text{m}$ ) podle množství získaného materiálu. Gradientová eluce byla prováděna roztokem o stoupající koncentraci acetonitrilu v deionizované vodě obsahující 0,1% TFA. Složení elučního roztoku bylo stejné jako při analytické RP-HPLC (viz Tabulka 6). Absorbance eluátu byla proměřována při vlnové délce 218 nm. Izolované peptidy, menší proteiny a frakce byly částečně odpařovány a lyofilizovány.

### **3.10. Testování antibakteriální aktivity**

Měření antibakteriální aktivity je založeno na měření růstové křivky jednotlivých mikroorganismů za přítomnosti izolované frakce v porovnání s růstovou křivkou samotného mikroorganismu. Růstová křivka byla vynesena do grafu jako závislost absorbance v rozsahu vlnových délek 420-580 nm na čase. Testování bylo prováděno pomocí přístroje Bioscreen C (Growth Curves Ltd., Finsko).

Práce spojená s testováním antimikrobiální aktivity byla prováděna na VŠCHT studentkou Terezou Neubauerovou pod vedením Prof. Martiny Mackové.

#### **3.10.1. Příprava inokula pro testování antibakteriální aktivity**

Před každým testováním bylo připraveno nové inokulum následujícím způsobem. Jedna mikrozkušavka byla vyjmuta z mrazícího boxu, obsah byl rozpuštěn a smíchán ve zkumavce s 20 ml LB média. Následná kultivace při 37°C trvala 5-8 hodin. Po této době byla nová kultura v exponenciální fázi růstu a mohla být použita pro testování.

#### **3.10.2. Příprava vzorků z izolovaných frakcí pro testování**

Vzorky peptidů byly rozpustěny v LB médiu. Vzhledem ke známé hmotnosti jednotlivých frakcí byla pro zásobní roztok peptidu zvolena taková koncentrace, aby bylo možno napipetovat do reakčních jamek cílené koncentrace. Vzhledem k tomu, že se jednalo o neznámé a předem netestované látky získané z hemolymfy pouze v omezeném množství, byly koncentrace pro testování voleny hlavně podle dostupného množství materiálu. U identifikovaného dipeptidu byly testovací koncentrace zvoleny podle minimálních inhibičních koncentrací známých z literatury [4].

#### **3.10.3. Měření antibakteriální aktivity pomocí přístroje Bioscreen C**

Měření antimikrobiální aktivity je možno zjistit několika způsoby avšak pro naše potřeby byla zvolena metoda pomocí přístroje Bioscreen C. Hlavními přednostmi jsou malé testovací objemy a možnost kontinuálního sledování nárůstu absorbance reakčních roztoků. Najednou lze uskutečnit až 200 měření.

Principem je vyhodnocování a porovnávání bakteriálního růstu v přítomnosti testovaného peptidu či bez jeho přítomnosti. Pokusy bez testovaného peptidu zde slouží

jako kontroly. Pokud testovaný peptid má antimikrobiální účinky, dochází v jamkách, kde je přítomen, k signifikantně nižšímu nárůstu než je tomu u kontroly. Inhibice růstu je přímo úměrná koncentraci testovaného peptidu. Minimální inhibiční koncentrace („minimum inhibitory concentration” MIC) je definována jako nejnižší konečná koncentrace látky, při níž nebyl pozorován růst v exponenční fázi bakteriálního růstu.

Testované vzorky se zde pipetují do jamek polystyrenové mikrotitrační destičky. Jedna destička obsahuje 100 jamek a přístroj umožňuje měřit na dvou destičkách najednou. Objem měřeného roztoku v jedné jamce je 330  $\mu$ l. Postupem, který se osvědčil je pipetování LB média a vzorku peptidu rozpuštěného v LB médiu tak, aby součet objemů byl roven 300  $\mu$ l. Změnou poměru mezi objemem LB média a vzorku měníme koncentrace testovaného peptidu. Zbývajících 30  $\mu$ l tvoří inokulum bakteriálních buněk. Vzhledem k malým množstvím izolovaných frakcí jsme testovali i s polovičními objemy 150 a 15  $\mu$ l.

Po napipetování všech vzorků, LB média a inokula se destička vloží do přístroje. Ten je propojen s počítačem, kde se nastaví parametry měření. Mimo vlnové délky, kultivační teploty a počtu měřených jamek je zde možné zadat i dobu experimentu a intervaly jednotlivých odečtů, včetně míchání. Přístroj proměřuje zeslabení procházejícího záření turbidimetricky v rozsahu vlnových délek 420 – 580 nm.

### **3.11. Elektroforetické metody**

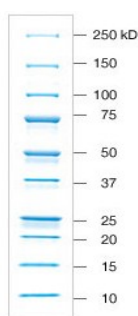
#### **3.11.1. 1D-SDS-PAGE**

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla prováděna ve vertikálním systému Mini-Protean 3 (Bio-Rad) podle Laemmliho [116]. Tloušťka gelu byla 1 mm a rozměry skel 8 x 8 cm. Rozhraní zaostřovacího a dělicího akrylamidového gelu (29% akrylamid a 1% N,N'-metylenbisakrylamid) dosahovalo asi 2 cm pod okraj gelu. Používány byly 12% a 20% dělicí gely.

Z roztoku vzorku o koncentraci 1 mg/ml bylo odebráno 8  $\mu$ l a smícháno s 8  $\mu$ l vzorkového pufru (4% SDS, 10%  $\beta$ -merkaptoethanol, 20% glycerol, 0,1% Brilliant Blue G-250, 0,124 M Tris-HCl pH 6,8). Následně byla prováděna denaturace při 100°C po dobu 5 minut. Do jednotlivých komůrek byly nanášeny roztoky vzorků, standardy a do prázdných komůrek vzorkový pufr. Elektroforéza probíhala ve dvou krocích. Nejprve

po dobu 30 minut při napětí 80 V, dalších 50-60 minut při napětí 120 V v elektrodo­vém pufru (0,1% SDS, 0,025 M glycin, 0,192 M Tris).

Po skončení elektroforézy byly gely fixovány po dobu 10 minut fixačním roztokem (10% kyseliny octové a 40% methanolu v deionizované vodě). Po promytí deionizovanou vodou byly gely barveny asi 15 minut roztokem Coomassie Blue R-250 (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanolu, 10% kyseliny octové v deionizované vodě), opět promyty a vloženy do odbarvovacího roztoku (10% methanolu, 10% kyselina octová v deionizované vodě). Pro kalibraci byly použity proteinové standardy (Bio-Rad- Precision Plus Protein unstained standards, Obrázek 26).



**Obrázek 26.** Na obrázku jsou vyobrazeny použité standardy pro elektroforézu ve 12% polyakrylamidovém gelu o molekulových hmotnostech 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa.

### 3.11.2. Elektroforéza v Tris-tricinovém pufru

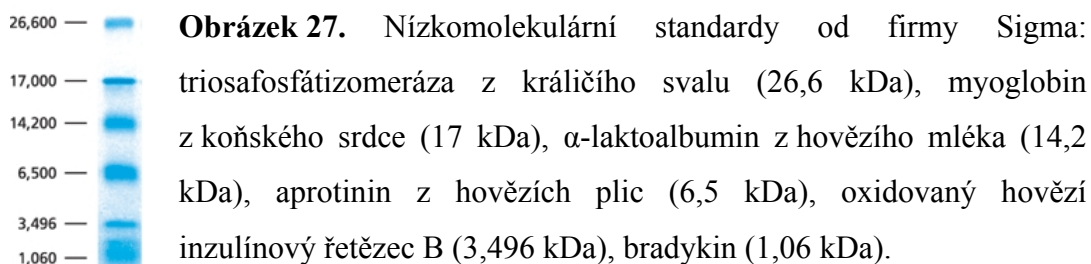
Tento druh elektroforézy je vhodný pro separaci proteinů menších než 10 kDa a metoda byla popsána Schägerem a Jagowem [117]. Pomocí tricinu, který je obsažen v elektrodo­vém pufru, se dají separovat peptidy od velikosti 2 kDa. Rozhraní zaostřovacího a prostředního gelu (29% akrylamid a 1% N,N'-methylenbisakrylamid) dosahovalo asi 2 cm pod okraj gelu. Separační gel byl 15%.

Z roztoku vzorku o koncentraci 1 mg/ml bylo odebráno 8  $\mu$ l a smícháno s 8  $\mu$ l vzorkového pufru (1% SDS, 4%  $\beta$ -merkapt ethanol, 24% glycerol, 0,02% Brilliant Blue G, 0,1 M Tris-HCl pH 6,8). Následně byla prováděna denaturace při 100°C 5 minut.

Anodový pufr (0,2 M Tris-HCl pH 8,9) a katodový pufr (1% SDS, 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin) mají odlišné složení. Elektroforéza (s použitím přístroje Mini Protean 3) probíhala ve dvou krocích. Nejprve 30-45 minut při napětí 30 V a další 2,5-3 hodiny při 120-140 V.

Gely byly fixovány 10 minut fixačním roztokem. Po promytí deionizovanou vodou byly gely barveny roztokem Coomassie Blue R-250 asi 15 minut, opět promyty a vloženy do odbarvovacího roztoku.





### 3.11.3. Přenos proteinů a peptidů na membránu PVDF

Pro přenos proteinů byla použita membrána PVDF-Immobilon<sup>TM</sup>-P (Sigma), která byla upravena následujícím způsobem: 15 sekund máčena ve 100% methanolu, 2 minuty v deionizované vodě a 5 minut v pufru o složení 20 mM CAPS, 10% methanol, 0,01% SDS, hodnota pH byla upravena pomocí NaOH na 10,3. V témž pufru byly máčeny i filtrační papíry Extra Thick Blot Paper Criterion<sup>TM</sup> size (Bio-Rad) po dobu 5 minut a gel z elektroforézy po dobu 15 minut. Do modulu Trans-Blot<sup>®</sup> SD (Bio-Rad) typu semi-dry byl položen filtrační papír, poté PVDF membrána, gel a nakonec opět filtrační papír. Vše bylo uzavřeno katodou. Samotný přenos probíhal při 4°C po dobu 2 hodin, při napětí 20 V a proudu 145 mA (3 mA na 1 cm<sup>2</sup>).

Membrána byla barvena 30 minut v Coomassie Blue R-250 a odbarvována v odbarvovacím roztoku (50 % methanol, 7 % kyselina octová v deionizované vodě).

Proteiny imobilizované na PVDF membráně byly podrobeny *N*-koncové sekvenaci metodou Edmanova odbourávání na zařízení PE Applied Biosystems 491 Protein Sequencer (Perkin-Elmer) s programem PL PVDF Protein Ing. Zdeňkem Voburkou (ÚOCHB AVČR v.v.i).

### 3.11.4. 2D-elektroforéza

#### 3.11.4.1. Příprava vzorku na 2D-elektroforézu

Hemocyty z 20-ti larev byly dvakrát opláchnuty puftrem (50 mM Hepes pH 7,4 s 90 mM NaCl) a poté byly buňky po 1 hodinu lyzovány při laboratorní teplotě sklízecím lyzačním puftrem 1 (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTT, 2% amfoliny pH 9-10) [118]. Množství proteinů v lyzátu bylo určeno metodou dle Bradfordové [119]. Pro analytické gely bylo použito 70  $\mu$ g proteinů a pro preparativní gely 400  $\mu$ g.

Buňky tukového tělesa z pěti larev byly homogenizovány, sonikovány a lyzovány 30 minut při 4°C ve sklízecím lyzačním pufru 2 (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTT, 2% amfolinů pH 9-10) [120]. Poté byl lyzát třikrát centrifugován 30 minut při 16000 x g a 4°C a supernatant byl opatrně odebírán. Množství proteinů bylo určeno metodou dle Bradfordové [119]. Pro analytické gely bylo použito 55 µg proteinů a pro preparativní gely 315 µg.

#### **3.11.4.2. Izoelektrická fokusace**

Buněčné lyzáty o příslušném množství proteinů byly smíchány s 330 µl rehydratačního pufru (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,8% amfolinů pH 3-10), a naneseny na 18 cm nelineární „IPG stripy“ pH 3-10 (Amersham Biosciences, Švédsko) a převrstveny minerálním olejem. Poté probíhala 12 hodin aktivní rehydratace při napětí 50 V.

Izoelektrická fokusace rehydratovaných stripů probíhala s postupně zvyšujícím se napětím na přístroji PROTEAN IEF cell (BioRad, USA) po 1 hodinu při napětí 250 V, dále 1 hodinu při napětí 500 V, 2 hodiny při 1000 V a nakonec při 10000 V po dobu nutnou k dosažení 70000 Vh.

#### **3.11.4.3. Elektroforéza v gradientovém gelu**

Fokusované stripy byly ekvilibrovány 30 minut v roztoku, který obsahoval 7 M močovinu, 20% glycerol, 2% SDS, 0,05 M Tris-HCl pH 8,8 a 2% DTT s bromfenolovou modří. Volné thiolové skupiny byly 30 minut alkylovány v tomtéž roztoku, který místo DTT obsahoval 2,5 % jodacetamid.

Poté byly ekvilibrované stripy připevněny na gradientový SDS-polyakrylamidový gel (8-16% se 4% zaostřovacím gelem, 19 x 22 cm) pomocí „ReadyPrep Overlay“ agarózy (BioRad, USA). Druhý rozměr SDS-PAGE probíhal v PROTEAN II XL systému (BioRad, USA) v elektrodovém pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin s 0,1% SDS) po 1 hodinu při proudu 16 mA na gel a přibližně po 9 hodin při 24 mA na gel dokud bromfenolová modř nedosáhla spodní strany gelu. Poté byly gely vyjmuty a barveny buď stříbrem postupem podle Bluma modifikovaným Rabilloudem [121] nebo koloidní Coomasie Brilliant Blue [122].

#### 3.11.4.4. Analýza 2D gelů

Gely byly převedeny do digitální podoby kalibrovaným denzitometrem (Bio-Rad, USA) v rozlišení 400 dpi. Obrázky byly zpracovávány programem PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad). Pro vytvoření analytického souboru byly použity vždy čtyři gely z každého typu experimentu (například tuková tělíska z *E.coli* indukovaných versus neindukovaných larev v časovém intervalu 6 hodin). Obrázky byly v programu upraveny na stejnou velikost. Ve vytvořeném analytickém souboru („match-set“) byly programem detekovány proteinové skvrny (spoty) a vzájemně přiřazeny ve skupinách gelů. Kvantifikace spotů byla normalizována na intenzitu všech detekovaných spotů v daném gelu. Přiřazení proteinových skvrn bylo manuálně kontrolováno a v případě nutnosti upraveno. Pro detekci velkých spotů s nepravidelným tvarem byla využita funkce umožňující vybrat obrys skvrny a kvantifikovat ji jako celek. Rozdílně exprimované proteiny byly vyhledávány na základě minimálně dvojnásobného rozdílu mezi intenzitami skvrn v porovnávaných analyzovaných souborech gelů s 95% pravděpodobností ( $p \leq 0,05$ ) vypočítanou Studentovým t-testem. Proteiny špatně přiřazené, nepřesně ohraničené nebo nacházející se v okrajových částech gelů byly pokládány za nevěrohodné.

#### 3.11.5. Kapilární elektroforéza (CZE)

Analýzy byly provedeny za použití P/ACE MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) kapilárním elektroforetickém analyzátoru. Separační prostor byl tvořen křemennou nemodifikovanou kapilárou (Polymicro Technologies, Tucson, AZ, USA) s vnějším polyimidovým povlakem o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry byla 392 mm a efektivní délka (od vstupního konce k detektoru) 290 mm.

$\beta$ -Alanyl-tyrozin (syntetický i izolovaný) byl analyzován jako kationt v kyselém základním elektrolytu („background elektrolyte“ – 0,5 M kyselina octová, pH 2,5). Separace probíhala v režimu konstantního napětí 20 kV a proudu hodnoty 11,6  $\mu\text{A}$ , kapilára byla chlazena na teplotu 25°C. Vzorokly byly dávkovány hydrodynamicky přetlakem 15 mbar po dobu 5-15 sekund. Detekce byla provedena měřením absorpce UV záření při 206 nm.

Chirální separace izolovaného  $\beta$ -alanyl-tyrozinu a syntetických standardů  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu a  $\beta$ -alanyl-D-tyrozinu byly provedeny na stejném přístroji s odlišnými základními elektrolyty různého složení a také s různými chirálními děliči na

cyklodextrinovém základu. Nejlepší separace  $\beta$ -alanyl-L,D-tyrozinových enantiomerů bylo dosaženo v základním elektrolytu složeném z 32 mM Tris, 50 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 2,5 s 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinem (20 mg/ml). Separační napětí bylo 25 kV, proud byl 39,5  $\mu\text{A}$ , hydrodynamická injekce vzorků byla provedena při tlaku 6,9 mbar po dobu 5 sekund.

### **3.11.6. Preparativní volná elektroforéza (FFE)**

Preparativní elektroforetická separace byla provedena na „homemade“ volné elektroforetické aparatuře vybavené průtokem skrze elektroforetickou celu zhotovenou z dvou skleněných tabulek (500 x 500 x 4 mm) se štěrbinou (0,5 mm). Cella byla temperována na obou stranách rychle proudícím chladným vzduchem ( $-1^\circ\text{C}$ ). Separace byla provedena v 0,5 M kyselině octové při průtoku 250 ml/h, při separačním napětí 3 kV a proudu 125 mA. Průtok vzorku byl 1,6 ml/h a základní elektrolyt a vzorek byly v cele po dobu 31 minut. Absorpce jímaných frakcí byla proměřována při 220 a 280 nm. Koncentrace vzorku byla 30 mg/ml [123].

Kapilární elektroforéza a preparativní elektroforézy byly prováděny skupinou RNDr. Václava Kašičky, CSc. (ÚOCHB AV ČR v.v.i.).

## **3.12. Syntéza $\beta$ -alanyl-tyrozinu a jeho analogů**

### **3.12.1. Syntéza $\beta$ -alanyltyrozinu a jeho analogů na pevné fázi**

Syntetické analogy  $\beta$ -alanyl-tyrozinu byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi použitím Fmoc/tBu strategie a 2-chlorotrytyl nebo RinkAmide AM pryskyřice jako polymerního nosiče. Ke kondenzaci byly použita činidla HBTU/DIPEA v NMP. *N*-Acetylace byla provedena směsí 5% acetanhydridu a 1% DIPEA v NMP. Všechny dipeptidy,  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin,  $\beta$ -alanyl-D-tyrozin,  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin- $\text{NH}_2$ , *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrozin- $\text{NH}_2$ , *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrozin byly čištěny pomocí RP-HPLC. Čistota dipeptidů byla více než 96% což bylo určeno analytickou RP-HPLC. Všechny dipeptidy byly charakterizovány hmotovou spektrometrií. Před testováním byla koncentrace  $\beta$ -alanyl-tyrozinu a jeho analogů určena podle absorpce tyrozinu při 276 nm a použitím molárního extinkčního koeficientu  $1420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.12.2. Syntéza $\beta$ -alanyl-L-tyrozylu- $\beta$ -D-fruktopyranózy

$\beta$ -Alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranóza byla syntetizována podle Mossineho a kol. [124].  $\beta$ -Alanyl-L-tyrozin (20 mg, 7,9  $\mu$ mol) a D(+)-glukóza (6 mg, 33  $\mu$ mol) byly přidány k 10 ml kyseliny octové v pyridinu (1:1) a míchány při pokojové teplotě 48 hodin. Reakční směs byla odpařena a produkt byl izolován pomocí RP-HPLC. Identita produktu byla ověřena hmotnostní spektrometrií,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR.

### 3.13. Hmotnostní spektrometrie

Molekulové hmotnosti a identifikace izolovaných frakcí, a proteinů byly měřeny na hmotnostních spektrometrech MALDI-TOF, Reflex IV (Brüker Daltonics) a ESI-Q-TOF (Waters) na Ústavu organické chemie a biochemie Mgr. Miloslavem Šandou a RNDr. Josefem Cvačkou, PhD.

#### 3.13.1. ESI-MS

Hmotnostní spektra izolovaných frakcí a syntetických analogů byla měřena použitím Q-TOF hmotového spektrometru (Waters-MicroMass). Vzorky byly rozpuštěny v 50% acetonitrilu ve vodě s 0,2% kyselinou mravenčí a injektovány do mobilní fáze o stejném složení s průtokem 20  $\mu$ l/min. Elektrosprej jako zdroj iontů byl použit v pozitivním iontovém módu s kapilárním a kuželovým napětím 3500 V a 20 V. Dusík byl použit jako plyn v kuželu (50 l/h) a jako desolvatační plyn (150 l/h). Teplota zdroje byla 80°C a desolvatační teplota byla 150°C. Kolizní energie byla nastavena na napětí 10 V při MS měřeních a hodnota byla zvýšena nejčastěji na 15-25 V, při MS/MS pokusech.

#### 3.13.2. MALDI-MS

Hmotnostní spektra jednotlivých frakcí byla měřena na MALDI-TOF („matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight“) hmotnostním spektrometru REFLEX IV (Brüker-Daltonic) vybaveném  $\text{N}_2$  laserem (337 nm). Hmotnostní spektra byla získána v lineárním módu s urychlovacím napětím 20 kV. Jako matrice byla použita kyselina sinapová.

### 3.13.3. Identifikace peptidů a proteinů z proteolytických štěpení

Vybrané proteinové nebo peptidové proužky a skrvny (spoty) z 1D nebo 2D-SDS PAGE byly vyříznuty, odbarveny 50% acetonitrem v 25 mM hydrogenuhličitanu ammonném o pH 7,8 nebo v 50 mM 4-ethylmorfolin-acetátovém pufru o pH 8,1 s 40 mM DTT, dehydratovány 5 minut v 200  $\mu$ l acetonitrilu při 30°C v „thermo shaker“ přístroji (Eppendorf) a poté vakuově vysušeny ve Speed-vacu (Labconco). Kousky gelu byly rehydratovány ve štěpícím pufru 1 nebo 2 a proteiny/peptidy byly štěpeny 8 hodin při 37°C v „thermo shaker“ přístroji.

Štěpící pufr 1 obsahoval 30 ng/ $\mu$ l štěpícího enzymu v 50 mM 4-ethylmorfolin-acetátovém pufru o pH 8,1, 4% acetonitrilu a 0,01%  $\beta$ -merkaptoethanolu. Štěpící pufr 2 obsahoval 30 ng/ $\mu$ l štěpícího enzymu v 25 mM hydrogenuhličitanu ammonném o pH 7,8, 4% acetonitrilu a 0,01%  $\beta$ -merkaptoethanol. Pro štěpení peptidů a proteinů byly použity enzymy trypsin (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega) nebo chymotrypsin (A-chymotrypsin sequencing grade, Sigma). Po štěpení byly peptidy extrahovány z kousků gelu postupnou extrakcí gradientem 15-60% acetonitrilu s 2% TFA. Extrakce probíhala v sonikátoru s ledem.

Extrahované peptidy byly odsoleny a koncentrovány Zip-Tip C18 špičkami (Millipore). Pro charakterizaci štěpů byly použity hmotové spektrometry MALDI-TOF a ESI-Q-TOF. MALDI-TOF spektrometr REFLEX IV (Brüker-Daltonics) operoval v „reflekton módu“ s urychlovacím napětím 20 kV. Vzorky byly připraveny za použití  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice. Hmotový spektrometr ESI-Q-TOF (Waters) byl vybaven nanoelektrosprejem a připojen na 2D kapilární chromatografii „CapLC“ (Waters). Chromatografické separace bylo docíleno použitím 1 cm kolony se symetrií 300 Å a kapilární kolony Atlantis dC18 (75  $\mu$ m x 10 cm). Data byla zpracována proteomickým programem Mascot (MALDI) a „Proteinlynx global server“ (LC-MS/MS). K identifikaci proteinové sekvence byly prohledávány databáze Swissprot nebo Uniprot.

Identifikace proteinu byla provedena analýzou tryptického nebo chymotryptického lyzátu metodou LC-MS/MS pomocí hybridního spektrometru LTQ-ORBTRAP XL (Thermo, USA) s předřazenou 2D kapilární chromatografií (stejně kolony jako u Q-TOF) Reos-2000 (Flux-instruments, Švýcarsko). Hmotnosti peptidů byly stanoveny metodou FT-MS (Fourierova transformace) s rozlišením 60000 s přesností < 10 ppm. MS/MS bylo realizováno metodou CID („collision induced dissociation“) v lineární iontové pasti a fragmentační spektra byla porovnána metodou FT-MS s přesností < 10 ppm.

Pro databázové vyhledávání byl použit program Bioworks (Thermo, USA) a databáze Uniprot s výšše uvedenými parametry přesností.

### **3.14. NMR spektrometrie**

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu a  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózy byly měřeny na spektrofotometru Bruker AVANCE-500 NMR ( $^1\text{H}$  at 500 MHz;  $^{13}\text{C}$  při 150.9 MHz) v  $\text{D}_2\text{O}$  dioxanem jako vnitřním standardem ( $\delta_{\text{H}}$  3.76;  $\delta_{\text{C}}$  69.33). Chemické posuny jsou udány v ppm hodnotách a vazebné konstanty jsou udány v Hz (viz výsledky Tabulka 10). NMR spektra změřil a vyhodnotil RNDr. Miloš Buděšínský, CSc. (ÚOCHB AV ČR v.v.i).

### **3.15. Kvantitativní PCR**

#### **3.15.1. Izolace RNA**

Celková RNA z hemocytů, tukových těles a celých těl larev *Sarcophaga bullata* byla extrahována použitím 300  $\mu\text{l}$  (pro hemocyty a tukové tělesa) nebo 1000  $\mu\text{l}$  (pro celá těla) TriReagentu (Molecular Research Center, Inc.) podle návodu výrobce.

Vzorky RNA byly ošetřeny použitím DNA-free kitu (Ambion), a bylo zabráněno kontaminaci genomovou DNA. Koncentrace RNA byla určena UV spektrofotometrií při 260 nm a kvalita izolované RNA byla analyzována elektroforézou v 1,5% ethidium bromid agarózovém gelu. Vzorky RNA byly uchovávány v  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **3.15.2. Příprava cDNA**

cDNA byla syntetizována použitím 1  $\mu\text{g}$  celkové RNA, 10 pmol oligo25-dT a 10 pmol „random hexamer“ primerů. Směs byla inkubována 10 minut při  $72^\circ\text{C}$ . Poté bylo přidáno 100 U MMLV reverzní transcriptázy (Promega), 12 U RNasinu (Promega) a 5 nmol dNTP do celkovému objemu 10  $\mu\text{l}$  a inkubováno 70 minut při  $37^\circ\text{C}$ . Poté byla reakce zředěna vodou na 100  $\mu\text{l}$  a zmrazena ( $-20^\circ\text{C}$ ).

#### **3.15.3. Real-time qPCR (RT-qPCR)**

Primery pro sapecin, transferin, kathepsin L, “storage-binding protein” (SBP), sarcocystatin and 26/29 kDa proteázu z masařky *Sarcophaga peregrina* a 18S ribozomální

RNA, profenoloxidázy PPO1 a PPO2 z masařky *Sarcophaga bullata* byly navrženy pomocí Primer3 programu. Nukleotidové sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tabulce 8. Po optimalizaci qPCR reakce byly velikosti ampliconů všech genů testovány pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu. Účinnosti všech qPCR reakcí byly kolem 100% což bylo určeno pomocí standardních křivek.

Směsi na qPCR v konečném objemu 25  $\mu$ l, obsahovaly 2  $\mu$ l cDNA, SYBRGreen roztok (Molecular Probes, 200-krát zředěny v dimethylsulfoxidu a poté 20-krát vodou), přímé „forward“ a zpětné „reverse“ primery (0,4 mM roztok každého), 0,3 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> a 1U Taq polymerázy (Promega). qPCR reakce byly měřeny na přístroji Opticon2 (MJ Research, USA) při použití těchto podmínek: 3 minuty 95°C, 40 cyklů: 15 sekund při 95°C, 20 sekund při 60°C a 30 sekund při 2°C. Analýzou křivek tání byly potvrzeny specifické qPCR produkty. Kontroly bez cDNA nedávaly žádný signál nebo se signál primer-dimerů objevil při Ct hodnotách >35 (“cycle of threshold”).

Hodnoty Ct indukovaných a kontrolních skupin byly vyhodnoceny pomocí programu Excel (Microsoft). Poměr genové exprese v indukovaných a kontrolních larvách byl vypočítán z rozdílů Ct hodnot metodou: poměr =  $2^{(Ct(\text{induced})-Ct(\text{control}))}$ .

Přinejmenším biologické duplikáty z celých larev, hemocytů a tukových těles pro všechny časy a indukční podmínky byly použity v paralelách. Střední hodnoty (sloupce) a směrodatné odchylky hodnot jsou znázorněny v grafech ve výsledkové části. Všechny pokusy byly opakovány a poskytovaly podobné výsledky.

**Tabulka 8.** Přímé a zpětné primery pro geny analyzované qPCR.

Gen	GenBank číslo	Přímé primery	Zpětné primery
Sapecin	J04053	TCGCTGTTACCTTGTGCTTG	TAAGGCATGCAAACCATCAA
Transferin	D28940	AGCTCGCGATGGAAAACCTTA	GATGGGCATGCTTTGTAGGT
PPO1	AF161260	TTCATGGAAAAGGGCAAAAC	CTTTTCGCCAAAACGTGATT
PPO2	AF161261	TCACTGGCACTGGCATTTAG	CCTTGCCAATATCTGGTGGT
Kathepsin L	D297741	GTACCCAAATCGGTGGATTG	GCGGAAATGTTGTCCCTCTA
SBP	D16533	CGCATTGCAGAACGTAGAAA	CTGTTGTCCCTGTTGGACCT
Sarcocystatin	J02847	GTCGGTTGTCCCAGTGAAGT	TGTGTGGTGGCTGAGTTGAT
26/29kDa proteáza	AB011375	GGCAAACCATTCCTTACAA	ATGGCCAATAGTGCCAAAAG
18S-rRNA	AF322419	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	AACTAAGAACGGCCATGCAC



## 4. Výsledky

### 4.1. Identifikace a charakterizace antimikrobiálních látek v hemolymfě larev masařky *Sarcophaga bullata*

Výsledky této části disertace byly publikovány v práci: **Ciencialová, A., Neubauerová, T., Šanda, M., Šindelka, R., Cvačka, J., Voburka, Z., Buděšínský, M., Kašička, V., Sázelová, P., Šolínová, V., Macková, M., Koutek, B., & Jiráček, J. (2008) Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *J. Pept. Sci.* 14, 670-678.**

Z indukovaných a neindukovaných (kontrolních) larev masařky *Sarcophaga bullata* byla izolována hemolymfa, která byla následně centrifugována a srážena okyseleným methanolem nebo síranem amonným. Dále byly tyto frakce rozděleny na kolonce Chromabond C18 na podíly hydrofilní a hydrofobní, které byly poté separovány pomocí RP-HPLC. Takto purifikované frakce byly inkubovány spolu s uvedenými patogeny *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Sledovali jsme vliv izolovaných látek na růst těchto patogenů a případnou antimikrobiální aktivitu pomocí turbidimetrického měřicího přístroje Bioscreen C. Vybrané frakce byly dále charakterizovány pomocí elektroforetických metod, hmotnostní a NMR spektrometrií a *N*-koncovou sekvencí. Schéma izolace je na Obrázku 28.

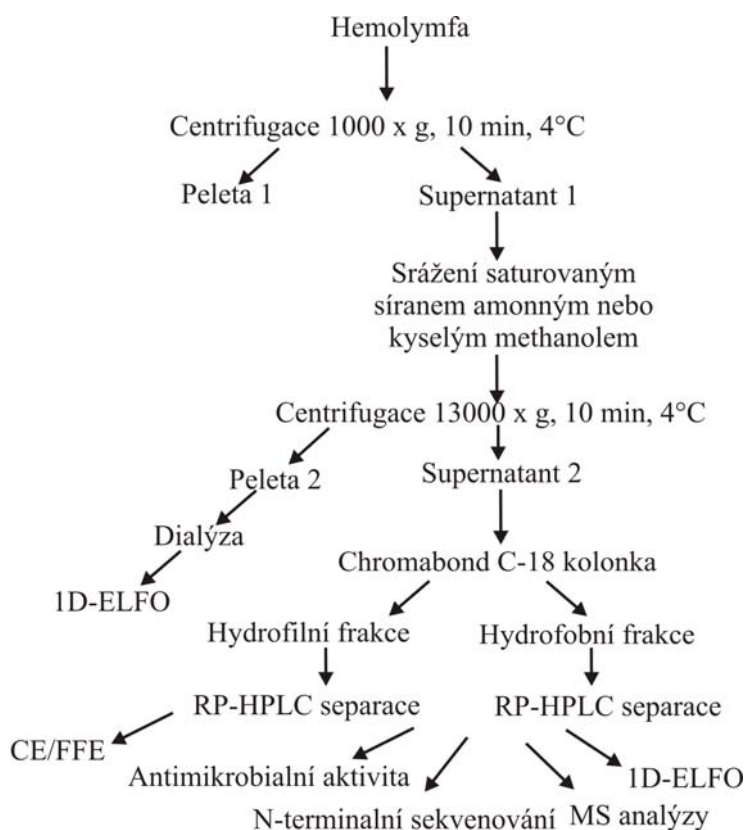
#### 4.1.1. Izolace hemolymfy z larev masařky *Sarcophaga bullata*

Podle velikosti larev se nám podařilo z 200 larev izolovat kolem 4 ml hemolymfy, která byla dále separována centrifugací a srážením dvěma způsoby. V případě srážení síranem amonným jsme pracovali s maximálně 50 larvami, při srážení kyselým methanolem až s 200 larvami.

Supernatant 1 (Obrázek 28) stejně jako obě pelety 2 (vzniklé z obou způsobů srážení supernatantu 1) obsahovaly jeden majoritní protein o *M<sub>r</sub>* asi 75 kDa, který byl pomocí SDS-elektroforézy, tryptického štěpení a MS analýzy (data nejsou ukázána) identifikován jako profenoloxidáza (EC 1.14.18.1).

#### 4.1.2. Separace na Chromabond C18 kolonkách

Po srážení okyseleným methanolem byl supernatant 2, po odpaření methanolu, rozdělen na kolonkách Chromabond C18 na hydrofilní a hydrofobní frakce. Z 200 larev bylo získáno po rozdělení na kolonkách přibližně 100 mg hydrofilních frakcí a desetkrát méně frakcí hydrofobních, tj. 10 mg. Při metodě srážení síranem amonným jsme použitím kolonek Chromabond C18 supernatant zároveň odsolili. Z 50 larev jsme získali přibližně 3 mg hydrofobní frakce. V hydrofilní frakci byl převážně síran amonný, a proto jsme ji dále nezpracovávali metodou RP-HPLC, ale tuto frakci jsme dialyzovali a analyzovali 1D-SDS-PAGE v 12% gelu a identifikovali jediný abundantní protein jako profenoloxidázu.



**Obrázek 28.** Schéma zpracování hemolymfy.

#### 4.1.3. Analytické RP-HPLC

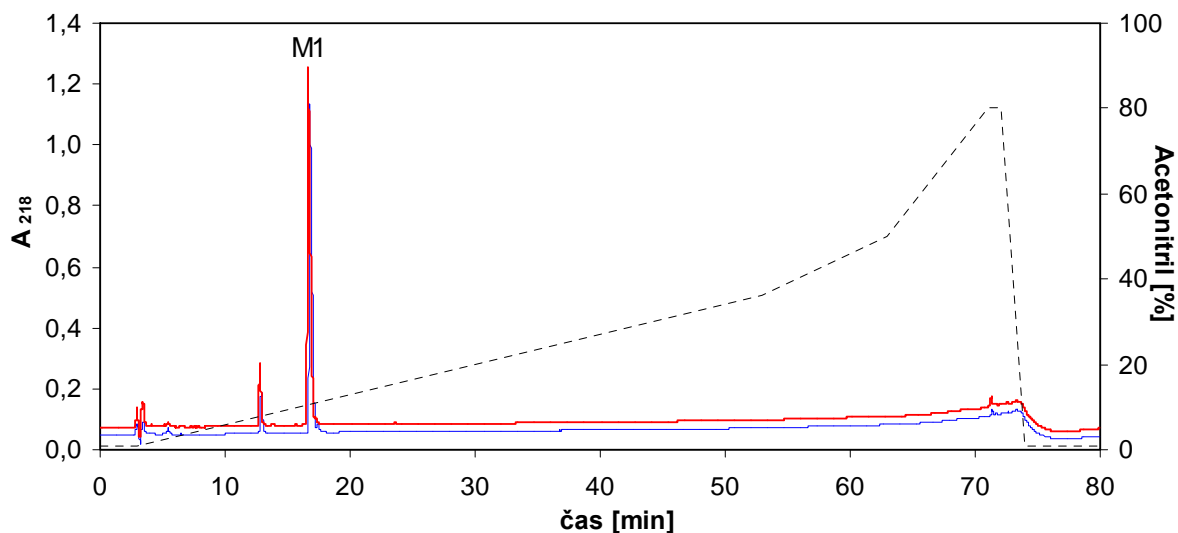
Pomocí analytické HPLC jsme porovnávali složení hydrofilních a hydrofobních frakcí po srážení kyselým methanolem a hydrofobní frakci po srážení síranem amonným z indukovaných a neindukovaných larev.

Rozdíly mezi chromatogramy frakcí z indukovaných a neindukovaných larev se významně projevily pouze při srážení okyseleným methanolem. Při porovnávání hydrofobních frakcí se u frakce z indukovaných larev objevily 3 nové vrcholy (Obrázek 30). Při postupu srážení síranem amonným nebyly objeveny rozdílné vrcholy před a po indukci (Obrázek 32).

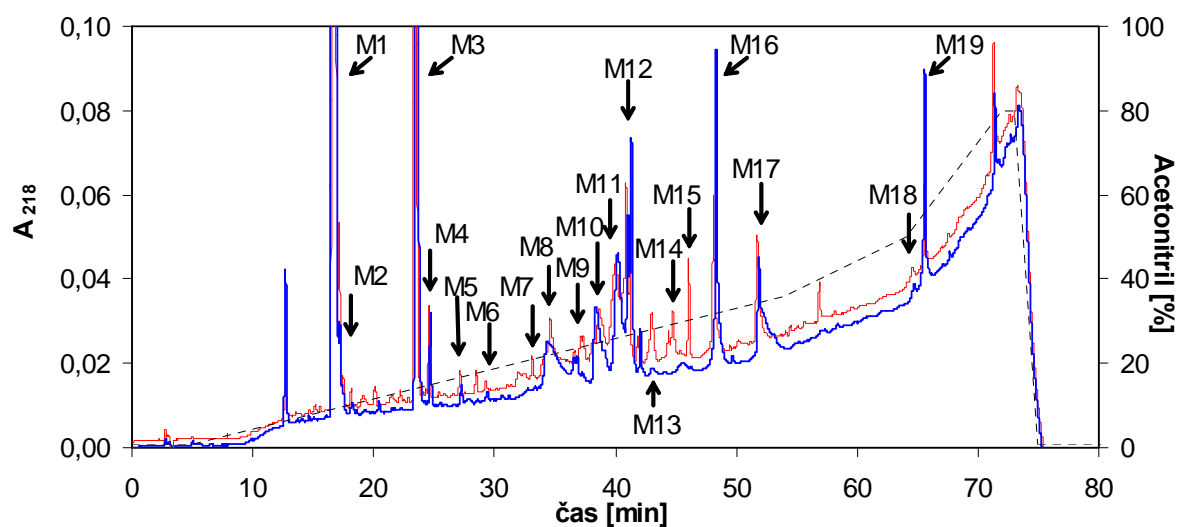
#### **4.1.3.1. Srážení hemolymfy okyseleným methanolem**

V hydrofilní frakci po srážení okyseleným methanolem byl jeden majoritní vrchol (M1 na Obrázku 29), který jsme identifikovali pomocí hmotové spektrometrie (ESI-MS/MS) jako dipeptid  $\beta$ -alanyl-tyrozin, a tentýž dipeptid jsme identifikovali také v hydrofobní frakci po srážení okyseleným methanolem a síranem amonným (M1 na Obrázku 30 a S1 na Obrázku 32). Struktura  $\beta$ -alanyl-tyrozinu byla potvrzena za pomoci  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter (viz Tabulka 10, stránka 67).

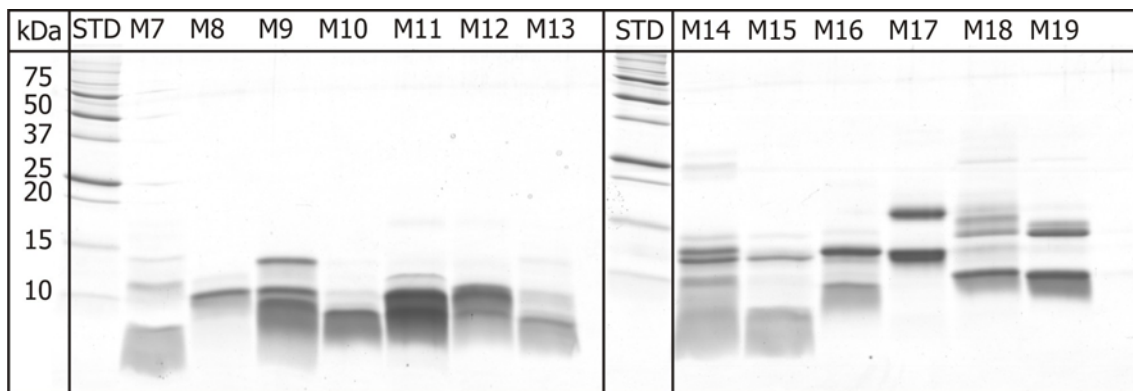
Na chromatogramu hydrofobní frakce z indukovaných larev byly opakovaně identifikovány tři vrcholy označené M13, M14, M15 (Obrázek 30), které nebyly přítomny u neindukovaných larev. Analyzované hydrofilní a hydrofobní frakce jsme dále separovali na preparativní RP-HPLC (viz metody). Hydrofobní frakci z indukovaných larev po srážení methanolem jsme rozdělili na 19 frakcí označených M1-M19 (Obrázek 30). Izolované frakce jsme lyofilizovali, vážili a analyzovali 1D-elektroforézou (Obrázek 31). Analýzou se potvrdila přítomnost peptidů a proteinů relativně nízkých molekulových hmotností ve frakcích M7-M19.



**Obrázek 29.** RP-HPLC analýza hydrofilní frakce z kolony Chromabond C18 získaná z hemolymfy larev masačky *Sarcophaga bullata* po srážení okyseleným methanolem. Chromatogram kontrolních larev je modrý a indukovaných je červený.  $\beta$ -Alanyl-tyrozin je označen jako M1.



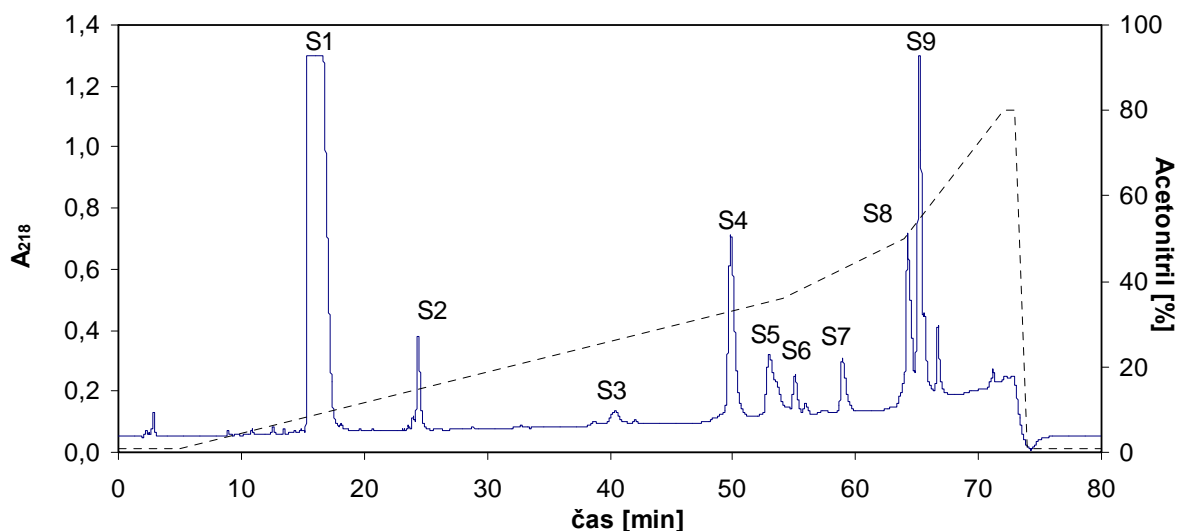
**Obrázek 30.** RP-HPLC analýza hydrofobní frakce z kolony Chromabond C18 získaná z hemolymfy larev masačky *Sarcophaga bullata* po srážení okyseleným methanolem. Chromatogram kontrolních larev je modrý a indukovaných je červený. Izolované frakce jsou označeny M1-M19.



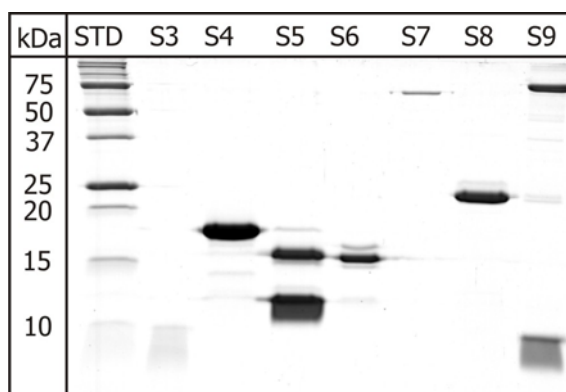
**Obrázek 31.** SDS-PAGE izolovaných frakcí získaných po srážení oksyleným methanolem.

#### 4.1.3.1. Srážení hemolymfy síranem amonným

Hydrofobní frakci z indukovaných larev a neindukovaných larev po srážení síranem jsme rozdělili na devět frakcí označených S1-S9 (Obrázek 32). Izolované frakce jsme lyofilizovali, vážili a analyzovali 1D-elektroforézou (Obrázek 33). Touto analýzou jsme zjistili, že frakce S3-S9 obsahují různé proteiny. Frakce S3, S4, S6 a S7 obsahovaly jednotlivé proteiny zatímco frakce S5 a S9 byly složeny z několika proteinů.



**Obrázek 32.** RP-HPLC analýza hydrofobní frakce z kolony Chromabond C18 získaná z hemolymfy larev masařky *Sarcophaga bullata* po srážení síranem amonným. Izolované frakce jsou označeny S1-S9. Chromatogramy indukovaných a kontrolních larev byly v podstatě stejné.



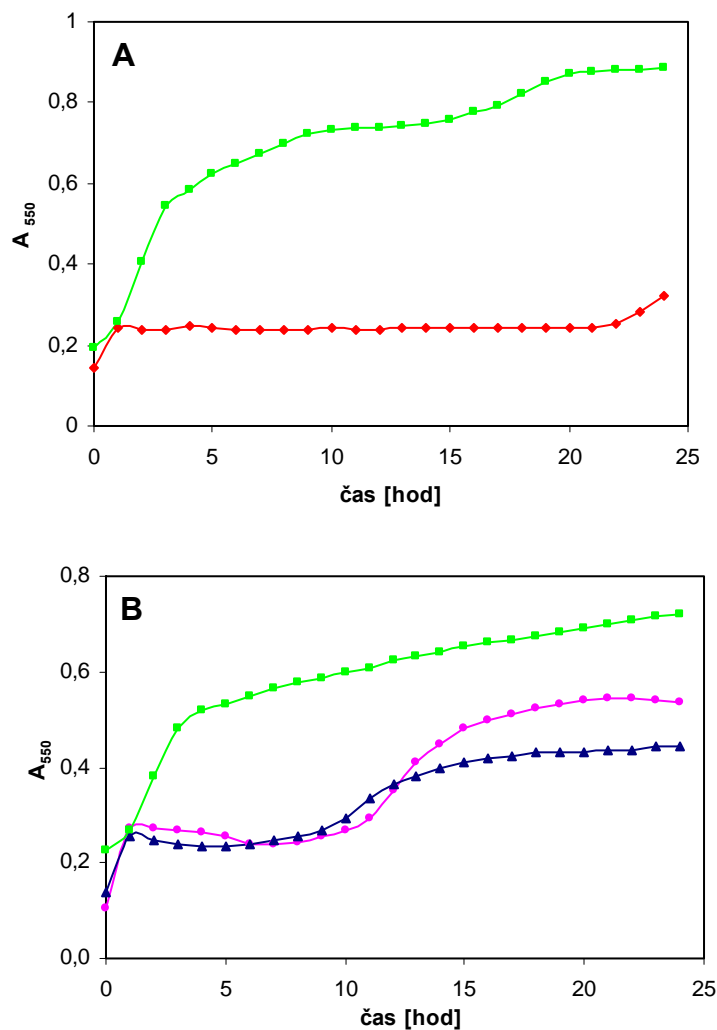
**Obrázek 33.** SDS-PAGE izolovaných frakcí získaných po srážení síranem amonným.

#### 4.1.4. Antimikrobiální aktivita

Majoritní protein ze supernatantu 1 a z obou pelet 2 (Obrázek 28) identifikovaný jako profenoloxidáza nevykázal žádnou zjevnou antimikrobiální aktivitu vůči testovaným mikroorganismům.

Antimikrobiální aktivita frakcí S1-S9 a M1-M19 byla testovaná proti bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativní bakterie) *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivní bakterie) do koncentrace 1 mg/ml.

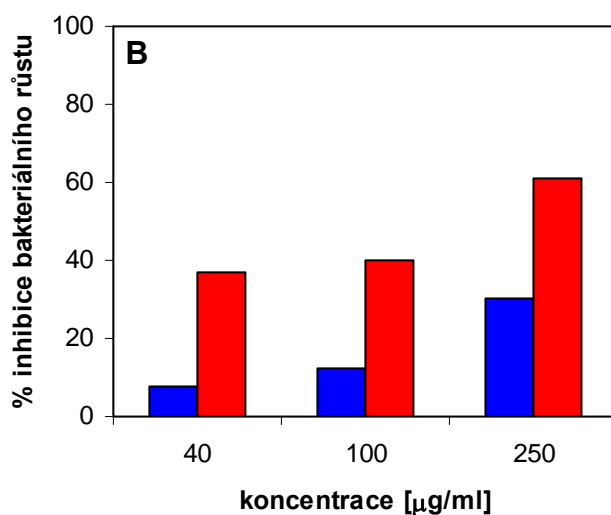
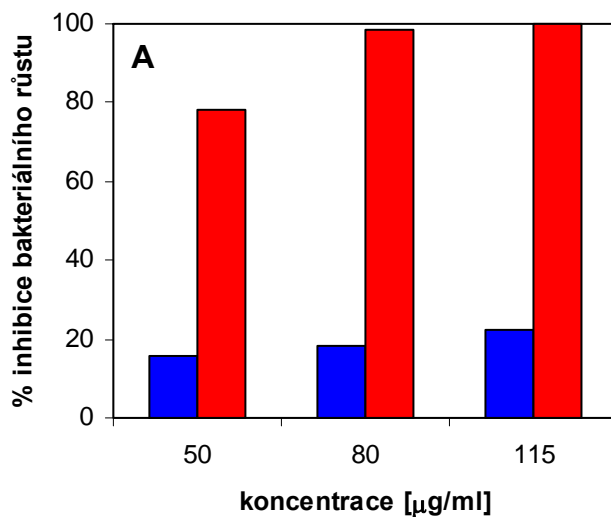
Při porovnání chromatogramů hydrofobních frakcí z indukovaných a neindukovaných larev po srážení methanolem byly zjištěny tři frakce (M13, M14 a M15) vyskytující se pouze v indukovaných larvách. Právě u těchto frakcí byla zjištěna antimikrobiální aktivita. Frakce M13 inhibovala růst bakterií *Pseudomonas aeruginosa* při koncentraci 970  $\mu\text{g/ml}$ , jak je vidět na Obrázku 34A. Frakce M14 a M15 efektivně inhibovaly růst bakterií *Staphylococcus aureus* při koncentracích 100  $\mu\text{g/ml}$  a 400  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 34B).



**Obrázek 34. A.** Inhibice růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* frakcí M13 (◆) při 970 µg/ml. Kontrolní křivka růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je znázorněna jako ■.

**B.** Inhibice růstu bakterie *Staphylococcus aureus* frakcí M14 (●) při 400 µg/ml a M15 (▲) při 100 µg/ml. Kontrolní křivka růstu je bakterie *Staphylococcus aureus* znázorněna jako ■.

Mezi frakcemi S1-S9 pouze frakce S4 a S7 vykázaly antimikrobiální aktivitu a signifikantně inhibovaly růst bakterie *Staphylococcus aureus*, ale pouze slabě inhibovaly růst bakterie *Escherichia coli* (Obrázek 35). Minimální inhibiční koncentrace frakce S4 pro bakterie *Staphylococcus aureus* byla určena mezi 80 a 115 µg/ml.



**Obrázek 35.** Inhibice bakteriálního růstu kmene *Staphylococcus aureus* (červeně) a kmene *Escherichia coli* (modře) při různých koncentracích frakce S4 (A) a S7 (B).

#### 4.1.5. Charakterizace aktivních proteinových a peptidových frakcí

Aktivní proteinové a peptidové frakce S4, S7 a M13-M15 byly dále analyzovány MALDI-TOF a ESI-Q-TOF hmotovou spektrometrií pro určení přesné relativní molekulové hmotnosti peptidů a proteinů. Naměřená data jsou shrnuta v Tabulce 8 a porovnána s hodnotami získanými z gelové elektroforézy.



**Tabulka 8.** Určení relativních molekulových hmotností ( $M_r$ ) peptidů a proteinů hmotnostní spektrometrií nebo SDS-elektroforézou.  $M_{r\text{Tris-PAGE}}$  a  $M_{r\text{Tricine-PAGE}}$  znamená, že elektroforéza probíhala Trisovým nebo Tricinovým pufovacím systémem.

Název frakce	$M_{r\text{Tris-PAGE}}$	$M_{r\text{Tricine-PAGE}}$	$M_{r\text{ESI-MS/MS}}$	$M_{r\text{MALDI-MS}}$
<b>S4</b>	19000	-	16783	16777
<b>S7</b>	69000	-	69097	69549
<b>M13</b>	10000	10000, 6000	4808, 3498	4813
<b>M14</b>	12000, 5000	10000, 4000	3754	3714, 9632
<b>M15</b>	12000, 5000	10000, 4000	4060	4060, 9630

V proteinových a peptidových frakcích s antimikrobiální aktivitou byla také určována identita příslušných peptidů a proteinů. Proteinové proužky byly vyříznuty z SDS gelů, štěpeny trypsinem nebo chymotrypsinem a analyzovány MALDI-MS. Výsledné peptidové sekvence byly analyzovány v dostupných proteinových databázích (Swissprot nebo Uniprot). Současně byly proteiny *N*-koncově sekvenovány v roztoku nebo po přenosu z gelu na PVDF membránu. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9.

Sekvence proteinu ve frakci S4 vykazovala asi 50% identitu s „odorant-binding“ proteinem 99b (OBP99b) z octomilky *Drosophila melanogaster*. Protein ve frakci S7 byl identifikován jako transferin pomocí obou enzymových štěpení a MALDI-MS a také *N*-terminální sekvencí. Peptid(y) ve frakci M13 se nepodařilo identifikovat porovnáním získaných sekvencí v dostupných proteinových databázích. Sekvence peptidu ve frakci M15 je téměř identická se sekvencí antimikrobiálního peptidu sapecinu z masačky *Sarcophaga peregrina* a zcela identická se sekvencí defensinu z mouchy *Phormia terraenovae* („black blowfly“). To samé platí pro krátkou sekvenci peptidu ve frakci M14. Výsledky získané z *N*-terminální sekvence frakce M15 byly potvrzeny MALDI-MS analýzou chymotryptických štěpů.

**Tabulka 9.** Identifikace aktivních frakcí *N*-koncovou sekvenací a MS analýzou tryptických nebo chymotryptických štěpů.

Frakce	N-terminalní sekvenace		Tryptické štěpení	Chymotryptické štěpení
<b>S4</b>	DHHEGHHEHHEHDTXEYVVKTQQDLV KYREDXGAKLXVSXELMXKYKNNE	OBP99b	neurčeno	neurčeno
<b>S7</b>	EEQTYMCV	transferin	transferin	transferin
<b>M13</b>	AIAMARSN	neurčeno	neurčeno	neurčeno
<b>M14</b>	ATXDLLSG	sapecin	neurčeno	neurčeno
<b>M15</b>	ATXDLLSGTGINHSAXAAHXLLR GNRGGYXNGKGVVXVRN	sapecin	neurčeno	sapecin

#### 4.2. *β*-alanyl-tyrozin a jeho syntetické analogy

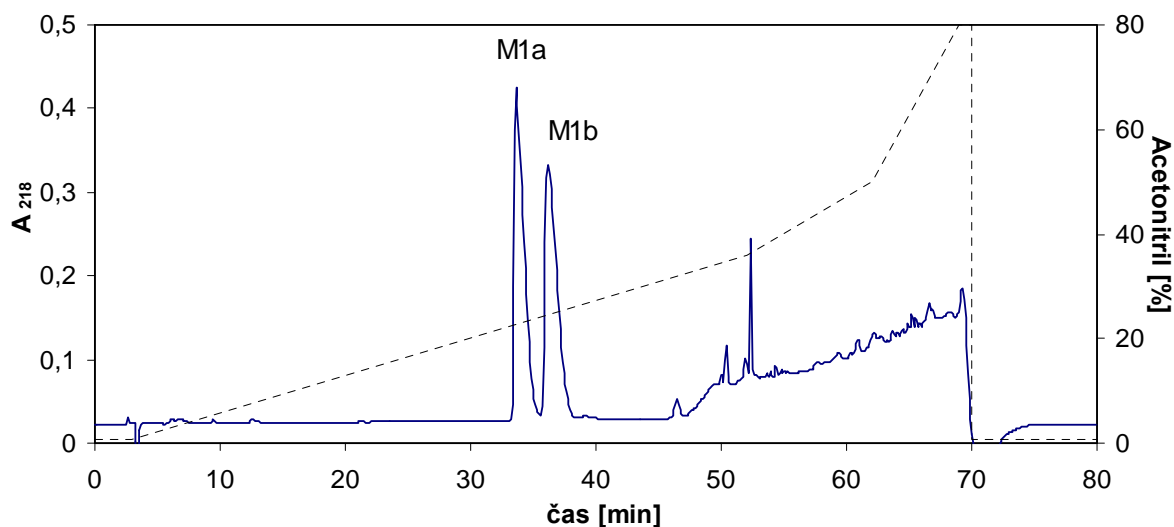
Jak již bylo zmíněno výše, pozorovali jsme jeden hlavní vrchol (M1, Obrázek 29) v hydrofilní frakci z Chromabond<sup>®</sup> C-18 získané po srážení hemolymfy okyseleným methanolem. Látka byla identifikována jako dipeptid *β*-alanyl-tyrozin. Struktura byla určena z <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spekter. Protonové a uhlíkové signály byly strukturně označeny prostřednictvím série 1D- (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-APT) a 2D-NMR spekter (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMQC, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC). *β*-Alanyl-tyrozin jsme také syntetizovali metodou syntézy na pevné fázi a zjistili jsme, že NMR spektra přírodní a syntetické látky jsou identická. Protonová a uhlíková spektra jsou shrnuta v Tabulce 10.

**Tabulka 10.** Protonová a uhlíková-13 NMR data látek ve frakcích M1, M1b a syntetického  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin a  $\beta$ -alanyl-L-tyrosyl- $\beta$ -D-fruktopyranózy v D<sub>2</sub>O.

Protony	<sup>1</sup> H NMR		Uhlík	<sup>13</sup> C NMR	
	$\beta$ -Ala-L-Tyr-OH nebo M1	$\beta$ -D-Fru- $\beta$ -Ala-L-Tyr-OH nebo M1b		$\beta$ -Ala-L-Tyr-OH nebo M1	$\beta$ -D-Fru- $\beta$ -Ala-L-Tyr-OH nebo M1b
$\beta$ -D-Fru:					
H-1a	--	3.30 d, $J=12.8$	C-1	--	55.86
H-1b	--	3.24 d, $J=12.8$	C-2	--	98.04
H-3	--	3.72 d, $J=9.9$	C-3	--	72.63
H-4	--	3.88 dd, $J=9.9, 3.4$	C-4	--	72.08
H-5	--	4.00 m	C-5	--	71.67
H-6a	--	4.00 m	C-6	--	66.79
H-6b	--	3.76 dd, $J=13.1, 2.2$			
$\beta$ -Ala:					
H $\alpha$ 1	2.65 dt, $J=16.3, 6.5$	2.73 dt, $J=16.5, 6.6$	C=O	174.3	174.65
H $\alpha$ 2	2.58 dt, $J=16.3, 6.5$	2.67 dt, $J=16.5, 6.6$	C $\alpha$	34.5	32.94
H $\beta$ 1+H $\beta$ 2	3.16 t, $J=6.5$	3.27 m	C $\beta$	38.5	47.14
L-Tyr-OH:					
H $\alpha$	4.51 dd, $J=9.2, 5.1$	4.63 dd, $J=9.3, 5.3$	COOH	179.9	178.24
H $\beta$ 1	3.16 dd, $J=14.2, 5.1$	3.19 dd, $J=14.0, 5.3$	C $\alpha$	58.4	57.35
H $\beta$ 2	2.87 dd, $J=14.2, 9.2$	2.92 dd, $J=14.0, 9.3$	C $\beta$	39.1	38.84
H-ortho	7.17 m	7.17 m	C- <i>ipso</i>	132.0	131.44
H-meta	6.86 m	6.86 m	C- <i>ortho</i>	133.2	133.41
			C- <i>meta</i>	118.1	118.20
			C- <i>para</i>	155.4	157.22

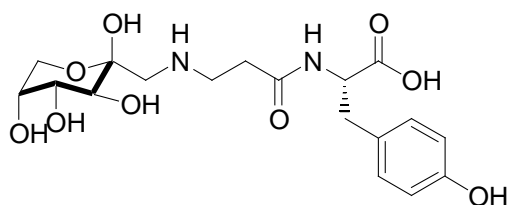
Použitím kapilární elektroforézy s chirální pseudo-stacionární fází na cyklodextrinovém základě, jsme dokázali, že tyrozin v izolovaném  $\beta$ -alanyl-tyrozinu (frakce M1 Obrázek 29) je přítomen v L-formě (Šolínová a kol. manuskript v přípravě). Zajímavé bylo, že kapilární elektroforéza odhalila přítomnost příměsi ve frakci M1 (1-3%). Tato příměs nebyla detekovatelná v M1 frakci použitím <sup>1</sup>H or <sup>13</sup>C NMR. Příměs byla výrazně nabohacena použitím preparativní volné elektroforézy (FFE, viz Metody, elektroforeogram není ukázan) a „FFE“ přečištěná frakce byla poté separována RP-HPLC

(Obrázek 36). Izolovali jsme dvě složky M1a a M1b. Hmotovou spektrometrií jsme zjistili, že frakce M1a je  $\beta$ -alanyl-tyrozin (Mr 252,11) a frakce M1b je látka s vyšší molekulovou hmotností (Mr 414,28). Struktura látky ve frakci M1b byla určena z  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spekter. Protonová a uhlíková spektra jsou shrnuta v Tabulce 10.



**Obrázek 36.** RP-HPLC separace FFE přečištěné frakce M1. Injektováno 30  $\mu\text{g}$  přečištěné frakce. Izolované frakce jsou označeny M1a a M1b.

Na základě MS analýz a NMR spekter jsme usoudili, že frakce M1b je s největší pravděpodobností  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin s D-fruktózou navázanou na jeho *N*-konci ( $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranóza, viz Obrázek 37). Také tuto látku jsme syntetizovali použitím Amadoriho přesmyku [124] (viz Metody) a zjistili jsme, že NMR spektra přírodní a syntetické látky byla identická.



**Obrázek 37.** Struktura  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózy.

Dipeptid  $\beta$ -alanyl-tyrozin byl již dříve identifikován v masařce *Neobellieria (Sarcophaga) bullata* Meylaersovou a kol. [4]. Autoři zjistili, že látka vykazuje

antimikrobiální aktivitu v rozmezí 8-30 mM. Proto jsme se rozhodli testovat antimikrobiální aktivitu frakce M1, syntetického  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu a několika jeho syntetických analogů v koncentracích vyšších než 1 mg/ml (4 mM). Rovněž byla testována antimikrobiální aktivita frakce M1b a syntetické  $\beta$ -alanyl-L-tyrozyloxy-D-fruktopyranózy. Antimikrobiální aktivity všech testovaných látek jsou shrnuty v Tabulce 11.

Podařilo se nám určit minimální inhibiční koncentrace (MIC) u některých derivátů  $\beta$ -alanyl-tyrozinu pro bakteriální kmeny *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Frakce M1, tj. směs M1a a M1b, inhibovala mikroorganismy s MIC v rozmezí 10-15 mM. Zajímavé bylo, že syntetický  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin byl více aktivní proti všem mikroorganismům než frakce M1 a syntetický  $\beta$ -alanyl-D-tyrozin. *N*-Terminální acetylace  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu měla mírně negativní efekt na antimikrobiální aktivitu při porovnání s  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinem. Amidace C-konce měla za následek ztrátu aktivity derivátů *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu-NH<sub>2</sub> a  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu-NH<sub>2</sub>. Izolovaná (M1b) a syntetická  $\beta$ -alanyl-L-tyrozyloxy-D-fruktopyranóza byly neaktivní v nejvyšší použité koncentraci (5 mM).

**Tabulka 11.** Antimikrobiální aktivity  $\beta$ -alanyl-tyrozinu a jeho analogů vyjádřené jako MIC (minimální inhibiční koncentrace). NI znamená žádnou inhibici („no inhibition“) při 5 mM koncentraci.

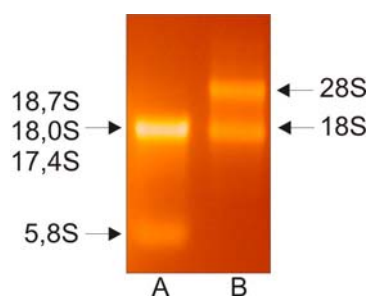
Látka	MIC (mM)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
M1	10	15	15
$\beta$ -Ala-L-Tyr-OH	6	7,5	6
$\beta$ -Ala-D-Tyr-OH	8,5	15	15
<i>N</i> -Ac- $\beta$ -Ala-L-Tyr-OH	8,5	8,5	8,5
<i>N</i> -Ac- $\beta$ -Ala-L-Tyr-NH <sub>2</sub>	>20	>20	>20
$\beta$ -Ala-L-Tyr-NH <sub>2</sub>	>>20	>>20	>>20
M1b	NI	NI	NI
$\beta$ -Ala-L-Tyr- $\beta$ -D-fruktopyranóza	NI	NI	NI

### 4.3. Analýza změn exprese vybraných genů *Sarcophaga bullata* po indukci imunitní odpovědi pomocí real-time qPCR

Výsledky této části práce budou publikovány v práci: **Mášová, A., Šindelka, R., Kubista, M., Kindl, J., Jiráček, J.,** Gene expression response after immune stimulation of the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. Zasláno do tisku, *BMC Genetics*.

#### 4.3.1. Izolace RNA z larev

Celková RNA byla izolována z celých těl, tukových těles a hemocytů indukovaných a kontrolních larev. Analýza v agarózovém gelu ukázala jeden široký proužek obsahující 18,7, 18,0 a 17,4S rRNA a slabý proužek 5,8S rRNA (Obrázek 38A). Fragmenty 18,7S a 17,4S vznikly štěpením 26S rRNA. Podobné výsledky a velikosti fragmentů byly již popsány v publikaci Frenche a kol. [125] (Obrázek 38).



**Obrázek 38.** Agarózový gel analyzující rRNA z masařky *Sarcophaga bullata* izolovanou z celého těla larev (A). Pro porovnání celková RNA izolovaná z embrya drápatky *Xenopus leavis* (B).

### 4.3.2. Porovnání úrovně genové exprese v indukovaných a kontrolních larvách

#### 4.3.2.1. Celé tělo larev

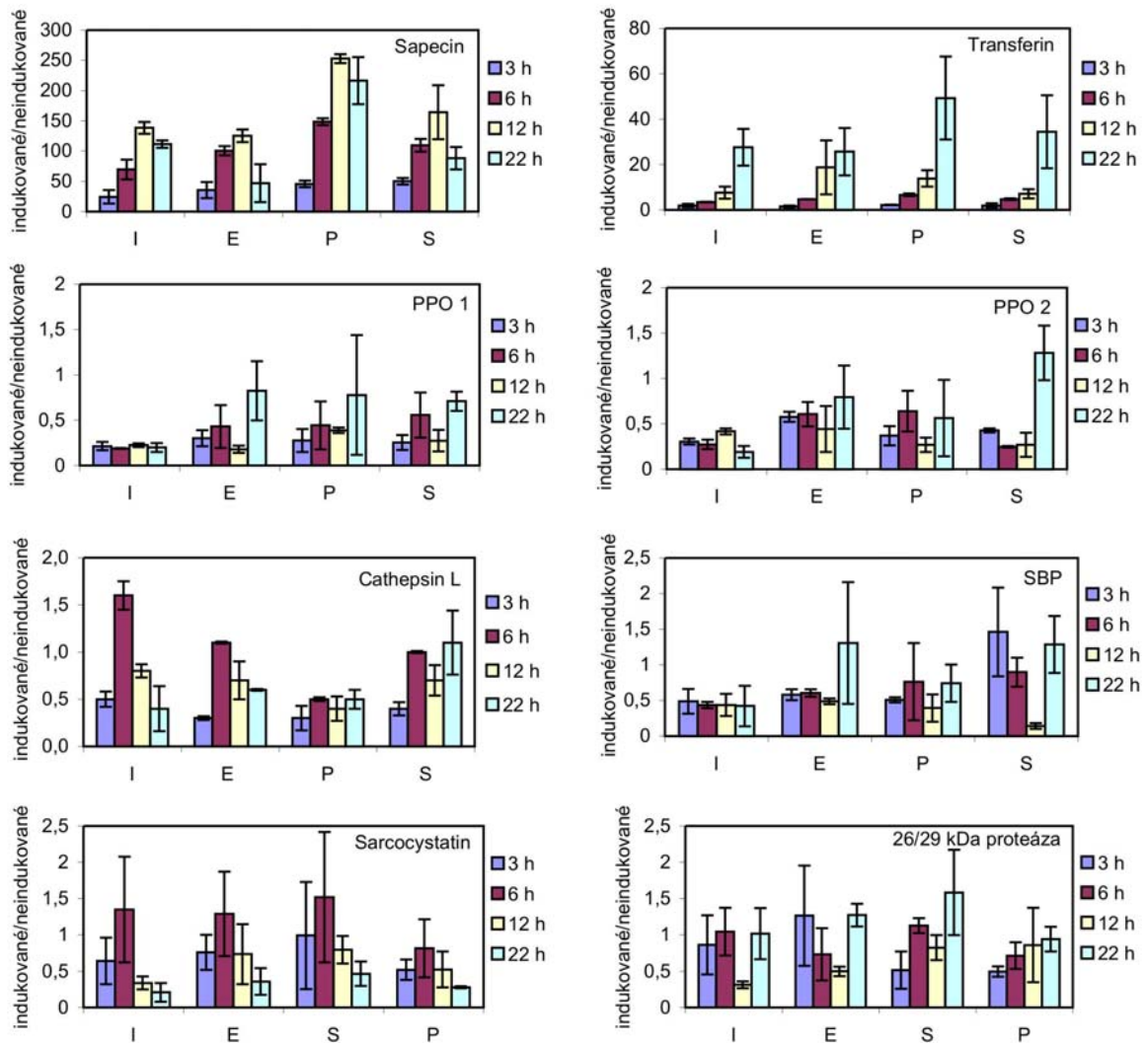
Úroveň exprese vybraných genů v celém těle masařky *Sarcophaga bullata* jsme porovnávali mezi indukovanými a kontrolními larvami. Na Obrázku 39 jsou znázorněny grafy porovnávající expresi osmi různých genů; sapecinu, tranferinu, profenoloxidázy 1 a 2 (PPO1, PPO2), „storage-binding“ proteinu (SBP), kathepsinu L, sarcocystatinu a

26/29 kDa proteázy 3, 6, 15 a 22 hodin po indukci. Data jsou prezentována jako poměr exprese daného genu u indukovaných kontrolních larev. Larvy byly indukovány čtyřmi různými způsoby: Gram-pozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*, dvěma Gram-negativními bakteriemi *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a poraněním sterilním entomologickým špendlíkem.

Geny můžeme rozdělit do dvou skupin podle rozdílné odpovědi na stimulaci imunitní odpovědi. Všechny čtyři typy indukce rapidně zvýšily transkripci genů sapecinu a transferinu. Exprese genu transferinu se postupně zvyšovala a dosáhla maxima 22 hodin po indukci a hladina mRNA byla zvýšena přibližně 25-50-krát. Exprese genu sapecinu byla zvýšena až 150-250-krát za 12 hodin po indukci.

Na druhou stranu exprese genů PPO1, PPO2, kathepsinu L, “storage binding” proteinu (SPB) and sarcocystatinu byla potlačena nebo se pohybovala kolem normální hladiny. Po indukci se poměr exprese transkriptů PPO1 a PPO2 snížil až 2-5-krát v indukovaných larvách při porovnání s kontrolními. Exprese genů kathepsinu L, SPB a sarcocystatinu byla také lehce snížena. Hladina mRNA 26/29 kDa proteázy zůstala v podstatě nezměněna. Profily exprese všech studovaných genů nevykazovaly signifikantní rozdíly mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními infekcemi nebo mechanickým sterilním poraněním.

Jelikož produkce 18S rRNA je značně vysoká při porovnání se studovanými geny, 18S rRNA nebyl použit jako referenční gen. Nicméně porovnání hladin 18S rRNA v indukovaných a kontrolních vzorcích bylo použito jako kontrola spolehlivosti izolace celkové RNA, ošetření vzorku DNázou, syntézy cDNA a qPCR kvantifikace. Podle očekávání hladina 18S rRNA zůstala po indukci nezměněna a proto by normalizace s 18S rRNA signifikantně nezměnila výsledky a závěry.



**Obrázek 39.** Časová závislost genové exprese v celém těle larev masařky *Sarcophaga bullata* po indukci sterilním poraněním (I), bakteriemi *E.coli* (E), *S. aureus* (S) a *P. aeruginosa* (P).

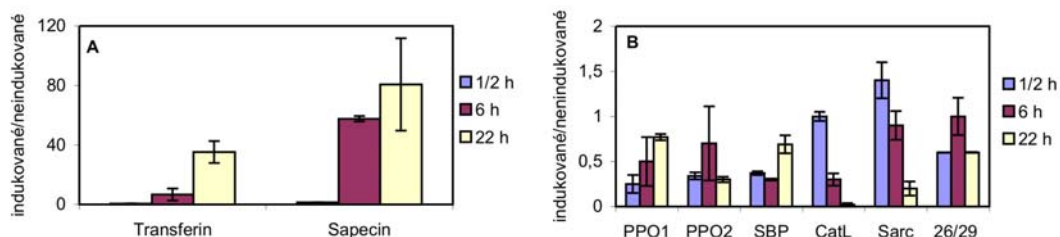
#### 4.3.2.2. Tukové těleso larev

Larvy byly indukovány pouze injekcí bakteriální suspenze *E. coli*. RNA z tukových těles larev byla izolována 1/2, 6 a 22 hodin po indukci. Expresе osmi vybraných genů byla měřena v indukovaných a kontrolních larvách.

Hladiny v indukovaných tukových tělesech byly zvýšeny téměř 80-krát u sapecinu a 35-krát u transferinu v porovnání s hladinami u kontrolních larev (Obrázek 40A). Expresе PPO1, PPO2 a SBP se po indukci snížila přibližně 2,5-krát (Obrázek 40B).



Hladiny mRNA sarcocystatinu a kathepsinu L byly sníženy dokonce ještě výrazněji (Obrázek 40B). Hladina mRNA 26/29 kDa proteázy zůstala nezměněna (Obrázek 40B).

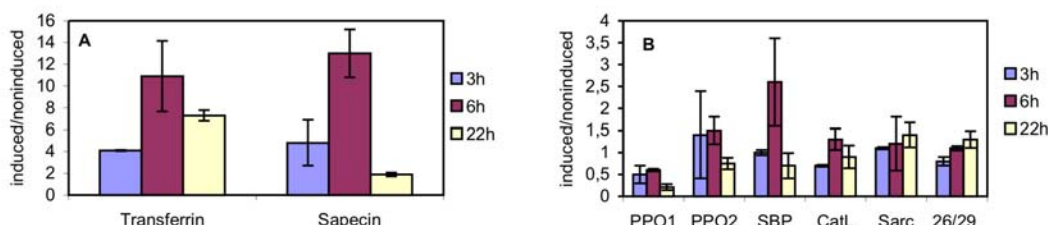


**Obrázek 40.** Časová závislost genové exprese v tukovém tělese larev masařky *Sarcophaga bullata* po infekci bakterií *E. coli*. PPO1 a 2, profenoloxidáza 1 a 2; SBP, “storage-binding protein”; CatL, kathepsin L; Sarc, sarcocystatin; 26/29, 26/29 kDa proteáza.

#### 4.3.2.3. Hemocyty larev

Analýza časové závislosti genové exprese v hemocytech larev *Sarcophaga bullata* larvae po indukci bakteriální suspenzí *E. coli* je ukázána na Obrázku 41. Expresе osmi genů byla měřena 3, 6 a 22 hodin po indukci.

Expresе sapecinu a transferinu byla nejvíce zvýšena 13- a 11-krát 6 hodin po indukci. Po 22 hodinách byla hladina exprese, na rozdíl od tukových těles, již podstatně nižší. Expresе PPO1 klesla přibližně 2-krát. Expresе genů PPO2, SBP, kathepsinu L, sarcocystatinu, 26/29 kDa proteázy nebyla signifikantně ovlivněna indukcí.



**Obrázek 41.** Časová závislost genové exprese v hemocytech larev masařky *Sarcophaga bullata* po infekci bakterií *E. coli*. PPO1 a 2, profenoloxidáza 1 a 2; SBP, “storage-binding protein”; CatL, kathepsin L; Sarc, sarcocystatin; 26/29, 26/29 kDa proteáza.

#### **4.4. Proteomická analýza změn proteinů masařky *Sarcophaga bullata* po indukci imunitní odpovědi**

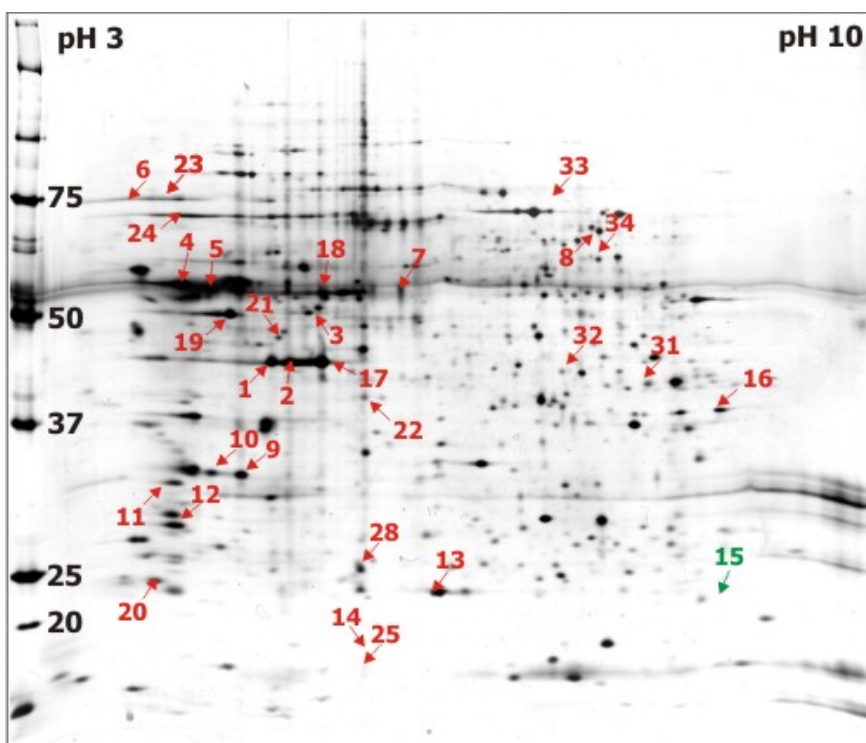
Larvy masařky *Sarcophaga bullata* byly indukovány injekcí bakteriální suspenze *Escherichia coli*. V intervalech 1/2, 6 a 22 hodin byly z indukovaných a neindukovaných larev izolovány hemocyty a tuková tělesa. Po lyzaci buněk tukového tělesa a hemocytů byly proteiny fokusovány na nelineárních „IPG stripech“ z rozsahem pH 3-10 a poté rozděleny v gradientovém SDS-PAGE gelu. Série 4 analytických gelů z každého času a typu buněk byly barveny stříbrem dle Bluma [121] a analyzovány PDQuest programem. Poté byly připraveny preparativní gely, které byly barveny koloidní Coomasiie brilliant blue [122]. Z preparativních gelů byly vyřezány proteinové skvrny a po tryptickém štěpení byly proteiny podrobeny identifikaci za pomoci hmotnostní spektrometrie (viz. Metody).

##### **4.4.1. Proteomická analýza indukce imunitní odpovědi v hemocytech**

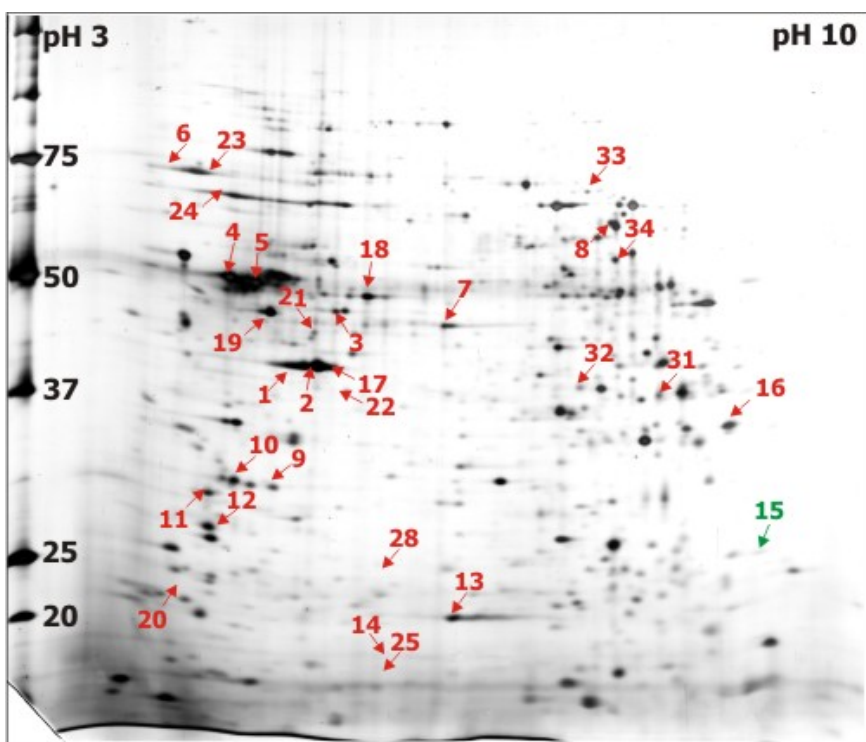
Na Obrázcích 42-44 jsou znázorněny reprezentativní proteinové mapy z indukovaných a neindukovaných hemocytů připravené po 1/2, 6 a 22 hodinách. Byla provedena srovnávací analýza (program PDQuest, viz Metody 3.11.5.4.) změn zastoupení proteinů v hemocytech larev masařky po indukci bakteriální suspenzí *E.coli*. Relativní kvantita věrohodně změněných proteinů vzhledem k neindukovaným larvám z každého „match-setu“ byly zapsány do Tabulky 12 a jejich lokalizace a případné kvantitativní rozdíly byly zjišťovány v „match-setech“ z dalších časů inkubace. Celkově bylo detekováno devět proteinů se změnou exprese při srovnávání larev indukovaných a neindukovaných. Tři z proteinů vykazovaly zvyšující se expresi s prodlužujícím se časem od indukce, u třech proteinů došlo naopak ke snížení exprese a u tří zbývajících nebyl zaznamenán jednoznačný časový trend.

Analýzou enzymových štěpů proteinů hmotnostní spektrometrií jsme identifikovali celkem 28 proteinů z gelů na Obrázcích 40-42. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13. Čísla proteinových skvrn na Obrázcích 42-44 odpovídají číslům proteinových skvrn uvedeným v Tabulkách 12 a 13. Pro vysvětlení uvádíme názvy organismů z Tabulky 13: DRO\_ME, *Drosophila melanogaster*; DRO\_PS, *Drosophila pseudoobscura*; LUC\_CU, *Lucillia cuprina*; SAR\_PE, *Sarcophaga peregrina*; SAR\_BU, *Sarcophaga bullata*; ANO\_GA, *Anopheles Gambiae*; MOUSE, *Mus musculus*.

A

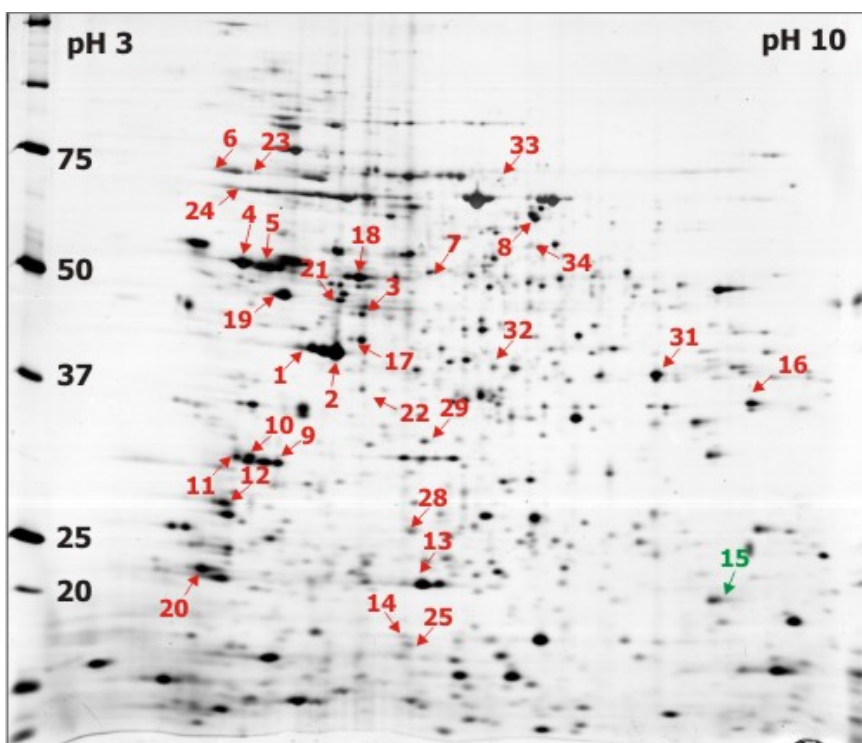


B

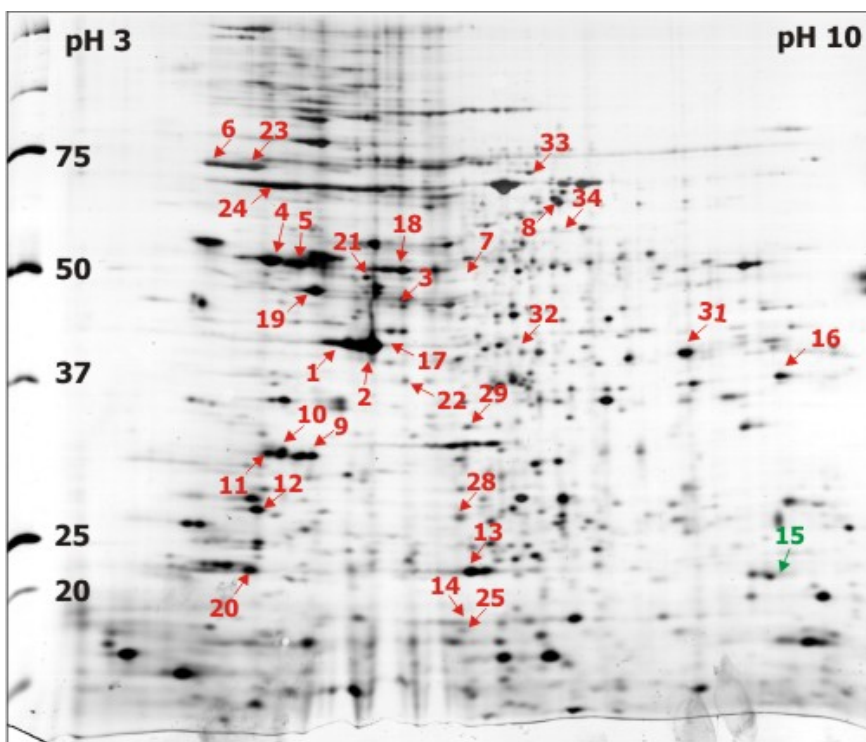


**Obrázek 42.** 2-DE analýza proteinů z hemocytů larev masařky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) 1/2 hodiny po indukci bakteriemi *E.coli*.

A

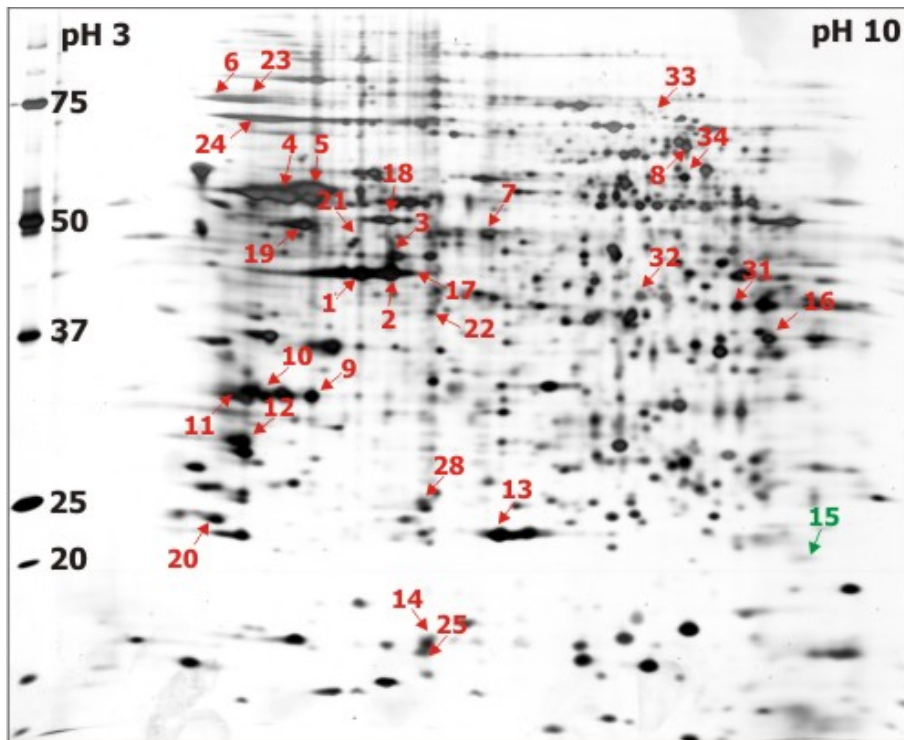


B

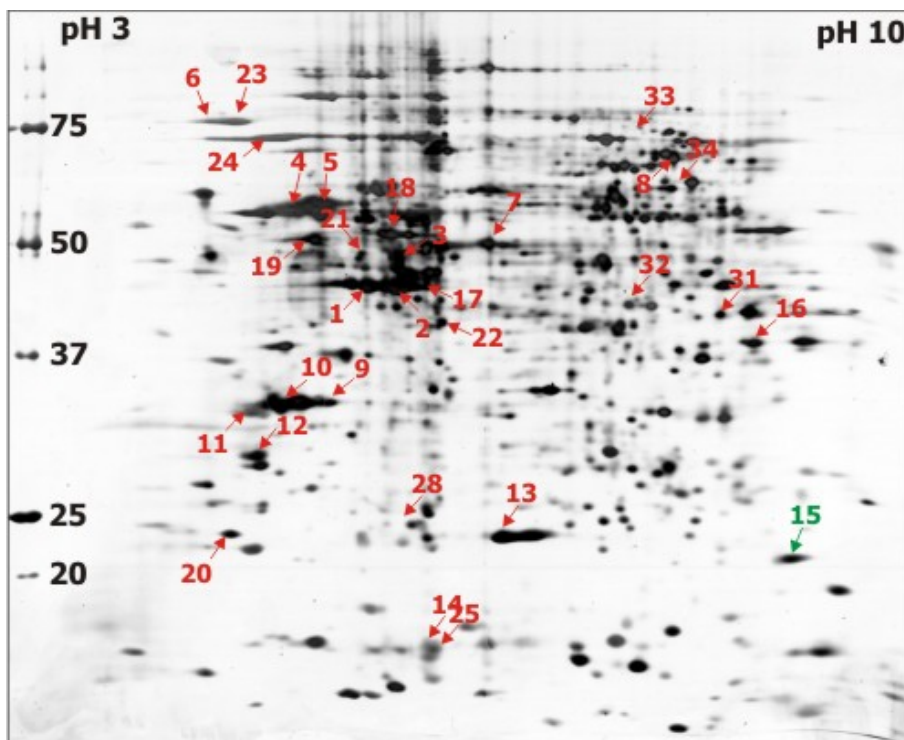


**Obrázek 43.** 2-DE analýza proteinů z hemocytů larev masašky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) 6 hodin po indukci bakteriemi *E.coli*.

A



B



Obrázek 44. 2-DE analýza proteinů z hemocytů larev masašky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) 22 hodin po indukci bakteriemi *E.coli*.

**Tabulka 12:** Výsledky srovnávací analýzy 2D-elektroforéz z hemocytů larev masařky *Sarcophaga bullata* za pomoci programu PDQuest (viz Metody). V tabulce je uvedeno devět proteinů u nichž byla zaznamenána signifikantní změna exprese vzhledem k neindukovaným larvám. Pro tyto proteiny jsou uvedeny hodnoty změny jejich intenzit v jednotlivých časech vzhledem k neindukovaným larvám. Není definovatelný znamená, že se jednalo o kvalitativní změnu proteinu - proteinové skvrny. Identifikované proteiny jsou ještě jednou uvedeny v Tabulce 13.

Čas	½ h	6h	22h	
<b>Počet skvrn</b>	380±10	389±14	376±6	
<b>Korelační koeficient</b>	0,55 až 0,77	0,8 až 0,9	0,65 až 0,82	
<b>Proteinová skvrna</b>				<b>Identifikace</b>
<b>14</b>	není detekovatelný	↑ 2,2	↑ 12	Twinstar protein
<b>15</b>	není detekovatelný	↑ 7	↑ 11	RH43809p
<b>25</b>	není detekovatelný	↑ 2,9	↑ 6	40S ribozomální protein S15Aa
<b>28</b>	není detekovatelný	↑ 2,1	~1,5	Lektin podjednotka alfa prekurzor
<b>29</b>	není detekovatelný	↓ 0,4	není detekovatelný	Neidentifikovaný
<b>31</b>	↑ 2	1,4	↑ 3,5	Neidentifikovaný
<b>32</b>	↑ 2,29	~0,9	↓ 0,3	Neidentifikovaný
<b>33</b>	↑ 7	↑ 17	není detekovatelný	Hormon-senzitivní lipáza
<b>34</b>	~1,4	↓ není definovatelný	↓ 0,12	T-komplex protein podj. alfa



**Tabulka 13.** Seznam proteinů identifikovaných v hemocytech larev masařky *Sarcophaga bullata*.

Proteinová skvrna	Přístupové číslo	Organismus	Název proteinu	Teoretické Mr / pI	Změřené Mr / pI	Mascot skóre	Peptidy search/match/cover	Funkce
1	P02572	DRO_ME	Aktin-42A	42196/5,3	46,0/5,6	85	25/9/34	Struktura cytoskeletu [126,127]
2	P02572	DRO_ME	Aktin-42A	42196/5,3	46,0/5,65	103	15/8/26	Struktura cytoskeletu [126,127]
3	Q02748	DRO_ME	Eukaryotický iniciační faktor 4A	46149/5,43	47,8/5,65	82	21/10/28	Vazba mRNA k ribozómu [126]
4	Q53YG6	DRO_ME	LD43681p, tubulin	50571/4,76	58,1/5,2	210	31/22/42	Součást mikrotubulů [126]
5	P06605	DRO_ME	Tubulin alfa-3 řetězec	50486/5,00	57,4/5,4	217	29/21/54	Součást mikrotubulů [126]
6	P29844	DRO_ME	Heat shock 70 kDa [prekursor]	72330/5,22	73,3/5,0	94	11/8/15	Multimerní komplexy proteinů [126]
7	Q26654	SAR_PE	Storage binding protein (SBP)	133490/6,05	52,0/5,9	61	19/9/10	Protein vazající arylforin [128]
8	Q9Y0B4	SAR_BU	Profenoxidáza	79323/6,14	66,5/7,0	192	27/19/41	Melanizace, sklerotinizace, imunita [22,27,28]
9	AAG12161	DRO_ME	Annexin BIXa	39273/5,77	33,1/5,2	70	17/6/24	Vazba vápníku/fosfolipidů [126]
10	P22464	DRO_ME	Annexin-B9	36302/4,77	33,1/5,4	90	32/8/29	Vazba vápníku/fosfolipidů [126]
11	Q26636	SAR_PE	Kathepsin L prekursor	38223/5,96	32,3/5,1	54	20/3/20	Degradace proteinů v lysozómu [129-131]
12	Q8IN86	DRO_ME	14-3-3-protein epsilon	29326/4,74	28,5/5,1	51	24/6/20	Sledování poškození DNA [126]
13	P28338	LUC_CU	glutathione transferáza	23814/6,09	22,9/5,9	50	16/4/26	Konjugace redukováného glutathionu [132]
14	P45594	DRO_ME	Twinstar protein	17428/6,73	16,7/5,9	129	23/12/54	Migrace centrosomu, cytokineze [133]
15	Q8MS07	DRO_ME	RH43809p	16974/9,00	21,3/8,4	61	14/4/41	Fagocytóza
16	P48610	DRO_ME	Arginin kináza	40126/6,04	39,7/8,1	74	11/6/19	Struktura cytoskeletu [126]
17	A03000	DRO_ME	Aktin 3 - (fragmenty)	34238/5,44	46,0/5,7	41	13/4/18	Struktura cytoskeletu [126]
18	Q8MT58	DRO_ME	RE11562p (CG17337-PA)	53529/4,43	53,3/5,6	70	28/8/21	Vazba proteinů [126]
19	Q05825	DRO_ME	ATP-syntáza	53544/ 5,14	52,7/5,4	152	17/14/36	Produkce ATP z ADP [134]
20	Q2LZA2	DRO_PS	GA10405-PA [fragment]	22497/5,02	22,6/5,6	56	10/4/19	Neznámá [135]
21	Q9V405	DRO_ME	26S proteazom reg.kompl..	47083/5,22	49,5/5,55	103	13/8/29	ATP-vázaná degradace [126]
22	Q7JVI3	DRO_ME	Eukar. transl. IF 3 podjednotka M	44515/5,46	41,7/5,6	85	19/8/19	Vazba proteinů [126]
23	Q7PQK5	ANO_GA	AGAP004192-PA	72440/5,12	73,3/5,0	80	17/9/18	Vazba ATP [136]
24	Q294C1	DRO_PS	GA18066-PA [fragment]	71429/5,36	70,7/5,1	106	29/13/28	Vazba ATP [135]
25	P48149	DRO_ME	40S ribozomální protein S15Aa	14771/9,84	15/5,8	20,1	2	Vazba a elongace proteinů [126]
28	P05047	SAR_PE	Lektin podjednotka alfa prekursor	32991/5,57	30/5,7	30,1	3	Vazba galaktózy, imunitní obrana larev[137]
33	P54310	MOUSE	Hormon-senzitivní lipáza	83295/6,49	75/6,3	20,1	2	Štěpení triacylglycerolů [138]
34	P12613	DRO_ME	T-komplex protein podj. alfa	59519/6,03		50,2	5	Chaperon - zbalování proteinů [126]

#### **4.4.2. Proteomická analýza indukce imunitní odpovědi v tukových tělesech**

Na Obrázcích 45-47 jsou znázorněny reprezentativní proteinové mapy z indukovaných a neindukovaných buněk tukových těles připravené po 1/2, 6 a 22 hodinách.

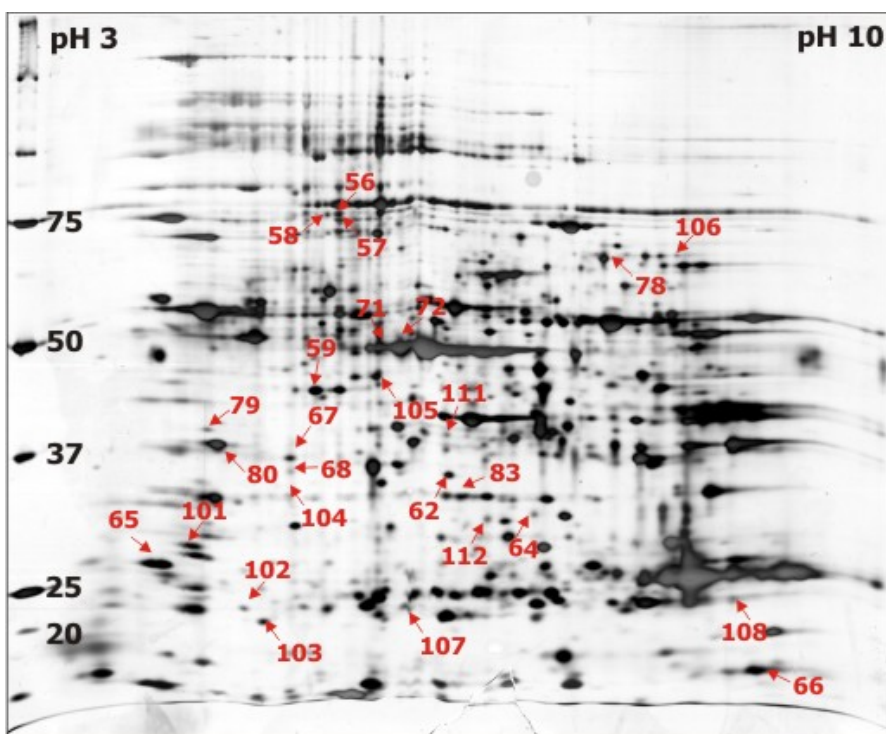
Detekce signifikantně pozměněných proteinů v čase vzhledem k neindukovaným larvám byla provedena stejně jako v případě hemocytů (4.4.1). Celkově bylo detekováno 15 proteinů se změnou exprese z nichž byly tři určeny a tyto proteiny jsou uvedeny v Tabulce 14. Některé z proteinů vykazovaly zvyšující se expresi, a u jiných proteinů došlo naopak ke snížení exprese. U většiny proteinů však nebyl zaznamenán jednoznačný časový trend.

Analýzou enzymových štěpů proteinů hmotnostní spektrometrií jsme identifikovali celkem 16 proteinů, které jsou uvedeny v Tabulce 15.

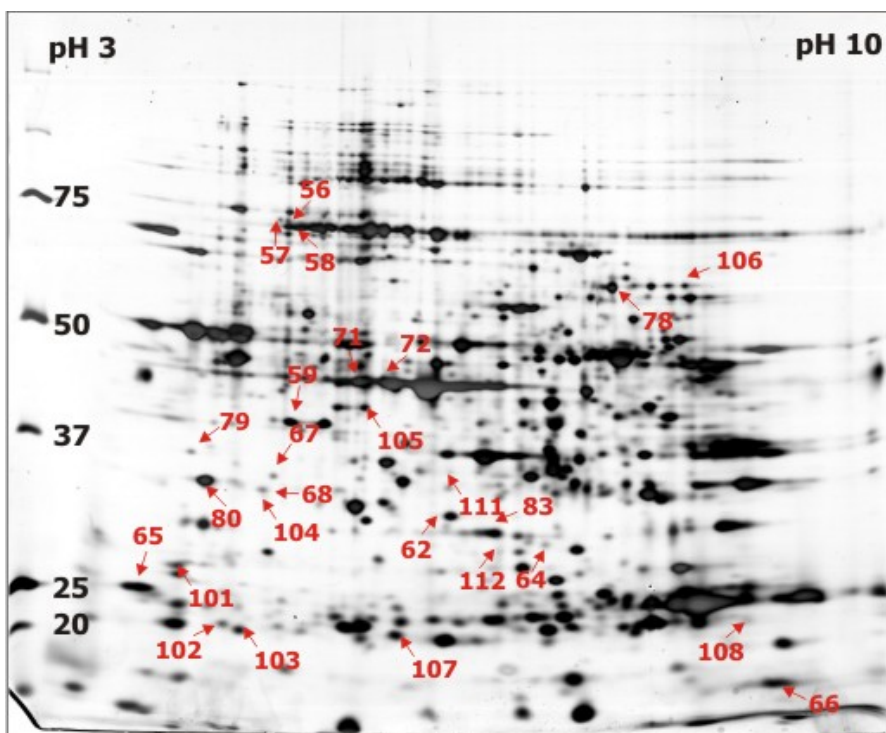
Čísla proteinových skvrn na Obrázcích 45-47 odpovídají číslům proteinových skvrn uvedeným v Tabulkách 14 a 15.



A

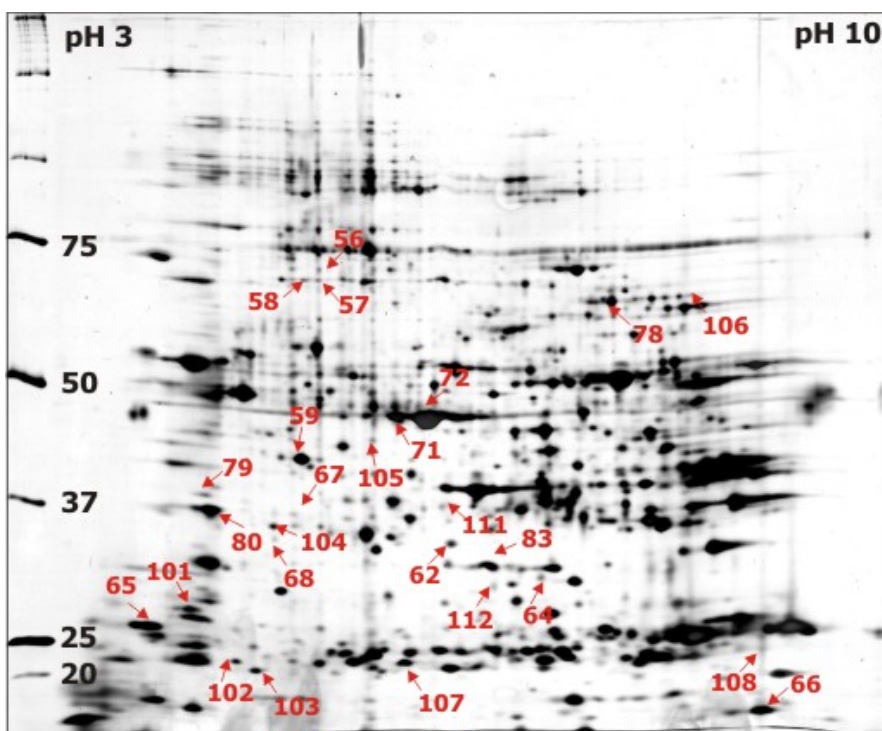


B

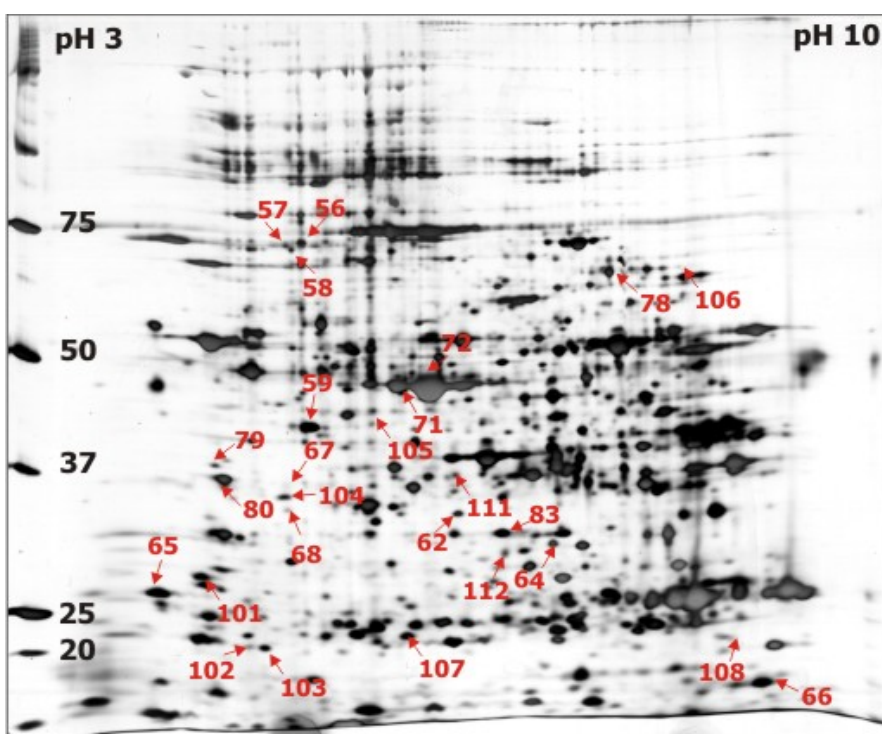


Obrázek 45. 2-DE analýza proteinů tukových těles larev masařky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) ½ hodiny po bakteriální indukci (*E.coli*).

A

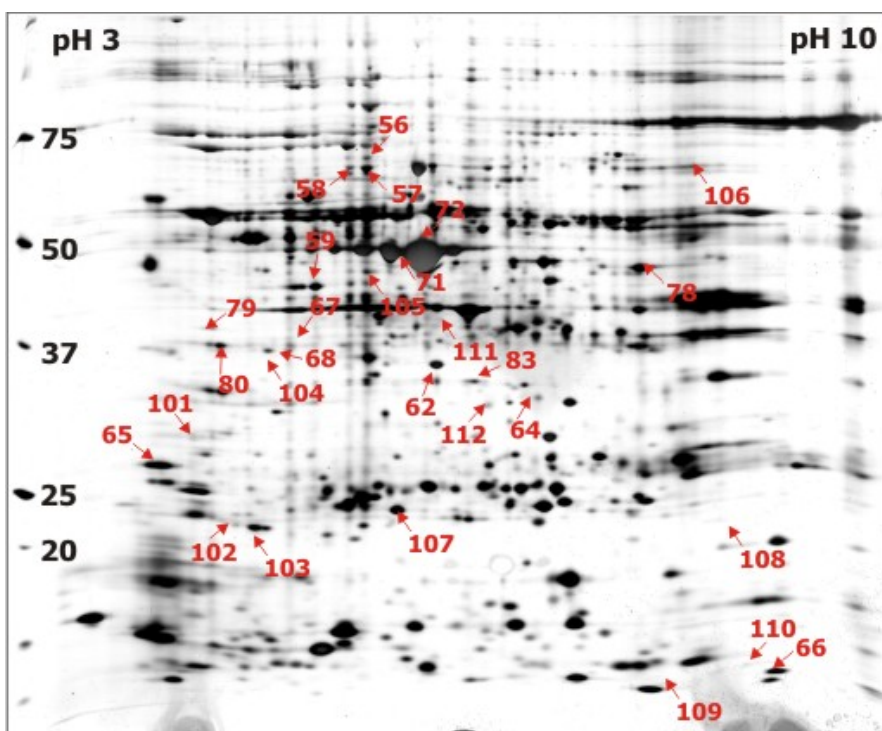


B

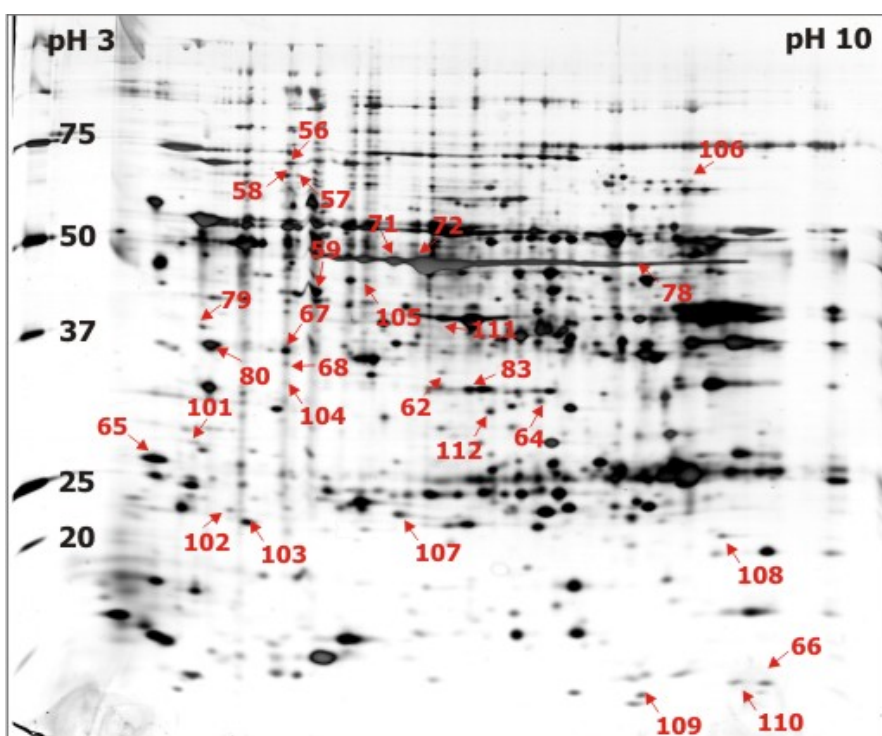


Obrázek 46. 2-DE analýza proteinů buněk tukových těl larev masařky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) 6 hodin po bakteriální indukci (*E.coli*).

A



B



Obrázek 47. 2-DE analýza proteinů buněk tukových těles larev masačky *Sarcophaga bullata* neindukovaných (A) a indukovaných (B) 22 hodin po bakteriální indukci (*E.coli*).

**Tabulka 14:** Výsledky srovnávací analýzy 2D-elektroforéz z buněk tukových těles larev masařky *Sarcophaga bullata* za pomoci programu PDQuest (viz Metody). V tabulce je uvedeno 15 proteinů u nichž byla zaznamenána signifikantní změna exprese vzhledem k neindukovaným larvám. Pro tyto proteiny jsou uvedeny hodnoty změn jejich intenzit v jednotlivých časech vzhledem k neindukovaným larvám. Není definovatelný znamená, že se jednalo o kvalitativní změnu proteinu - proteinové skvrny. Identifikované proteiny jsou ještě jednou uvedeny v Tabulce 15.

Čas	½ h	6h	22h	
<b>Počet skvrn</b>	308±2	478±8	305±8	
<b>Korelační koeficient</b>	0,6 až 0,8	0,7 až 0,86	0,5 až 0,8	
<b>Proteinová skvrna</b>				<b>Identifikace</b>
<b>101</b>	↓ 0,60	↑ 2	~0,90	Neidentifikovaný
<b>102</b>	není detekovatelný	není definovatelný ↑	↓ 0,18	Neidentifikovaný
<b>103</b>	~1,30	↑ 2,50	↓ 0,34	Neidentifikovaný
<b>68</b>	↓ není definovatelný	↑ 2,40	~1,3	5'-nukleosidáza surE
<b>104</b>	↓ 0,58	↑ 2,10	~1,20	Neidentifikovaný
<b>105</b>	↓ 0,80	↓ 0,13	↓ 0,70	Neidentifikovaný
<b>106</b>	↑ 2,50	↓ 0,09	není detekovatelný	Neidentifikovaný
<b>107</b>	↑ 2,20	↑ 1,80	↓ 0,24	Neidentifikovaný
<b>62</b>	↑ 2,20	↓ 0,54	↓ 0,17	26S proteazomová reg.podj.
<b>64</b>	↓ 0,87	~1,20	↑ 2	40S ribozomální protein S3
<b>108</b>	není detekovatelný	↑ 3,60	↑ 21	Neidentifikovaný
<b>109</b>	není detekovatelný	není detekovatelný	↑ není definovatelný	Neidentifikovaný
<b>110</b>	není detekovatelný	není detekovatelný	↑ není definovatelný	Neidentifikovaný
<b>111</b>	↓ 0,49	↓ 0,53	není detekovatelný	Neidentifikovaný
<b>112</b>	↓ 0,3	↑ 1,48	~1,10	Neidentifikovaný



**Tabulka 15.** Seznam proteinů identifikovaných v tukových tělesech larev masařky *Sarcophaga bullata*.

Proteinová skvrna	Přístupové číslo	Organismus	Název proteinu	Teoretické Mr / pI	Změřené Mr / pI	Skóre	Peptidy	Funkce
56	Q23976	DRO_ME	ATP-dependentní DNA-helikáza	72495/6,20	74/5,3	5,7	1	Specifická vazba DNA [126]
57	P28514	CAL_VI	Arylforin podjednotka C223	92525/5,41	73/5,3	10,1	1	Zásobní protein larev [139]
58	Q9Z934	CHL_PN	DNA ligáza	73909/5,99	73/5,3	10	1	Syntéza DNA [140]
59	P18600	ART_SX	Aktin klon 205	41786/5,30	40/5,3	10,2	1	Struktura cytoskeletu [126]
62	Q9V3H2	DRO_ME	26S proteazomová regul. podjednotka	34378/5,74	34/5,8	20,1	2	ATP vázaná degradace proteinů [126]
64	Q06559	DRO_ME	40S ribozomální protein S3	27435/9,43	29/6,1	10,1	1	Oprava DNA [126]
65	O96S27	DRO_ME	Elongační faktor 1-beta	24247/4,40	26/4,4	30,2	3	Vazba a elongace proteinů [126]
66	Q9V3G3	DRO_ME	Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomeráza	24650/9,05	17/8,4	70,2	7	Urychlení zbalování proteinů [126]
67	O77460	DRO_ME	Anorganická pyrofosfatáza	37393/6,52	34/5,2	20,1	4	Správný vývoj hemocytů larev [141]
68	O29320	ARC_FU	5'-nukleosidáza surE	28231/4,70	32/5,2	10,1	2	Fosfatázová aktivita [142]
71	P0A516	MYC_TU	Cytochrom P450 121	47825/5,10	46/5,6	8	1	Oxidoreduktázová aktivita [143]
72	P0A514	MYC_TU	Cytochrom P450 124	43256/6,21	40/5,8	10,1	1	Oxidoreduktázová aktivita [143]
78	P50137	RAT	Transketoláza	67643/7,22	65/6,7	20,1	2	Pentózofosfátový cyklus
79	P41044	DRO_ME	Calbindin-32	35717/4,59	36/4,8	10,1	1	Vazba Ca <sup>2+</sup> [126]
80	P38979	DRO_ME	40S ribozomální protein SA	35341/6,12	35/4,9	40,3	4	Elongace proteinů [126]
83	Q9U3U0	CER_PA	60S kyselý ribozomální protein	33948/6,87	31/6,0	30,1	3	Interakce s dimery P1 a P2 [144]

DRO\_ME *Drosophila melanogaster*  
 CER\_PA *Ceratitis capitata*  
 CHL\_PN *Chlamydia pneumonie*

RAT *Rattus norvegicus*  
 ARC\_FU *Archeoglobus fulgidus*  
 MYC\_TU *Mycobacterium tuberculosis*

CAL\_VI *Calliphora vicina*  
 ART\_SX *Artemis sp.*

## 5. Diskuze

Nejprve jsme se pokusili izolovat a identifikovat nové antimikrobiálně aktivní látky z hemolymfy larev masařky *Sarcophaga bullata* (Parker 1916). Použili jsme larvy ve stádiu třetího instaru vývoje v období tzv. toulavého chování. Abychom indukovali u larev imunitní odpověď a produkci antimikrobiálních látek byly larvy injektovány bakteriální suspenzí *Escherichia coli* nebo byly poraněny sterilním entomologickým špendlíkem. Při indukci larev jinými druhy bakterií bylo dosaženo shodných výsledků jako s bakteriemi *Escherichia coli* a sterilním poraněním.

Supernatant 1 (Obrázek 28) a také obě pelety 2 (po srážení síranem amonným nebo okyseleným methanolem) obsahovaly jeden majoritní protein (75 kDa). Tento protein jsme identifikovali jako profenoloxidázu, zymogen, který je aktivován na fenoloxidázu (EC 1.14.18.1). Tento výsledek ukazuje, že profenoloxidáza je majoritní protein v hemolymfě larev masařky *Sarcophaga*. U profenoloxidázy jsme nedetekovali žádnou zjevnou antimikrobiální aktivitu. Nicméně v minulosti bylo prokázáno, že aktivace profenoloxidázy na fenoloxidázu je jednou nejrychlejších imunitních odpovědí, která probíhá během minut [16]. Náš výsledek ukazuje, že molekula profenoloxidázy nemá vně larev masařky přímou antibakteriální aktivitu. Její účast v imunitní obraně larev pravděpodobně spočívá v tom, že z profenoloxidázy vznikající fenoloxidáza se podílí na biosyntéze melaninu a také hraje důležitou roli při sklerotizaci (tvrdnutí) kutikuly, hojení ran a enkapsulaci (obalování) cizorodého materiálu [24].

Supernatanty 2 jsme pomocí C-18 kolonek separovali na hydrofilní a hydrofobní frakce. Hydrofilní frakce získaná po srážení hemolymfy okyseleným methanolem obsahovala jednu hlavní látku (vrchol M1, Obrázek 29), která byla identifikována jako dipeptid  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin. Hydrofilní frakce po srážení síranem amonným obsahovala vysoké koncentrace solí a nebyla tudíž dále analyzována. Nicméně je velmi pravděpodobné, že tato frakce také obsahovala jako hlavní součást  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin. Také obě hydrofobní frakce obsahovaly jeden majoritní vrchol s krátkým retenčním časem, M1 nebo S1 jak můžeme vidět na Obrázcích 30 a 32. V obou těchto vrcholech byl opět identifikován dipeptid  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin.

Jestliže se zamyslíme nad výše popsanými výsledky je jasné, že hlavními proteinovými a peptidovými složkami hemolymfy masařky *Sarcophaga bullata* jsou

enzym fenoloxidáza a dipeptid  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin. Obě tyto komponenty se významně podílejí na procesu melanizace u larev [24]. Role  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu v antimikrobiální obraně larev bude diskutována později.

Na druhou stranu, jestliže si odmyslíme přítomnost majoritních vrcholů M1 a S1 ( $\beta$ -alanyl-L-tyrozin), chromatogramy na Obrázcích 30 a 32 se v přítomnosti dalších vrcholů signifikantně liší. Z Obrázku 31 je patrné, že frakce M7-M19 obsahují peptidy nebo menší proteiny s molekulovou hmotností ( $M_r$ ) mezi 3-15 kDa. Naopak, mezi frakcemi S3-S9 jsme našli proteiny s vyšší molekulovou hmotností (15-75 kDa). To znamená, že okyselený methanol nesráží z hemolymfy menší proteiny a že srážení síranem amonným (nasyčení do 70%) umožní větší proteiny detekovat v supernatantu. Oba srážecí protokoly se tudíž doplňují a umožňují detekovat různé proteiny a peptidy.

Ve frakcích M1 a S1 jsme identifikovali dipeptid  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin. Jeho struktura byla potvrzena MS/MS,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR a L-forma tyrozinu byla prokázána pomocí kapilární elektroforézy s chirálními selektory. Tato látka byla již v minulosti nalezena v masařce *Sarcophaga bullata* Levenbookem a kol. [85] a Meylaersovou a kol. [4]. Porovnáním specifických rotací se syntetickým dipeptidem Levenbook a kol. také navrhli, že tyrozin je přítomný v L-formě. U  $\beta$ -alanyl-tyrozinu je známo, že způsobuje paralýzu u dospělého hmyzu, ale není toxický pro larvy, u nichž se jeho koncentrace signifikantně mění v průběhu vývoje a dosahuje nejvyšší úrovně (20 mM) před puparizací (kuklení) [86,145]. Úloha tohoto dipeptidu při melanizaci a puparizaci larev je vysoce pravděpodobná [85,146] a je v souladu s našim zjištěním, že fenoloxidáza a  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin jsou nejvíce abundantní složky hemolymfy larev masařky *Sarcophaga bullata* ve třetím instaru v období tzv. toulavého chování.

Meylaersová a kol. [4] detekovali u  $\beta$ -alanyl-tyrozinu antimikrobiální aktivitu proti různým bakteriím v rozmezí 8-30 mM. Také připravili několik neaktivních analogů této látky. V naší studii jsme zjistili, že  $\beta$ -alanyl-L-tyrozin je mírně aktivnější (s rozmezím MIC 6-15 mM) než zjistila Meylaersová a kol. [4]. Příčina tohoto rozdílu v MIC může být v citlivostech použitých mikroorganismů nebo ve vysoké tendenci tohoto dipeptidu vlnout. Z tohoto důvodu jsme určovali koncentraci dipeptidu a jeho analogů pomocí absorpce tyrozinu (viz. Metody). Kapilární elektroforézou byla ve frakci M1 zjištěna příměs, která byla posléze identifikována jako  $\beta$ -alanyl-L-tyrozyl- $\beta$ -D-fruktopyranóza. V našich experimentech jsme nedetekovali žádnou antimikrobiální aktivitu této látky, ani

izolované (M1b) ani syntetické. Obě látky byly testovány pouze do koncentrace 5 mM (2,25 mg/ml). Abychom mohli testovat  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózu ve vyšších koncentracích bylo by nezbytné izolovat jí větší množství, což by bylo značně obtížné z důvodu velmi podobných elučních vlastností frakcí M1a ( $\beta$ -alanyl-L-tyrozin) a M1b ( $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranóza) (Obrázek 36). Stejně obtížná byla separace syntetické  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózy z reakční směsi, neboť reakce probíhala pouze do koncentrační rovnováhy přibližně 1:1 ( $\beta$ -alanyl-L-tyrozin : produkt). Nicméně naprostá absence inhibiční schopnosti  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózy při 5 mM koncentraci nenaznačuje, že by byla při vyšších koncentracích látka antimikrobiálně aktivní a může tak vysvětlit menší schopnost frakce M1 (obsahující také  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranózu) inhibovat růst bakterií v porovnání se syntetickým  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinem.

V případě dalších analogů  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu, jsme pozorovali mírně negativní efekt *N*-acetylace a vysoce negativní vliv *C*-terminální amidace.  $\beta$ -Alanyl-L-tyrozin vykazoval vyšší antimikrobiální aktivitu než  $\beta$ -alanyl-D-tyrozin. Souhlasíme s Meylaersovou a kol. [4], že relativně slabá antimikrobiální aktivita  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu (v milimolárních koncentracích) může být v souladu s vysokou koncentrací tohoto dipeptidu v hemolymfě larev (podle Levenbooka a kol. až 20 mM [85]).  $\beta$ -Alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranóza může být produkt reakce velmi abundantního  $\beta$ -alanyl-L-tyrozinu s D-glukózou, která je jistě přítomná v hovězích játrech na kterých jsou larvy chovány. Obě látky spolu ochotně reagují Amadoriho přesmykem [124]. Je také možné, že  $\beta$ -alanyl-L-tyrozylo- $\beta$ -D-fruktopyranóza má jiný antimikrobiální účinek nebo plní jinou obranou úlohu proti mikroorganismům než bylo námi testováno.

Mezi všemi izolovanými frakcemi, pouze frakce M13-M15 a frakce S4 a S7 vykazovaly signifikantní antimikrobiální aktivitu. Určení MIC pro všechny testované frakce vůči testovaným mikroorganismům bylo nemožné z důvodu obtížnosti izolace dostatečného množství materiálu.

Proteiny ve frakcích S4 a S7 inhibovaly růst G-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* více než růst G-negativní bakterie *Escherichia coli* (Obrázek 35). Z dostupných dat můžeme říct, že MIC frakce S4 proti bakterii *Staphylococcus aureus* je mezi 80 a 115  $\mu$ g/ml. Aktivní protein ve frakci se nám podařilo částečně charakterizovat. *N*-Koncová 50-ti aminokyselinová sekvence tohoto 16-kDa proteinu vykazuje asi 50% sekvenční



podobnost s “odorant-binding“ proteinem 99b (OBP99b, *CG7592-PA*) identifikovaným u octomilky *Drosophila melanogaster*. Je pravděpodobné, že protein S4 z masařky *Sarcophaga bullata* je homolog proteinu OBP99b z *Drosophily*. Rozdíly v *N*-koncové sekvenci mohou být způsobeny nízkou podobností mezi proteiny z *Drosophily* a masařky *Sarcophaga bullata*. OBP proteiny jsou velmi hojně se vyskytující, jsou to malé rozpustné proteiny u nichž se předpokládá, že se účastní rozpoznávání vůní a to buď usnadněním nebo omezením přístupu odorantu k receptoru. *Drosophila* má 51 genů kódujících OBP [147]. Nenašli jsme žádnou publikaci ani zprávu popisující antimikrobiální aktivitu “odorant-binding” proteinů. Levyová a kol. [103] publikovala, že exprese OBP99c u *Drosophily* byla specificky indukována po fungální infekci, ale naopak potlačena po bakteriální infekci. V naší studii jsme nezaznamenali žádnou signifikantní indukci proteinu S4 po bakteriální indukci larev. Chromatogramy z indukovaných a neindukovaných larev byly shodné (Obrázek 32). Do budoucna by bylo zajímavé produkovat větší množství rekombinantního OBP99b a studovat jeho antimikrobiální aktivitu a mechanismus působení detailněji použitím různých metod a mikroorganismů.

*N*-Koncovou sekvenací a MS analýzou tryptických štěpů byl ve frakci S7 identifikován protein transferin. O transferinu je známo, že se účastní imunitní odpovědi u obratlovců i bezobratlých [148,149]. Transferin může inhibovat růst bakterií skrze redukci hladin volného železa v prostředí [150].

Jestliže uvážíme, že obě frakce S4 (pravděpodobně masařky OBP99b *Sarcophaga bullata*) a S7 (transferin) jsou čisté proteiny, o  $M_r$  16 a 70 kDa, potom inhibice bakteriálního růstu tak jak je znázorněna na Obrázku 35 byla dosažena při nízkých mikromolárních koncentracích. Jedná se tedy o velmi potentní antimikrobiální účinek.

Frakce M13 inhibovala růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, ale neinhibovala růst bakterie *Escherichia coli*. Zdá se, že frakce M13 má baktericidní účinek vůči *Pseudomonas aeruginosa* s MIC pod 1 mg/ml (Obrázek 34A). Důkaz různé citlivosti bakteriálních druhů vůči určitým peptidům není příliš jasný [31]. Rozdílná citlivost bakterií k antimikrobiálním peptidům může být podle jedné hypotézy způsobena různým složením lipopolysacharidů ve vnější membráně bakterií nebo různými mechanismy rezistence bakterií [56]. Bohužel se nám nepodařilo identifikovat peptid ve frakci M13 ani *N*-koncovou sekvenací ani pomocí MS analýz tryptických nebo chymotryptických štěpů. Identifikaci komplikovalo malé množství izolovaného materiálu.

Pomocí *N*-koncové sekvenace jsme určili celou aminokyselinovou sekvenci (40 aminokyselin) frakce M15. Naproti tomu u frakce M14 se nám podařilo určit pouze

deset *N*-koncových aminokyselin. Jestliže budeme předpokládat, že pozice X představují cysteiny (Tabulka 9), sekvence peptidu M15 je téměř identická se sekvencí sapecinu masařky *Sarcophaga peregrina*. Jediná rozdílná aminokyselina je v pozici 34 (glycin u masařky *Sarcophaga bullata* a alanin u sapecinu masařky *Sarcophaga peregrina*). Zcela shodná je sekvence peptidu M15 se sekvencí defensinu mouchy *Phormia terraenovae*. Předpokládáme, že aktivní peptidy ve frakcích M14 a M15 z hemolymfy masařky *Sarcophaga bullata* jsou homology antimikrobiálního peptidu sapecinu masařky *Sarcophaga peregrina* a analogy defensinu mouchy *Phormia terraenovae*. Sapecin, složený ze čtyřiceti aminokyselin, se řadí mezi hmyzí defensiny a je schopný inhibovat růst Gram-pozitivních bakterií. Sapecin je prvním identifikovaným defensinem u masařky *Sarcophaga peregrina* a byl izolován z embryonální buněčné linie *Sarcophaga peregrina* NIH-Sape-4 Matsuyamou a Natorim [78]. Obě frakce M14 a M15 inhibovaly růst Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, což je ve shodě s daty publikovanými Yamadou a Natorim [81]. Peptid ve frakci M14 je méně antimikrobiálně aktivní než peptid M15 (Obrázek 34B). ESI-MS/MS analýzou (Tabulka 8) byla ve frakci M14 zjištěna přítomnost peptidu s nižší molekulovou hmotností (3754) než byla naměřena u peptidu M15 (4060). Předpokládáme, že peptid ve frakci M14 je spíše *N*-koncový fragment sapecinu z frakce M15 než jiný typ sapecinu (např. sapecin C [81]).

Mezi frakcemi M1-M19, získanými po srážení okyseleným methanolem, jsme detekovali indukci frakcí M13-M15 (Obrázek 30). Nicméně jsem nedetekovali žádnou indukci mezi frakcemi S1-S9 získanými po srážení hemolymfy síranem amonným (Obrázek 32). Důvody absence indukce antimikrobiálně aktivních frakcí S4 a S7 mohou být různé. Buď tyto proteiny jsou v hemolymfě přítomné konstitutivně a nepodléhají indukci nebo jsou jejich koncentrace i po indukci tak malé, že použité izolační postupy nezaznamenají navýšení koncentrace.

Z výše uvedených důvodů jsme se v druhé části této studie rozhodli zkoumat pomocí RT-qPCR transkripční kinetiku a úroveň indukce osmi vybraných genů masařky *Sarcophaga bullata* po infikování larev třemi různými bakteriemi (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) a po mechanickém poranění sterilním entomologickým špendlíkem. Studovali jsme expresi mRNA příslušných genů v celém těle, v tukovém tělese a hemocytech larev masařky *Sarcophaga bullata*. Bylo vybráno osm genů, pro které byly k dispozici cDNA sekvence z masařky *Sarcophaga bullata*. Rozhodli jsme se studovat expresi mRNA genů kódujících sapecin, transferin,

profenoloxidasu 1 a 2 (PPO1 a PPO2). Tyto látky jsme v první části studie zkoumali na proteinové úrovni. Dále jsme vybrali geny kódující „storage-binding protein“ (SBP), kathepsin L, sarcocystatin a 26/29 kDa proteázu.

Jak již bylo zmíněno výše, transferin je protein zapojený do imunitní odpovědi obratlovců i bezobratlých [148]. Jeho indukce po infekci byla zaznamenána jak u termitů [150] tak u *Drosophily* [87]. V první části naší studie jsme ovšem nepozorovali indukci tohoto proteinu po imunizaci. Naproti tomu jsme v první části této práce pozorovali signifikantní indukci peptidu sapecinu. V této části práce jsme se rozhodli poznatky doplnit o indukované změny exprese mRNA transferinu i sapecinu.

V první části této studie jsme detekovali velmi vysoké koncentrace PPO v hemolymfě jak infikovaných tak kontrolních larev. Nebylo jasné zda dochází k indukci proteinu či ne. Z tohoto důvodu jsme zařadili geny PPO1 a 2 mezi studované pomocí RT-qPCR.

V tomto odstavci vysvětlíme výběr zbývajících čtyř genů vybraných pro RT-qPCR studii. SBP či také „arylphorin-binding protein“ se účastní selektivního přesunu proteinu arylphorinu z hemolymfy do tukového tělesa. Arylphorin je tzv. zásobní protein s vysokým obsahem aromatických kyselin a je využíván larvami jako zdroj energie a aminokyselin během larvální metamorfózy [128] a mohl by se účastnit obranné reakce larev. Kathepsin L je lysozomální enzym potenciálně zapojený do degradace fagocytovaných mikroorganismů [87]. Sarcocystatin je inhibitor cysteinových proteáz a byl identifikován v hemolymfě larev masařky *Sarcophaga peregrina* [151]. 26/29 kDa Proteáza je sekretována z hemocytů do hemolymfy po injekci larev masařky *Sarcophaga peregrina* cizorodými buňkami [152]. Proteázy, jejich inhibitory či SBP jsou tudíž z výše uvedených důvodů velmi zajímavými subjekty pro studium jejich role v imunitní odpovědi larev masařky.

U žádného ze studovaných genů jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v profilech exprese v závislosti na indukci Gram-negativní bakterií (*E. coli* a *P. aeruginosa*) nebo Gram-pozitivní bakterií (*S. aureus*) v celém těle. Úroveň imunitní odpovědi larev a dospělého hmyzu vůči různým druhům bakterií může být ovlivněna rozdílnou patogenitou individuální bakteriálních kmenů a druhů [153]. Irving a kol. [99] ve své studii došli k závěru, že Gram-pozitivní infekce má podobný účinek jako G-negativní infekce na imunitní odpověď dospělých mušek *Drosophila*. V našich pokusech byla exprese analyzovaných genů rovněž ovlivněna stejně bakteriální infekcí tak mechanickým poraněním těla larvy sterilním špendlíkem. Lemaitre a kol. [154] také pozorovali

podobnou úroveň exprese antimikrobiálních peptidů diptericinu, attacinu, cecropinu A a drosocinu u dospělých octomilek *Drosophila* po sterilním poranění nebo po indukci Gram-pozitivní bakterií *Micrococcus luteus*. Domníváme se, že hlavní důvod podobné exprese genů po imunitní indukci s různými bakteriemi a sterilním poraněním v našich experimentech je ve faktu, že studie probíhala s larvami masačky *S. bullata* a ne s dospělými masačkami. Ve většině studií se vědci zaměřují na systémovou imunitní odpověď u dospělých much (zejména *Drosophila*). Nicméně, v průběhu svého vývoje, mouchy procházejí několika larválními stádii, která žijí ve vysoce infekčním prostředí, jako je např. rozkládající se organický materiál. Dospělé mouchy jsou takovému prostředí vystaveny méně. Ačkoliv systémová imunitní odpověď probíhá také u larev, existují zde specifické rysy, které neexistují u dospělců. Můžeme zde jmenovat tukové těleso, které je jiné u larev a dospělců, dále hormonální kontrolu exprese genů antimikrobiálních peptidů, která se liší u různých stádií vývoje larev (larvy musí být přesně v určitém stádiu, abychom se vyhnuli vzniku artefaktů) a konečně hemocyty, které jsou početněji zastoupeny u larev než u dospělců. Právě proto hraje buněčná imunitní odpověď důležitější obrannou roli u larev než u dospělých much [155]. Dále bylo prokázáno, že larvy octomilky *Drosophila* ve stadiu třetího instaru, v období tzv. toulavého chování, jsou vysoce citlivé vůči septickému poranění. Důvodem je 20-hydroxyekdyson, který reguluje genomickou odpověď [156-159]. Všechna tato specifika muších larev, při porovnání s dospělými mouchami, mohou způsobovat vysokou citlivost larev vůči sterilnímu poranění nebo shodnou odpověď na indukci Gram-pozitivní nebo Gram-negativní bakterií.

Transferin je abundantní protein v hmyzí hemolymfě a obecně se předpokládá, že je produkován tukovým tělesem. Nicméně, u transferinu je známo, že je také exprimován v jiných buňkách, jako např. v neuronálních buňkách včely medonosné *Apis mellifera* [160]. V naší studii jsme pozorovali asi 50-krát zvýšenou expresi transferinu 22 hodin po bakteriální infekci nebo po poranění v celém těle larev, a 35-krát zvýšení v tukovém tělese. Indukci genu transferinu jsme detekovali také v hemocytech larev, kde byla exprese zvýšená 11-krát. Naše výsledky jsou ve shodě s poznatky jiných skupin, které pracovaly s octomilkou *Drosophila* jejíž transferin vykazuje vysokou identitu aminokyselinové sekvence s transferiny dvoukřídlých (sekvenční identita s transferinem masačky *Sarcophaga peregrina* je asi 63,5%). Yoshiga a kol. [148] demonstrovali, že když byla dospělá muška *Drosophila* inokulována bakteriemi (*E. coli*), syntéza mRNA transferinu byla znatelně zvýšena vzhledem ke kontrolním muškám a to jak u indukce sterilní jehlou tak i bakteriemi. Účinek byl monitorován Northern blot analýzou 6, 12 a 24 hodin

po indukci. Analýzou imunitní odpovědi octomilky *Drosophila* na úrovni celého genomu použitím oligonukleotidových mikročipů byla detektována 11-ti násobná indukce transferinu po infekčním poranění [87]. Kvantitativní PCR potvrdilo signifikantní nárůst exprese termitého transferinu při infekci, což svědčí o tom, že indukce transferinu je součástí imunitní obrany. Tyto výsledky ukazovaly na 2,5-3,5 násobné zvýšení hladiny exprese termitého transferinu 84 hodin po fungální infekci [161]. Protože zvýšení exprese bylo nejvyšší v celém těle larev, naše výsledky naznačují, že transferin je aktivněji exprimován v dalších orgánech než jen tukovém tělese. Bohužel jsme neidentifikovali orgán, který by mohl exprimovat transferin aktivněji než tukové těleso. V první části studie jsme nepozorovali při izolaci transferinu z hemolymfy žádné zvýšení koncentrace transferinu v hemolymfě larev po indukci imunitní odpovědi. Tento výsledek je kontroverzní s výsledkem RT-qPCR, kde jsme zjistili masivní indukci mRNA transferinu. Důvodem této nesrovnalosti může být relativně vysoká bazální hladina transferinu v porovnání s ostatními antimikrobiálními proteiny (např. sapecin, viz. níže) nebo možné poškození proteinu v průběhu purifikačního procesu.

Mezi všemi osmi studovanými geny jsme největší indukci pozorovali u genu sapecinu (zástupce defensinové rodiny antimikrobiálních peptidů). Nejvyšší indukci exprese sapecinu jsme detekovali v celém těle larvy masařky *Sarcophaga bullata*. Naše současné výsledky naznačují, že sapecin může být exprimován nejen v tukovém tělese a hemocytech ale také v jiných tkáních larvy masařky (Obrázky 39-41). Na rozdíl od dospělců octomilky *Drosophila* kde jsou defensiny syntetizovány především v tukovém tělese a poté jsou sekretovány do hemolymfy [15]. U dospělé mouchy *Drosophila* jsou antimikrobiální peptidy exprimovány v několika epiteliích, které jsou potencionálně v kontaktu s vnějším prostředím. Mezi tato epitelia řadíme respirační ústrojí, oblast úst, zažívací trakt, malpigické trubice a samčí i samičí pohlavní ústrojí. Expese defensinů larev *Drosophila* může být rovněž indukována v oblasti úst [90]. Matsuyama a kol. [77] zkoumali expresi genu kódujícího prekurzor sapecinu u masařky *Sarcophaga peregrina* 6 hodin po poškození obalu těla Northern blot analýzou. Jejich výsledky ukazují, že hemocyty a stejně tak tukové těleso jsou zodpovědné za syntézu sapecinu a jeho sekreci do hemolymfy. Nejvyšší hladinu exprese sapecinu jsme detekovali po 12-ti hodinách v celém těle larvy, ale v hemocytech už po 6-ti hodinách a v tukovém tělese jsme byli schopni detekovat nejvyšší hladinu exprese až po 22-ti hodinách. Tyto rozdíly mohou být zapříčiněny odlišnými cestami aktivace exprese sapecinu v různých tkáních. Za pomoci Northern blot a RT-qPCR analýz bylo zjištěno, že gen defensinu octomilky *Drosophila*

může být indukován různými mikroorganismy a stejně tak pouhým poraněním [154,162]. Časový transkripční profil defensinu byl sledován 0-48 hodin po inokulaci dvou různých bakterií mouše domácí *Musca domestica*. Indukční model genu defensinu u mouchy domácí *Musca domestica* byl podobný tomu, který byl pozorován u octomilky *Drosophila*, avšak nebyl úplně stejný [163]. Transkripce genu defensinu dosahovala nejvyšší hladiny po 3 hodinách u octomilky *Drosophila* a až po 36-48 hodinách u mouchy domácí *Musca domestica*. Naše výsledky poukazují, že lokalizace a načasování exprese sapecinu se může zásadně lišit v závislosti na studovaném organismu, dospělci či larvě.

Exprese genů kódujících profenoloxidázu (PPO) 1 a 2 u masačky *Sarcophaga bullata* byla mírně snížena nebo zůstala nezměněna. Stabilní hladina mRNA všech tří genů profenoloxidáz byla také zaznamenána mikročipovou analýzou imunizovaných dospělých mušek *Drosophila* [87], a rovněž i u hemocytů *Drosophily* [17]. U hmyzu fenoloxidáza zprostředkovává syntézu melaninu, který je důležitou součástí imunitní obrany [22]. Zralé krystalové buňky exprimují PPO a v krystalické formě skladují velké množství PPO v cytoplazmě. Neaktivní prekurzor PPO je pak proteolyticky aktivován kaskádou serinových proteáz, což kontroluje množství aktivní fenoloxidázy v hemolymfě [13]. Naše výsledky naznačují, že nová exprese PPO1 a PPO 2 není nezbytná pro akutní imunitní odpověď v larvách masačky *Sarcophaga bullata*.

Bylo zjištěno, že hladina mRNA genu SBP se několikrát zvyšuje v průběhu puparizace. V naší studii jsme zjistili, že larvy ve stádiu třetího instaru mají mírně sníženou expresi genu SBP po indukci imunitní odpovědi. Je možné, že efektivní obrana proti infekci, která zahrnuje syntézu transkriptů velkého počtu genů, vyžaduje potlačení postradatelných metabolických drah, což se může týkat i exprese genu SBP.

V našich pokusech jsme zaznamenali pokles exprese kathepsinu L v celém těle larev a tento pokles byl ještě výraznější v tukových těliscích. Tento výsledek je v rozporu se zjištěními De Gregoria a kol. [87], kteří pozorovali indukci exprese genu kódujícího kathepsin L u dospělých mušek *Drosophila* imunizovaných infekčním poraněním. Kathepsin L je lysozomální cysteinová proteáza, která se pravděpodobně může účastnit fagocytózy mikroorganismů [87,164]. Liu a kol. [165] zaznamenali vyšší expresi genu kathepsinu L u larev motýla *Helicoverpa armigera* v průběhu svlékání kutikuly. Philip a kol. [166] nedávno publikovali charakterizaci proteázy podobné kathepsinu L z masačky *Sarcophaga peregrina*, tato proteáza která se podílí na diferenciaci imaginalních disků. Je velmi pravděpodobné, že proteázy podobné kathepsinu L hrají určitou roli ve vývoji muší

larvy a že k potlačení exprese příslušného genu dochází naopak v průběhu bakteriální infekce.

Při našich pokusech zůstala hladina mRNA 26/29 kDa proteázy téměř nezměněna po indukci imunitní odpovědi. U této proteázy bylo prokázáno, že je sekretována hemocyty do hemolymfy po injekci larev masařky *Sarcophaga peregrina* cizorodým proteinem nebo buňkami [83,84]. Saito a kol. [83] předpověděli, že syntéza nové mRNA a tudíž i syntéza tohoto proteinu není nutná pro sekreci 26/29 kDa proteázy. Přímá interakce mezi hemocyty a cizorodou substancí pravděpodobně spouští uvolnění této proteázy ze zásobních forem [83]. Naše data nepodpořila tato zjištění a spíše následují trend, který jsme pozorovali u genu kathepsinu L. Objasnění přesné funkce proteáz podobných kathepsinu L v imunitní odpovědi larev masařek je stále úkolem do budoucna.

V naší studii jsme pozorovali snížení hladiny exprese genu kódujícího sarcocystatin v celém těle a v tukovém tělese, exprese genu nebyla ale signifikantně ovlivněna indukcí v hemocytech. Sarcocystatin je nízkomolekulární inhibitor cysteinových proteáz a byl objeven v hemolymfě larev masařky *Sarcophaga peregrina* [151]. Autoři ukázali, že hladina sarcocystatinu postupně stoupá ve stádiu třetího instaru larev a že tento růst pokračuje i po puparizaci. V hemocytech sarcocystatin selektivně inhibuje aktivitu cysteinových proteáz, které rozrušují většinu larválních tkání v průběhu metamorfózy. Sarcocystatin tudíž chrání tvořící se tkáň dospělců v pupáriu před atakem cysteinových proteáz [152]. Sarcocystatin může také ovlivňovat aktivitu cysteinových proteáz účastnících se degradace cizorodých proteinů. V naší studii jsme pozorovali snížení exprese kathepsinu L (viz. výše). Není vyloučeno, že exprese inhibitorů cysteinových proteáz, mezi něž patří i sarcocystatin, je úzce spjata s expresí cílené proteázy a že exprese inhibitorů také sleduje stejný trend exprese i po bakteriální infekci.

Poslední část studie imunitní odpovědi larev masařky *Sarcophaga bullata* se věnovala analýze změn proteomu hemocytů a buněk tukového tělesa v různých časech po indukci bakteriemi *E.coli*. Cílem bylo detekovat a případně identifikovat proteiny u nichž se mění (zvyšuje či snižuje) jejich exprese po indukci imunitní odpovědi v larvách masařky. Celkově se nám podařilo identifikovat z 2D-gelů proteomu masařky *Sarcophaga bullata* 50 proteinů. 34 proteinů bylo identifikováno z hemocytů a 16 proteinů z tukových těles. Identifikaci 50 proteinů považujeme za velký úspěch, neboť většina z nich byla identifikována na základě podobnosti s proteiny z jiných organismů, nejčastěji z octomilky *Drosophila melanogaster* popřípadě z bakterií. To je dáno skutečností, že například NCBI

databáze obsahuje 86188 proteinových sekvencí z octomilky *Drosophila melanogaster*, ale jen 43 z masařky *Sarcophaga bullata* či 93 z masařky *Sarcophaga peregrina*.

V této studii jsme v hemocytech detekovali 9 proteinů se signifikantní změnou exprese, přičemž 6 z nich bylo identifikováno. V tukových tělesech jsme zaznamenali 15 proteinů se signifikantní změnou exprese a 3 z těchto proteinů se nám podařilo identifikovat. V dalším textu budeme diskutovat pouze ty signifikantně pozměněné proteiny, které se podařilo identifikovat.

V hemocytech larev masařky *Sarcophaga bullata* došlo 6 hodin po indukci ke zvýšení exprese homologu Cofilin/aktin-depolymerujícího faktoru, tzv. Twinstar proteinu (proteinová skvrna 14). Dvanáctinásobné zvýšení exprese bylo zaznamenáno 22 hodin po indukci. Twinstar protein řadíme mezi proteiny, které váží aktin a napomáhají organizaci a polymerizaci aktinových filament. Bylo pozorováno, že mutace Twinstar proteinu u octomilky *Drosophila* měla za následek defekty v migraci centrosomu a cytokinezi a způsobovala úmrtnost v larválním stádiu [133]. Zvyšování exprese tohoto proteinu s narůstajícím časem po indukci je pravděpodobně způsobeno větší mitotickou aktivitou hemocytů jejichž množství se při imunitní odpovědi larev zvyšuje.

Expresa proteinu RH43809p (proteinová skvrna 15) také v hemocytech narůstala s časem po indukci. U tohoto proteinu je známo, že se pravděpodobně účastní procesu pohlcení cizorodých látek a fagocytózy. Bohužel, tato informace pochází z databáze Expasy, kde není podložena žádnou citací.

Stejný trend u nárůstu exprese s časem vykazoval v hemocytech 40S ribozomální protein S15Aa (proteinová skvrna 25). Tento protein patří do rodiny ribozomálních proteinů, které se podílejí na elongaci proteinů při jejich syntéze [126]. Je velmi pravděpodobné, že při vyšší syntetické aktivitě hemocytů, které po indukci produkují nové antimikrobiální proteiny a peptidy, musí docházet také ke zvýšení exprese tohoto proteinu.

Prekurzor lektinové podjednotky alfa byl identifikován v proteinové skvrně číslo 28. Tento protein byl v hemocytech maximálně dvakrát zvýšený 6 hodin po indukci. Naše výsledky jsou ve shodě se zjištěním Takahashiho a kol. [137], kteří prokázali indukci lektinu po poranění stěny larev masařky *Sarcophaga peregrina*. Tento lektin váže galaktózu v bakteriální stěně a hraje významnou roli v imunitní obraně larev proti mikroorganismům.

Hormon senzitivní lipáza (proteinová skvrna 33) byla v hemocytech zvýšena sedmkrát již ½ hodiny po indukci a 17-krát po 6-ti hodinách, ale po 22-ti hodinách již nebyla na gelu detekovatelná. V myši tento enzym (EC 3.1.1.79) limituje rychlost



hydrolýzy triacylglycerolu (TAG) v tukové tkáni a také esterů cholesterolu v tkáních ovlivněných steroidy a v makrofázích [138]. Již bylo zmíněno, že imunitní odpověď larev je pod kontrolou hormonu ekdysonu [157,157]. Hemocyty larev potřebují fagocytované mikroorganismy degradovat a to nejen pomocí proteáz, ale také lipáz.

U proteinové skvrny z hemocytů číslo 34, která byla identifikována jako podjednotka alfa T-komplexu, byla zjištěna snížená exprese s narůstajícím časem po indukci. Tato podjednotka T-komplexu je molekulární chaperon, který napomáhá formování 3D struktury proteinů při současné hydrolýze ATP. V *in vitro* podmínkách napomáhá zbalování na aktinu a tubulinu [126]. Pravděpodobně při zvýšené syntéze obranných molekul (např. antimikrobiálních peptidů) musí být některé buněčné funkce utlumeny.

Poslední tři diskutované proteiny byly detekovány v buňkách tukového tělesa. Výrazné snížení exprese 5'-nukleotidázy (proteinová skvrna 68) v buňkách tukového tělesa ½ hodiny po indukci a mírné zvýšení 6 hodin po indukci má možná souvislost se fosfatázovou aktivitou tohoto proteinu specificky zaměřenou na nukleosid 5'-monofosfáty [142]. Je známo, že například cyklický AMP (adenosin monofosfát) je druhým poslem v signalizačních kaskádách. Tento protein by mohl kontrolovat signalizační kaskády jejímž cílem je aktivace antimikrobiální obrany v těle larvy.

Postupné mírné zvyšování 40S ribozomálního proteinu S3 v buňkách tukových těles (proteinová skvrna 64) může být v důsledku potřeby zvýšené syntézy DNA a k tomu také nutné opravné aktivity, kterou zprostředkovává. Tento protein efektivně vyštěpuje DNA, která obsahuje 8-oxoguanin [167].

Posledním identifikovaným proteinem jehož exprese je v tukových tělesech ovlivněna indukcí je 26S regulační podjednotka 14 proteazomu (bez ATPázové aktivity). Exprese tohoto proteinu byla ½ hodiny po indukci zhruba dvakrát zvýšená, ale již po 6 hodinách byla dvakrát snížena. Po 22 hodinách byla exprese tohoto proteinu inhibovaná v indukovaných larvách dokonce šestkrát. Tento protein slouží jako regulační podjednotka 26S proteazomu, který se podílí na ATP-závislé degradaci proteinů modifikovaných ubiquitinem [126]. V průběhu imunitní odpovědi larvy jsou možná tyto degradační pochody utlumeny ve prospěch jiných syntetických procesů.

## 6. Shrnutí

Imunitní odpověď hmyzu je komplikovaný proces. Antimikrobiální peptidy často působí synergicky, některé proteiny mají transportní funkci a peptidové inhibitory mohou blokovat proteolytické štěpení enzymů účastnících se aktivačních kaskád nebo jiných enzymů, které mohou poté aktivovat antimikrobiálně aktivní proteiny a peptidy. V naší studii jsme prezentovali dva různé izolační protokoly, které vyústily k identifikaci a charakterizaci několika jak známých tak nových antimikrobiálních proteinů nebo peptidů z hemolymfy larev masařky *Sarcophaga bullata*.

Dále jsme se pokusili monitorovat časovou a tkáňově specifickou expresi osmi vybraných genů masařky *Sarcophaga bullata* po vystavení larev různým druhům indukce imunitní odpovědi. Ukázali jsme podobnosti ale také rozdíly v imunitní odpovědi mezi jednotlivými druhy hmyzu a jejich vývojovými stádii (larvy či dospělci). Rovněž jsme analyzovali expresi genů proteinů SBP a sarcocystatinu, které jsou spojovány hlavně s vývojem a metamorfózou larev.

Pomocí 2D-elektroforéz a MS analýz jsme analyzovali časovou závislost imunitní odpovědi na úrovni exprese celkových proteinů v tukovém tělesu a hemocytech larev masařky. Detekovali jsme proteiny indukované, ale také proteiny jejichž exprese je při imunitní odpovědi potlačena.

Věříme, že tato naše studie pomůže více osvětlit komplikovaný proces imunitní odpovědi larev masařky *Sarcophaga bullata*.

## LITERATURA

1. Teuber M: **Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 1999, **56**: 755-763.
2. Spížek J: **Rezistence na antibiotika.** *Vesmír* 1999, **78**: 27-32.
3. Tan YT, Tillett DJ, McKay IA: **Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria.** *Molecular Medicine Today* 2000, **6**: 309-314.
4. Meylaers K, Cerstiaens A, Vierstraete E, Baggerman G, Michiels CW, De Loof A *et al.*: **Antimicrobial compounds of low molecular mass are constitutively present in insects: Characterisation of beta-alanyl-tyrosine.** *Current Pharmaceutical Design* 2003, **9**: 159-174.
5. Mcphee JB, Hancock REW: **Function and therapeutic potential of host defence peptides.** *Journal of Peptide Science* 2005, **11**: 677-687.
6. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM: **A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs.** *Curr Eye Res* 2005, **30**: 505-515.
7. Otvos L: **Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets.** *Journal of Peptide Science* 2005, **11**: 697-706.
8. Dimarcq JL, Hunneyball I: **Pharma-entomology: when bugs become drugs.** *Drug Discovery Today* 2003, **8**: 107-110.
9. Otvos L: **Antibacterial peptides isolated from insects.** *Journal of Peptide Science* 2000, **6**: 497-511.
10. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA: **Phylogenetic perspectives in innate immunity.** *Science* 1999, **284**: 1313-1318.
11. Iwanaga S, Lee BL: **Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals.** *J Biochem Mol Biol* 2005, **38**: 128-150.
12. Hoffmann JA, Reichhart JM: **Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective.** *Nature Immunology* 2002, **3**: 121-126.
13. Lemaitre B, Hoffmann J: **The host defense of Drosophila melanogaster.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**: 697-743.
14. Vilmos P, Kurucz E: **Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system.** *Immunology Letters* 1998, **62**: 59-66.
15. Leclerc V, Reichhart JM: **The immune response of Drosophila melanogaster.** *Immunol Rev* 2004, **198**: 59-71.

16. Royet J: **Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models.** *Mol Immunol* 2004, **41**: 1063-1075.
17. Johansson KC, Metzendorf C, Soderhall K: **Microarray analysis of immune challenged *Drosophila* hemocytes.** *Exp Cell Res* 2005, **305**: 145-155.
18. Karlsson C, Korayem AM, Scherfer C, Loseva O, Dushay MS, Theopold U: **Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 52033-52041.
19. Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, Matsuura S, Ashida M: **Molecular-Cloning of Insect Pro-Phenol Oxidase - A Copper-Containing Protein Homologous to Arthropod Hemocyanin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**: 7774-7778.
20. Hall M, Scott T, Sugumaran M, Soderhall K, Law JH: **Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 7764-7768.
21. Rizki TM, Rizki RM, Bellotti RA: **Genetics of a *Drosophila* phenoloxidase.** *Mol Gen Genet* 1985, **201**: 7-13.
22. Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M: **Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2000, **30**: 953-967.
23. Lourenco AP, Zufelato MS, Bitondi MM, Simoes ZL: **Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2005, **35**: 541-552.
24. Sugumaran M: **Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects.** *Pigment Cell Res* 2002, **15**: 2-9.
25. Beck G, Cardinale S, Wang L, Reiner M, Sugumaran M: **Characterization of a defense complex consisting of interleukin 1 and phenol oxidase from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 11035-11038.
26. Ashida M, Brey PT: **Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 10698-10702.
27. Leclerc V, Pelte N, Chamy LE, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA *et al.*: **Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*.** *EMBO Rep* 2006, **7**: 231-235.
28. Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H: **Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**: 952-959.

29. Vizioli J, Salzet M: **Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates.** *Trends in Pharmacological Sciences* 2002, **23**: 494-496.
30. Hancock REW: **Peptide antibiotics.** *Lancet* 1997, **349**: 418-422.
31. Zasloff M: **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature* 2002, **415**: 389-395.
32. Goumon Y, Lugardon K, Gadroy P, Strub JM, Welters ID, Stefano GB *et al.*: **Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 38355-38362.
33. Salzet M: **Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses.** *Trends Immunol* 2001, **22**: 285-288.
34. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S: **Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 412-416.
35. Leem JY, Nishimura C, Kurata S, Shimada I, Kobayashi A, Natori S: **Purification and characterization of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of sarcophaga peregrina (flesh fly).** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**: 13573-13577.
36. Leem JY, Jeong IJ, Park KT, Park HY: **Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki*, S.** *FEBS Letters* 1999, **442**: 53-56.
37. Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachere E: **Crustacean immunity - Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**: 47070-47077.
38. Fogaca AC, da Silva PI, Miranda MTM, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PEM *et al.*: **Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*.** *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**: 25330-25334.
39. Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ: **Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts.** *Antiviral Res* 2001, **51**: 141-149.
40. Andreu D, Rivas L: **Animal antimicrobial peptides: an overview.** *Biopolymers* 1998, **47**: 415-433.
41. Bulet P, Stocklin R, Menin L: **Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.** *Immunol Rev* 2004, **198**: 169-184.
42. Tossi A. AMPs database. 2007. Ref Type: Internet Communication

43. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, BOMAN HG: **Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.** *Nature* 1981, **292**: 246-248.
44. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A: **Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides.** *Biopolymers* 2000, **55**: 4-30.
45. Fehlbauer P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L *et al.*: **Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**: 1221-1225.
46. Mangoni ML, Papo N, Mignogna G, Andreu D, Shai Y, Barra D *et al.*: **Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: Biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity.** *Biochemistry* 2003, **42**: 14023-14035.
47. Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J: **Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates.** *Biopolymers* 1998, **47**: 465-477.
48. Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P: **Innate immunity - Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**: 21808-21813.
49. Craik DJ, Daly NL, Mulvenna J, Plan MR, Trabi M: **Discovery, structure and biological activities of the cyclotides.** *Curr Protein Pept Sci* 2004, **5**: 297-315.
50. Hultmark D. Insect lysozymes. Jollés, P. 87-102. 1996. Switzerland, Birkhauser Verlag Basel. **Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology.** Ref Type: Serial (Book, Monograph)
51. Otvos L: **The short proline-rich antibacterial peptide family.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002, **59**: 1138-1150.
52. Carlsson A, Nystrom T, de CH, Bennich H: **Attacin--an insect immune protein--binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis.** *Microbiology* 1998, **144 (Pt 8)**: 2179-2188.
53. Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P: **Apidaecins - antibacterial peptides from honeybees.** *Embo Journal* 1989, **8**: 2387-2391.
54. Sitaram N, Subbalakshmi C, Nagaraj R: **Indolicidin, a 13-residue basic antimicrobial peptide rich in tryptophan and proline, interacts with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, **309**: 879-884.
55. Shai Y: **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1999, **1462**: 55-70.

56. Yeaman MR, Yount NY: **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** *Pharmacological Reviews* 2003, **55**: 27-55.
57. Saido-Sakanaka H, Ishibashi J, Momotani E, Amano F, Yamakawa M: **In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin.** *Peptides* 2004, **25**: 19-27.
58. Powers JPS, Hancock REW: **The relationship between peptide structure and antibacterial activity.** *Peptides* 2003, **24**: 1681-1691.
59. Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L: **Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*.** *J Biol Chem* 1993, **268**: 19239-19245.
60. Cudic M, Condie BA, Weiner DJ, Lysenko ES, Xiang ZQ, Insug O *et al.*: **Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates.** *Peptides* 2002, **23**: 2071-2083.
61. Otvos L, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S *et al.*: **Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides.** *Biochemistry* 2000, **39**: 14150-14159.
62. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L: **The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding.** *Biochemistry* 2001, **40**: 3016-3026.
63. Basak A, Ernst B, Brewer D, Seidah NG, Munzer JS, Lazure C *et al.*: **Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1.** *J Pept Res* 1997, **49**: 596-603.
64. Verbanac D, Zanetti M, Romeo D: **Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors.** *FEBS Lett* 1993, **317**: 255-258.
65. Yan H, Hancock RE: **Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**: 1558-1560.
66. Cociancich S, Dupont A, Hegy G, Lanot R, Holder F, Hetru C *et al.*: **Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*.** *Biochem J* 1994, **300 (Pt 2)**: 567-575.
67. Chernysh S, Cociancich S, Briand JP, Hetru C, Bulet P: **The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina*: Identification of a unique family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin.** *Journal of Insect Physiology* 1996, **42**: 81-89.
68. Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D *et al.*: **Insect immunity - isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of insect defensin family.** *Journal of Biological Chemistry* 1991, **266**: 24520-24525.

69. Yamauchi H: **Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: purification, amino acid sequences and antibacterial activity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2001, **32**: 75-84.
70. Boman HG, Steiner H: **Humoral immunity in *Cecropia* pupae.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1981, **94-95**: 75-91.
71. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG: **Insect immunity - purification and properties of 3 inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *hyalophora-cecropia*.** *European Journal of Biochemistry* 1980, **106**: 7-16.
72. Hultmark D: ***Drosophila* immunity: paths and patterns.** *Current Opinion in Immunology* 2003, **15**: 12-19.
73. Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G *et al.*: **A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution.** *Journal of Biological Chemistry* 1993, **268**: 14893-14897.
74. Ando K, Okada M, Natori S: **Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae.** *Biochemistry* 1987, **26**: 226-230.
75. Ishikawa M, Kubo T, Natori S: **Purification and characterization of a dipteracin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly).** *Biochemical Journal* 1992, **287**: 573-578.
76. Okada M, Natori S: **Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae.** *Journal of Biological Chemistry* 1985, **260**: 7174-7177.
77. Matsuyama K, Natori S: **Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*.** *Journal of Biological Chemistry* 1988, **263**: 17117-17121.
78. Matsuyama K, Natori S: **Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*.** *Journal of Biological Chemistry* 1988, **263**: 17112-17116.
79. Takeuchi K, Takahashi H, Sugai M, Iwai H, Kohno T, Sekimizu K *et al.*: **Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 4981-4987.
80. Matsuyama K, Natori S: **Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly).** *J Biochem* 1990, **108**: 128-132.
81. Yamada K, Natori S: **Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin.** *Biochem J* 1993, **291** (Pt 1): 275-279.



82. Lee SR, Kurata S, Natori S: **Molecular cloning of cDNA for sapecin B, an antibacterial protein of Sarcophaga, and its detection in larval brain.** *FEBS Lett* 1995, **368**: 485-487.
83. Saito H, Kurata S, Natori S: **Purification and characterization of a hemocyte proteinase of Sarcophaga, possibly participating in elimination of foreign substances.** *Eur J Biochem* 1992, **209**: 939-944.
84. Natori S, Shiraishi H, Hori S, Kobayashi A: **The roles of Sarcophaga defense molecules in immunity and metamorphosis.** *Developmental and Comparative Immunology* 1999, **23**: 317-328.
85. Levenbook L, Bodnaryk RP, Spande TF: **Beta-alanyl-L-tyrosine. Chemical synthesis, properties and occurrence in larvae of the fleshfly Sarcophaga bullata Parker.** *Biochemical Journal* 1969, **118**: 837-841.
86. Chiou SJ, Cerstiaens A, Kotanen SP, De Loof A, Schoofs L: **Insect larvae contain substances toxic to adults: the discovery of paralysins.** *Journal of Insect Physiology* 1998, **44**: 405-411.
87. De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B: **Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 12590-12595.
88. Hoffmann JA: **The immune response of Drosophila.** *Nature* 2003, **426**: 33-38.
89. Uvell H, Engstrom Y: **A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes.** *Trends Genet* 2007, **23**: 342-349.
90. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B *et al.*: **Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia.** *Immunity* 2000, **13**: 737-748.
91. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B: **How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions.** *Current Opinion in Microbiology* 2002, **5**: 102-110.
92. Tingvall TO, Roos E, Engstrom Y: **The imd gene is required for local Cecropin expression in Drosophila barrier epithelia.** *Embo Reports* 2001, **2**: 239-243.
93. Tzou P, Reichhart JM, Lemaitre B: **Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient Drosophila mutants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**: 2152-2157.
94. Uttenweiler-Joseph S, Moniatte M, Lagueux M, Van Dorselaer A, Hoffmann JA, Bulet P: **Differential display of peptides induced during the immune response of Drosophila: A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 11342-11347.

95. De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B: **The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila.** *EMBO J* 2002, **21**: 2568-2579.
96. Imler JL, Hoffmann JA: **Toll receptors in innate immunity.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**: 304-311.
97. Morisato D, Anderson KV: **Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo.** *Annu Rev Genet* 1995, **29**: 371-399.
98. Kim T, Kim YJ: **Overview of innate immunity in Drosophila.** *J Biochem Mol Biol* 2005, **38**: 121-127.
99. Irving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart JM *et al.*: **A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 15119-15124.
100. Levy F, Rabel D, Charlet M, Bulet P, Hoffmann JA, Ehret-Sabatier L: **Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of Drosophila.** *Biochimie* 2004, **86**: 607-616.
101. Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Van den BG, Arckens L *et al.*: **A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in Drosophila melanogaster hemolymph.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 470-475.
102. Vierstraete E, Cerstiaens A, Baggerman G, Van den BG, De LA, Schoofs L: **Proteomics in Drosophila melanogaster: first 2D database of larval hemolymph proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **304**: 831-838.
103. Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L: **Proteomic analysis of the systemic immune response of Drosophila.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**: 156-166.
104. Zhao XF, He HJ, Dong DJ, Wang JX: **Identification of differentially expressed proteins during larval molting of Helicoverpa armigera.** *J Proteome Res* 2006, **5**: 164-169.
105. Shih KM, Fallon AM: **Two-dimensional electrophoretic analysis of Aedes aegypti mosquito fat body proteins during a gonotrophic cycle.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**: 42-46.
106. Stadler F, Hales D: **Highly-resolving two-dimensional electrophoresis for the study of insect proteins.** *Proteomics* 2002, **2**: 1347-1353.
107. Guedes SM, Vitorino R, Tomer K, Domingues MR, Correia AJ, Amado F *et al.*: **Drosophila melanogaster larval hemolymph protein mapping.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **312**: 545-554.
108. Paskewitz SM, Shi L: **The hemolymph proteome of Anopheles gambiae.** *Insect Biochem Mol Biol* 2005, **35**: 815-824.

109. Vierstraete E, Verleyen P, De Loof A, Schoofs L: **Differential proteomics for studying *Drosophila* immunity.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1040**: 504-507.
110. Vierstraete E, Verleyen P, Sas F, Van den BG, De LA, Arckens L *et al.*: **The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **317**: 1052-1060.
111. Loseva O, Engstrom Y: **Analysis of signal-dependent changes in the proteome of *Drosophila* blood cells during an immune response.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**: 796-808.
112. Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Vierstraete E, Husson SJ, Schoofs L: **Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS.** *J Insect Physiol* 2006, **52**: 379-388.
113. Wang Y, Zhang P, Fujii H, Banno Y, Yamamoto K, Aso Y: **Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2004, **68**: 1821-1823.
114. Engstrom Y, Loseva O, Theopold U: **Proteomics of the *Drosophila* immune response.** *Trends Biotechnol* 2004, **22**: 600-605.
115. Zdarek J: **Endocrine Control of the Pupariation Behavior in Flies.** *General and Comparative Endocrinology* 1980, **40**: 361.
116. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**: 680-685.
117. Schagger H, Jagow JG: **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Anal Biochem* 1987, **166**: 368-379.
118. Selicharova I, Smutna K, Sanda M, Ubik K, Matouskova E, Bursikova E *et al.*: **2-DE analysis of a new human cell line EM-G3 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells.** *Proteomics* 2007.
119. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**: 248-254.
120. Barcelo-Batlloiri S, Corominola H, Claret M, Canals I, Guinovart J, Gomis R: **Target identification of the novel antiobesity agent tungstate in adipose tissue from obese rats.** *Proteomics* 2005, **5**: 4927-4935.
121. Rabilloud T: **A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains.** *Electrophoresis* 1992, **13**: 429-439.
122. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B *et al.*: **Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis* 2004, **25**: 1327-1333.

123. Kasicka V, Prusik Z, Sazelova P, Jiracek J, Barth T: **Theory of the correlation between capillary and free-flow zone electrophoresis and its use for the conversion of analytical capillary separations to continuous free-flow preparative processes. Application to analysis and preparation of fragments of insulin.** *J Chromatogr A* 1998, **796**: 211-220.
124. Mossine VV, Glinsky GV, Feather MS: **The preparation and characterization of some Amadori compounds (1-amino-1-deoxy-D-fructose derivatives) derived from a series of aliphatic omega-amino acids.** *Carbohydr Res* 1994, **262**: 257-270.
125. French CK, Fouts DL, Manning JE: **Sequence arrangement of the rRNA genes of the dipteran *Sarcophaga bullata*.** *Nucleic Acids Res* 1981, **9**: 2563-2576.
126. Misra S, Crosby AM, Mungall CJ, Matthews BB, Lewis SE: **Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review.** *Genome Biology* 2002, **12**: 1-22.
127. Ramet M, Manfruelli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA: **Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*.** *Nature* 2002, **416**: 644-648.
128. Chung SO, Kubo T, Natori S: **Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of the *Sarcophaga* fat body. Implications of a post-translational processing mechanism.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 4624-4631.
129. Tsuji Y, Nakajima Y, Homma K, Natori S: **Antibacterial activity of a novel 26-kDa serine protease in the yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) pupae.** *FEBS Lett* 1998, **425**: 131-133.
130. Homma K, Natori S: **Identification of substrate proteins for cathepsin L that are selectively hydrolyzed during the differentiation of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina*.** *Eur J Biochem* 1996, **240**: 443-447.
131. Homma K, Kurata S, Natori S: **Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 15258-15264.
132. Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochrane BJ, Zimniak P: **Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products.** *Eur J Biochem* 2001, **268**: 2912-2923.
133. Gunsalus KC, Bonaccorsi S, Williams E, Verni F, Gatti M, Goldberg ML: **Mutations in twinstar, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis.** *J Cell Biol* 1995, **131**: 1243-1259.

134. Pena P, Garesse R: **The beta subunit of the *Drosophila melanogaster* ATP synthase: cDNA cloning, amino acid analysis and identification of the protein in adult flies.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **195**: 785-791.
135. Richards S, Liu Y, Bettencourt BR, Hradecky P, Letovsky S, Nielsen R *et al.*: **Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution.** *Genome Res* 2005, **15**: 1-18.
136. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR *et al.*: **The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *Science* 2002, **298**: 129-149.
137. Takahashi H, Komano H, Natori S: **Expression of the lectin gene in *Sarcophaga peregrina* during normal development and under conditions where the defense-mechanism is activated.** *Journal of Insect Physiology* 1986, **32**: 771-776.
138. Li Z, Sumida M, Birchbauer A, Schotz MC, Reue K: **Isolation and characterization of the gene for mouse hormone-sensitive lipase.** *Genomics* 1994, **24**: 259-265.
139. Naumann U, Scheller K: **Complete cDNA and gene sequence of the developmentally regulated arylphorin of *Calliphora vicina* and its homology to insect hemolymph proteins and arthropod hemocyanins.** *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **177**: 963-972.
140. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW *et al.*: **Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*.** *Nat Genet* 1999, **21**: 385-389.
141. Tsukiyama T, Wu C: **Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor.** *Cell* 1995, **83**: 1011-1020.
142. Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA *et al.*: **The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*.** *Nature* 1997, **390**: 364-376.
143. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J *et al.*: **Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains.** *J Bacteriol* 2002, **184**: 5479-5490.
144. Gagou M, Ballesta JP, Kouyanou S: **Cloning and characterization of the ribosomal protein CcP0 of the medfly *Ceratitis capitata*.** *Insect Mol Biol* 2000, **9**: 47-55.
145. Chiou SJ, Kotanen S, Cerstiaens A, Daloze D, Pasteels JM, Lesage A *et al.*: **Purification of toxic compounds from larvae of the gray fleshfly: the identification of paralysins.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **246**: 457-462.
146. Dunn PE, Fader RG, Regnie FE: **Metabolism of beta-Alanyl-L-Tyrosine in *Sarcophaga bullata*.** *Insect Physiology* 1977, **23**: 1021-1029.

147. Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA: **Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*.** *Genome Research* 2002, **12**: 1357-1369.
148. Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH: ***Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection.** *Eur J Biochem* 1999, **260**: 414-420.
149. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M: **Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages.** *Dev Comp Immunol* 2001, **25**: 101-115.
150. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J: **Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.** *Drug Discov Today* 2005, **10**: 267-273.
151. Suzuki T, Natori S: **Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae.** *J Biol Chem* 1985, **260**: 5115-5120.
152. Saito H, Suzuki T, Ueno K, Kubo T, Natori S: **Molecular cloning of cDNA for sarcocystatin A and analysis of the expression of the sarcocystatin A gene during development of *Sarcophaga peregrina*.** *Biochemistry* 1989, **28**: 1749-1755.
153. Lazzaro BP, Sackton TB, Clark AG: **Genetic variation in *Drosophila melanogaster* resistance to infection: A comparison across bacteria.** *Genetics* 2006, **174**: 1539-1554.
154. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA: ***Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 14614-14619.
155. Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA: **The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**: 862-874.
156. Meister M, Richards G: **Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the diptericin gene in *Drosophila* larvae.** *Insect Biochem Mol Biol* 1996, **26**: 155-160.
157. Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA: **Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*.** *Eur J Biochem* 1999, **262**: 49-55.
158. Beckstead RB, Lam G, Thummel CS: **Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in *Drosophila*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2007, **37**: 570-578.
159. Beckstead RB, Lam G, Thummel CS: **The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis.** *Genome Biology* 2005, **6**: R99.

160. Kucharski R, Maleszka R: **Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*.** *J Insect Sci* 2003, **3**: 27.
161. Thompson GJ, Crozier YC, Crozier RH: **Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**: 1-7.
162. Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, Bulet P, Lanot R, Reichhart JM *et al.*: **Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity.** *Eur J Biochem* 1994, **221**: 201-209.
163. Wang JX, Zhao XF, Liang YL, Li L, Zhang W, Ren Q *et al.*: **Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*).** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**: 3072-3082.
164. Kocks C, Maehr R, Overkleeft HS, Wang EW, Iyer LK, Lennon-Dumenil AM *et al.*: **Functional proteomics of the active cysteine protease content in *Drosophila* S2 cells.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2003, **2**: 1188-1197.
165. Liu J, Shi GP, Zhang WQ, Zhang GR, Xu WH: **Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.** *Insect Molecular Biology* 2006, **15**: 823-834.
166. Philip JMD, Fitches E, Harrison RL, Bonning B, Gatehouse JA: **Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2007, **37**: 589-600.
167. Yacoub A, Augeri L, Kelley MR, Doetsch PW, Deutsch WA: **A *Drosophila* ribosomal protein contains 8-oxoguanine and abasic site DNA repair activities.** *Embo Journal* 1996, **15**: 2306-2312.

# **PŘÍLOHA**



## Seznam publikací

*Publikace vzešlé z této disertační práce:*

**Ciencialová, A.**, Neubauerová, T., Šanda, M., Šindelka, R., Cvačka, J., Voburka, Z., Buděšínský, M., Kašička, V., Sázelová, P., Šolínová, V., Macková, M., Koutek, B., & Jiráček, J. (2008) Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *J. Pept. Sci.* 14, 670-678.

**Mášová, A.**, Šindelka, R., Kubista, M., Kindl, J., Jiráček, J., Gene expression response after immune stimulation of the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. Zasláno do tisku, *BMC Genetics*.

*Další autorčiny práce vzniklé mimo rozsah této disertace:*

**Ciencialová, A.**, Žáková, L., Jiráček, J., Bartlová, J., Barth, T. (2004) Preparation and characterization of two LysB29 specifically labelled fluorescent derivatives of human insulin. *J. Pept. Sci.* 10, 470-478.

Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Barth, T., **Ciencialová, A.**, Žáková, L. (2004) Analysis of synthetic derivatives of peptide hormones by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with UV-absorption and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 808: 75-82 (2004).

# Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*

ALICE CIENCIALOVÁ,<sup>a</sup> TEREZA NEUBAUEROVÁ,<sup>b</sup> MILOSLAV ŠANDA,<sup>a</sup> RADEK ŠINDELKA,<sup>c</sup> JOSEF CVAČKA,<sup>a</sup> ZDENĚK VOBURKA,<sup>a</sup> MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ,<sup>a</sup> VÁCLAV KAŠIČKA,<sup>a</sup> PETRA ŠÁZELOVÁ,<sup>a</sup> VERONIKA ŠOLÍNOVÁ,<sup>a</sup> MARTINA MACKOVÁ,<sup>b</sup> BOHUMÍR KOUTEK<sup>a</sup> and JIŘÍ JIRÁČEK<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic

Received 13 July 2007; Revised 25 September 2007; Accepted 30 September 2007

**Abstract:** We chose the larvae of fleshfly *Sarcophaga bullata* to map the peptide and protein immune response. The hemolymph of the third-instar larvae of *S. bullata* was used for isolation. The larvae were injected with bacterial suspension to induce an antimicrobial response. The hemolymph was separated into crude fractions, which were subdivided by RP-HPLC, gel electrophoresis, and free-flow electrophoresis. In several fractions, we determined significant antimicrobial activities against the pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, or *Pseudomonas aeruginosa*. Among antimicrobially active compounds we identified dipeptide  $\beta$ -alanyl- L-tyrosine, protein transferrin, and two variants of peptide sapecin. We also partially characterized two novel antimicrobially active polypeptides; odorant-binding protein 99b, and a peptide which remains unidentified. Copyright © 2007 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** fleshfly; *Sarcophaga bullata*; antimicrobial activity; sapecin; odorant-binding protein; transferrin

## INTRODUCTION

Disease-causing microbes resistant to drug therapy are an increasing public health problem. Tuberculosis, gonorrhoea, and childhood ear infections are just a few examples of diseases that have become difficult to treat with antibiotics. The World Health Organization (WHO, Geneva) estimates that 1 500 people die each hour from an infectious disease, half of these being children under 5 years of age. Today, nosocomial infections affect over 2 million patients annually in the USA, at a cost in excess of \$4.5 billion [1]. The growing problem of microbial resistance to conventional antibiotics and the need for new antibiotics, especially with new mechanisms of action, has stimulated interest in the development of antimicrobial peptides as human therapeutics [2,3].

Peptides and polypeptides with antimicrobial activity can be classified on the basis of their biochemical and structural features, the largest group of which concerns the so-called cationic peptides, which are widely distributed in plants, animals and bacteria [4]. Currently, more than 1000 naturally occurring antimicrobial peptides are known [5–7] and are typically positively-charged and composed of 10–40 amino acids, approximately 50% of which consists of hydrophobic residues. These properties confer

their amphipathic character [6]. Cationic peptides are grouped into three families on the basis of their secondary structure: (i) linear peptides with an  $\alpha$ -helical conformation (cecropins) [8], (ii) cyclic and open-ended cyclic peptides with pairs of cysteine residues (defensins) [9–11], and (iii) peptides with over-representation of amino acid proline (pyrrhocoricin) [12–14] or glycine (attacin) [1].

Three other classes of antimicrobial peptides have been recently isolated from different invertebrate and vertebrate species: anionic peptides, aromatic dipeptides, and peptides derived from oxygen-binding proteins [4]. The anionic peptides are generally isolated from mammalian epithelia (e.g. enkelytin) [15], peptide B [16], or aspartic acid-rich peptides [17]. The aromatic dipeptides consist of low molecular weight compounds such as *N*- $\beta$ -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine identified in fleshfly *Sarcophaga peregrina* [18] and *p*-hydroxycinnamaldehyde that was isolated from the saw fly *Acantholyda parki* [19]. The dipeptide  $\beta$ -alanyl-tyrosine with modest antimicrobial activity has been constitutively found in the fleshfly *Neobellieria bullata* [20]. Hemocyanin derivatives, the peptides derived from oxygen-binding proteins, were recently isolated from the hemolymph of arthropods. The proteolyzed form of vertebrate hemoglobin with antimicrobial activity was detected in the tick *Boophilus microplus* [21].

There are different modes of action of antimicrobial peptides. The majority of cationic antimicrobial

\* Correspondence to: Jiří Jiráček, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic; e-mail: jiracek@uochb.cas.cz

peptides is known to selectively target the negatively charged lipid bilayer of bacterial cells [22,23] and do not interact with the outer membrane of mammalian cells, which is zwitterionic. Nevertheless, the membrane permeabilization alone appears insufficient to cause cell death [24,25]. Other events such as membrane dysfunction, inhibition of synthesis of extracellular biopolymers [26,27], or inhibition of intracellular processes are necessary for an effective antimicrobial activity. Alternatively, antimicrobial peptides can serve to control proteinases involved in inflammatory processes. Examples include the inhibition of furin by histatin 3 [28] or inhibition of cathepsin L by probactenecin 5 from bovine neutrophils [29].

Microbiological and biophysical studies typically examine biological activities of individual antimicrobial peptides to minimize experimental variability. However, as it inevitably occurs in nature, antimicrobial peptides may interact simultaneously with microbial pathogens in a variety of settings, including complex mixtures of peptides within phagolysosomes or in the extracellular milieu. In 2001, Yan and Hancock demonstrated that various antimicrobial peptides function synergistically with lysozyme *in vitro* [30].

Insects are the largest and the most diverse group of animals living on earth [31]. Approximately 800 000 insect species, about 80% of all the animal species known to date, have been identified and classified [32]. Insects are usually exposed to a wide range of microbes throughout their life cycle and some insect species feed on animal tissues or excrements infected with microorganisms and parasites. The amazing diversity and evolutionary success of insects argue for an effective system of defense against microbes [33]. Insects have evolved powerful defense systems based on an innate immunity that relies mainly on the synthesis of proteins, peptides, as well as small organic molecules. Thus, insects may represent a unique and vast source of novel potential therapeutics [31]. The diversity of amino acid sequences is so large that the same peptides are rarely recovered from two different species of an animal, even those that are closely related. The diversity may reflect the species' adaptation to the unique microbial environment [2,32].

In insects, rapid humoral response reactions are triggered by wound or microbial infection. The most immediate response occurs within minutes and consists of the activation of prophenoloxidase activating enzyme (PPAE) that converts prophenoloxidase to phenoloxidase [33]. Phenoloxidase is an enzyme involved in melanin biosynthesis and is also important in cuticular sclerotization, wound healing, and in the encapsulation of foreign material [34,35]. The humoral response includes the production of lectins and rapid *de novo* synthesis of antimicrobial peptides by the fat body, the functional homologue of the mammalian liver, and by the hemocytes [36,37]. Studies on *Drosophila* mutants

revealed that Toll and Imd pathways control the synthesis of specific gene-encoded antimicrobial peptides. The Toll pathway is activated by and against Gram-positive bacteria and fungi. The Imd pathway governs defense reactions against Gram-negative bacteria [38–41].

We have chosen larvae of fleshfly *Sarcophaga bullata* to map the immune response and for the isolation and characterization of new antimicrobial compounds. The larval development in the fleshfly proceeds in three larval instars. The female deposits live larvae that moult into the second instar in about 18–24 h and into the third instar 40–48 h after larviposition. Most of the feeding is done during the third instar, which lasts approximately 3–4 days [42]. For our experiments we used larvae hemolymph, the body fluid where antimicrobial compounds are secreted and accumulated [43]. Hemolymph was obtained from wandering third-instar larvae, i.e. larvae that left the food and sought for dry places to pupariate. In this study we present two different isolation protocols, which resulted in the identification of several previously known as well as two novel antimicrobial proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Fleshfly Larvae

*S. bullata* fleshflies were grown under laboratory conditions, as previously described [44]. Briefly, 200–300 larvae specimens of *S. bullata* were grown on beef liver in small open disposable packets made from aluminium foil at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Induction of Larvae by Bacterial Suspension and Isolation of Larval Hemolymph

Before induction, larvae had been immobilized by chilling on ice. Bacterial suspensions of *Escherichia coli* were injected into the abdomen of the larvae during their third-instar wandering period using either a calibrated glass capillary with a finely drawn tip or entomological pin. Bacteria used for induction were cultivated in a Luria-Bertani broth at  $37^\circ\text{C}$  for 12 h to the mid-exponential phase of growth and were at a final concentration of  $10^9$  cfu/ml. After cultivation the cells were centrifuged at 3 000 g for 10 min and washed twice with 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. The cells were diluted in physiological saline until the final absorbance was 1.5–1.8 at 550 nm. We used intact larvae as a control to distinguish the immune response.

### Isolation of Larval Hemolymph

After 22 h of induction, the hemolymph from induced and control larvae were collected on ice. The cells and debris were removed by an initial centrifugation for 10 min at 1000 g and  $4^\circ\text{C}$ . The resulting supernatant was precipitated either by four volumes of acidic methanol (90% methanol, 9% distilled water, and 1% acetic acid, v/v/v) or by ammonium sulfate (saturation to 70%). The precipitates were centrifuged for 30 min at 13 000 g at  $4^\circ\text{C}$ .

## Chromabond C-18 Cartridges - Solid-Phase Extraction

Supernatants resulting from either acidic methanol or ammonium sulfate precipitation were divided into hydrophilic and hydrophobic fractions using Chromabond C-18 cartridges (Macherey-Nagel, Germany). Methanol was removed from the supernatant by evaporation and the residue was dissolved in 0.1% v/v aqueous TFA. Chromabond C-18 cartridges were activated by 80% v/v aqueous acetonitrile, rinsed with water and the samples were loaded repeatedly. Hydrophilic fractions were obtained using 0.1% TFA elution. Hydrophobic fractions were eluted from cartridges by 80% aqueous acetonitrile. All fractions were evaporated using a Speed-vac.

## Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography

Hydrophilic and hydrophobic fractions were further analyzed and subdivided using RP-HPLC with apparatus Waters 600 and C-18 columns Vydac 218TP54 (250 × 4 mm, 5 μm) or Vydac 218TP54 (250 × 10 mm, 5 μm). Elution was achieved by a gradient with rising concentration of acetonitrile in water in the presence of 0.1% TFA. Chromatograms were analyzed using Empower software (Waters, USA) or DataApex Clarity Lite software, (DataApex, Czech Republic).

## Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) for Identification of Low Molecular Weight Compounds

Mass spectra of the isolated fractions and synthetic analogs were recorded using a quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer Q-TOF Micro (Waters). Samples dissolved in acetonitrile/0.2% formic acid in water (1 : 1, v/v) were injected into the mobile phase of the same composition at a flow rate of 20 μl/min. The electrospray ion source was operated in positive ion mode with capillary voltage and cone voltage at 3500 and 20 V, respectively. Nitrogen was used as the cone gas (50 l/h) and desolvation gas (150 l/h). The source and desolvation temperature was 80 and 150 °C, respectively. In the MS mode, the collision energy was set at 10 V; the value was increased, typically to 15–25 V, for MS/MS experiments.

## MALDI Ionization Mass Spectrometry for Determination of Relative Molecular Weight of Proteins and Peptides

Mass spectra of individual fractions were measured by a MALDI-TOF mass spectrometer REFLEX IV (Brüker-Daltonic) equipped with N<sub>2</sub> laser (337 nm). Mass spectra were acquired in the linear mode with an acceleration voltage of 20 kV. Sinapinic acid was used as the matrix.

## Identification of Peptides and Proteins from Proteolytic Digests by Mass Spectrometry Techniques

Selected protein or peptide bands from 1D-SDS PAGE were cut, destained using 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate buffer pH 7.8 or in 50 mM 4-ethylmorpholine

acetate buffer pH 8.1 with 40 mM DTT, dehydrated with 200 μl of acetonitrile for 5 min at 30 °C using a thermo shaker (Eppendorf) at 30 °C and then vacuum dried in a Speed-vac (Labconco). Gel pieces were rehydrated and proteins/peptides were digested with the Cleavage buffer 1 or 2 using the thermo shaker for 8 h at 37 °C. Cleavage buffer 1 contained 30 ng/μl of enzyme in 50 mM 4-ethylmorpholine acetate pH 8.1, 4% acetonitrile, and 0.01% β-mercaptoethanol. Cleavage buffer 2 contained 30 ng/μl of enzyme in 25 mM ammonium bicarbonate pH 7.8, 4% acetonitrile, and 0.01% β-mercaptoethanol. Trypsin (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega) or chymotrypsin (A-chymotrypsin sequencing grade, Sigma) enzymes were used for the digestion of proteins and peptides. After digestion, peptides were extracted from gel pieces using a step-by-step extraction with a gradient of acetonitrile (15–60% acetonitrile with 1% TFA). The extraction was performed in a sonicator (Elmasonic) with ice.

Extracted peptides were desalted and concentrated with Zip-Tip C18 tips (Millipore). Both MALDI-TOF-MS and tandem ESI-MS were used to characterize the digests. The MALDI-TOF spectrometer REFLEX IV (Brüker-Daltonics) was operated in reflectron mode with an acceleration voltage of 20 kV. Samples were prepared using alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix. Mass spectrometer Q-TOF Micro (Waters–Micromass) was equipped with a nanoelectrospray source and coupled to 2D capillary chromatography CapLC (Waters). Chromatographic separation was achieved using 1 cm symmetry 300 Å trap column and Atlantis dC18 (75 μm × 10 cm) capillary column. Data were processed by proteomic software Mascot (MALDI) and Proteinlynx global server (LC-MS/MS). Swissprot or Uniprot databases were searched to identify protein sequences.

## N-Terminal Sequencing

N-terminal amino acid sequences were determined using the Procise-Protein Sequencing System (PE Applied Biosystems, 491 Protein Sequencer, program PL PVDF Protein).

## Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D-SDS-PAGE)

Electrophoresis of isolated fractions was carried out either in 20% polyacrylamide gel according to Laemmli [45] or by Tricine-SDS-PAGE electrophoresis by the method of Schägger and Jagow [46] using the Mini-Protean 3 system (Biorad, USA).

## Screening of Antimicrobial Activity

Antimicrobial activities of RP-HPLC-isolated fractions were determined by measuring the bacterial growth using Bioscreen C apparatus, a computer-controlled incubator evaluating turbidity of the samples (Growth Curves Ltd., Finland). Turbidometric measurements were made kinetically during the course of the 24-h run. This information was processed to generate microbiological growth curves, plotting turbidity *versus* time. The testing volumes were 165 and 330 μl. Growth inhibition of the pathogens were evaluated using antimicrobial activities of fractions from the decrease in absorbance during growth curve measurements compared to growth of control microorganisms incubated without peptide. Using serial dilutions, the MIC was determined for some compounds.

The MIC is defined as the lowest final concentration of the compound at which no growth is observed during exponential phase of the bacterial growth. The test microorganisms were *E. coli* DBM 3001, *Staphylococcus aureus* DBM 3002 and *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3081.

### Solid-Phase Peptide Synthesis of $\beta$ -Alanyl-Tyrosine and Analogs

The synthetic analogs of  $\beta$ -alanyl-tyrosine were synthesized by solid-phase methods using Fmoc/tBu strategy and 2-chlorotrityl or RinkAmide AM resin as polymeric supports. Couplings were performed using HBTU/DIPEA reagents in 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP). *N*-acetylation was performed with 5% acetic anhydride and 1% DIPEA in NMP. All dipeptides,  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine,  $\beta$ -alanyl-D-tyrosine,  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-NH<sub>2</sub>, and *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine were purified by RP-HPLC. The purities of the dipeptides were more than 96% as determined by analytical RP-HPLC. All dipeptides were characterized by MS. Prior to testing, the concentration of  $\beta$ -alanyl-tyrosine and its analogs were determined by absorption of tyrosine at 276 nm using the molar absorption coefficient 1420 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### Synthesis of D-Fructopyranose- $\beta$ -Alanyl-L-Tyrosine

D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine was synthesized according to Mossine *et al.* [47]. Briefly,  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine (20 mg, 7.9  $\mu$ moles) and D(+)-Glucose (6 mg, 33  $\mu$ moles) were added to 10 ml of acetic acid in pyridine (1 : 1) and stirred at RT for 48 h. The reaction mixture was evaporated and the product was isolated using RP-HPLC. The identity was confirmed with MS, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR.

### Capillary Electrophoresis

Experimental details on capillary electrophoresis analyses and chiral separations of crude isolated  $\beta$ -alanyl-tyrosine, and the standards of  $\beta$ -alanyl-L(D)-tyrosine and its derivatives will be published elsewhere (Šolínová *et al.* manuscript in preparation).

### Free-Flow Electrophoresis

Preparative electrophoretic separations were performed in a homemade free-flow electrophoretic apparatus equipped with flow-through electrophoretic chamber composed of two glass plates (500 × 500 × 4 mm) with a narrow gap (0.5 mm) between them. The chamber was thermostated from both sides by fast flowing low temperature air (−1 °C). The separations were performed in 0.5 M acetic acid at a flow rate of 250 ml/h, at separation voltage 3 kV, and current 125 mA. The sample flow rate was 1.6 ml/h and the residence time of the background electrolyte and sample in the chamber was 31 min. The collected fractions were evaluated by off-line UV-absorption measurements at 220 and 280 nm. Sample concentration was 30 mg/ml [48].

### NMR Spectrometry

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of compounds  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH and D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine were measured on a Bruker AVANCE-500 NMR spectrometer (<sup>1</sup>H at 500 MHz;

**Table 1** Proton and carbon-13 NMR data of compound from fraction M1b and  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine in D<sub>2</sub>O. The NMR spectra of the pairs of native M1b (isolated) and synthetic compound were identical

Proton	<sup>1</sup> H NMR $\beta$ -D-Fru- $\beta$ - Ala-L-Tyr-OH or M1b	Carbon	<sup>13</sup> C NMR $\beta$ -D-Fru- $\beta$ - Ala-L-Tyr-OH or M1b
H-1a	3.30 d, <i>J</i> = 12.8	C-1	55.86
H-1b	3.24 d, <i>J</i> = 12.8	C-2	98.04
H-3	3.72 d, <i>J</i> = 9.9	C-3	72.63
H-4	3.88 dd, <i>J</i> = 9.9, 3.4	C-4	72.08
H-5	4.00 m	C-5	71.67
H-6a	4.00 m	C-6	66.79
H-6b	3.76 dd, <i>J</i> = 13.1, 2.2		
H $\alpha$ 1	2.73 dt, <i>J</i> = 16.5, 6.6	C=O	174.65
H $\alpha$ 2	2.67 dt, <i>J</i> = 16.5, 6.6	C $\alpha$	32.94
H $\beta$ 1 + H $\beta$ 2	3.27 m	C $\beta$	47.14
H $\alpha$	4.63 dd, <i>J</i> = 9.3, 5.3	COOH	178.24
H $\beta$ 1	3.19 dd, <i>J</i> = 14.0, 5.3	C $\alpha$	57.35
H $\beta$ 2	2.92 dd, <i>J</i> = 14.0, 9.3	C $\beta$	38.84
H-ortho	7.17 m	C- <i>ipso</i>	131.44
H- <i>meta</i>	6.86 m	C- <i>ortho</i>	133.41
		C- <i>meta</i>	118.20
		C- <i>para</i>	157.22

<sup>13</sup>C at 150.9 MHz) in D<sub>2</sub>O with a drop of dioxane added as an internal standard ( $\delta$ <sub>H</sub> 3.76;  $\delta$ <sub>C</sub> 69.33). Chemical shifts are given in ppm and coupling constants are given in Hz (Table 1).

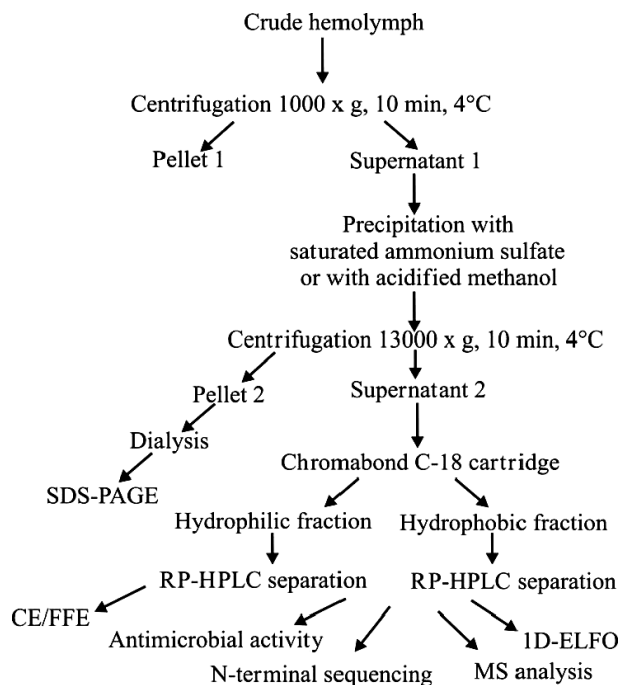
## RESULTS

### Prophenoloxidase

Supernatant 1 (Figure 1) as well as both pellets 2 (after ammonium sulfate or acidified methanol precipitation) contained one major 75-kDa protein, as revealed by electrophoretic analysis (data not shown). Using tryptic digest and MALDI-MS, this protein was identified as prophenoloxidase, a zymogen, which is processed to phenoloxidase (EC 1.14.18.1) an enzyme involved in larval melanization [49].

### Acidic Methanol Precipitation of Larvae Hemolymph

After acidified methanol precipitation, supernatant 2 was further divided into crude hydrophilic and hydrophobic fractions, using Chromabond C-18 cartridges (Figure 1 and Methods). Both fractions were analyzed and separated by RP-HPLC (Figures 2 and 3). We compared control larvae (blue lines in Figures 2 and 3) with larvae induced with bacterial suspensions of *E. coli* (red lines in Figures 2 and 3). Chromatograms obtained after induction with *P. aeruginosa* or *S. aureus* were essentially the same as the profile shown in Figure 3.



**Figure 1** The separation of larval hemolymph.

We observed one main peak (M1, Figure 2) in the hydrophilic Chromabond C-18 fraction. In this fraction we identified dipeptide  $\beta$ -alanyl-tyrosine by a combination of FAB and ESI-MS/MS spectroscopy, UV-VIS spectroscopy, amino acid analysis, and NMR.

From the hydrophobic Chromabond C-18 fraction we isolated different peaks, marked as M1–M19, from which fractions M13–M15 were found only in larvae induced with the bacterial suspension of *E. coli* (Figure 3). Fractions M1–M19 were further analyzed by gel electrophoresis (Figure 4) and this analysis revealed the presence of different peptides and proteins of relatively low molecular masses in fractions M7–M19.

## Ammonium Sulfate Precipitation of Larvae Hemolymph

The hydrophilic Chromabond C-18 fraction obtained from supernatant 2 after ammonium sulfate precipitation of hemolymph contained only salts. The RP-HPLC analysis of the hydrophobic Chromabond C-18 fraction is shown in Figure 5. We found no difference in HPLC profiles between induced and noninduced larvae. The isolated peaks were further analyzed by gel electrophoresis (Figure 6) and this analysis revealed different proteins in fractions S3–S9. Fractions S3, S4, S6, and S7 contained essentially pure proteins while fractions S5 and S9 were composed of several proteins.

## Antimicrobial Activity

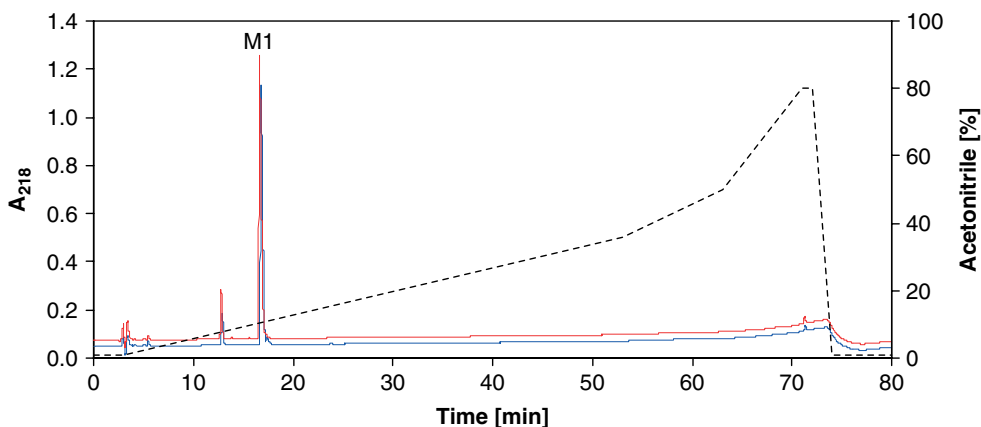
All isolated fractions, M1–M19 and S1–S9, were tested for their antimicrobial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram-negative bacteria) and *S. aureus* (Gram-positive bacteria) at concentrations up to 1 mg/ml. Some fractions displayed antimicrobial activities.

Among fractions M1–M19, only fractions M13–M15 have shown significant antimicrobial activity. Fraction M13 completely inhibited the growth of *P. aeruginosa* at a concentration 970  $\mu\text{g}/\text{ml}$  as shown in Figure 7(A). Fractions M14 and M15 effectively inhibited *S. aureus* growth at concentrations 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively (Figure 7(B)).

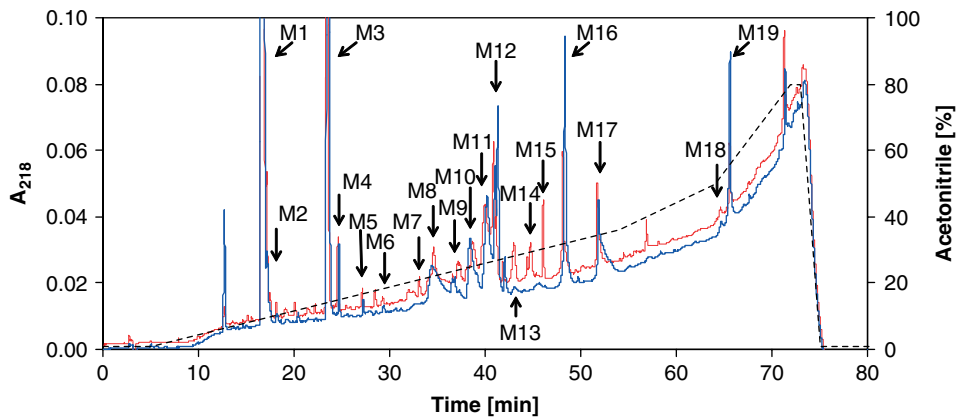
Among fractions S1–S9, only S4 and S7 have shown any antimicrobial activity. Fractions S4 and S7 significantly inhibited growth of *S. aureus*, but only slightly inhibited growth of *E. coli* (Figure 8). The MIC of fraction S4 was determined to be between 80 and 115  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for *S. aureus*.

## $\beta$ -Alanyl-Tyrosine

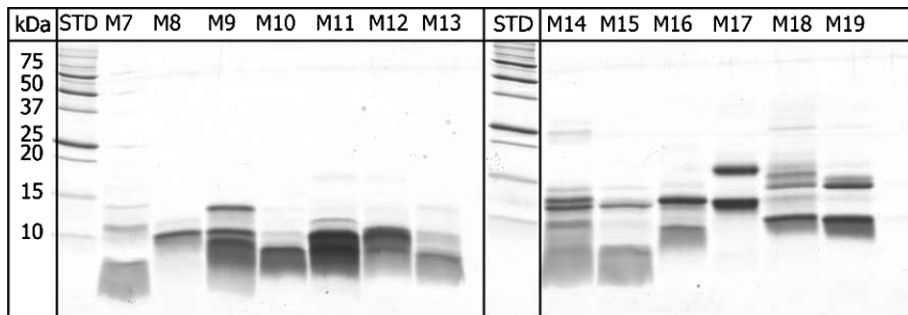
As mentioned above, we observed one main peak (M1, Figure 2) in the hydrophilic Chromabond C-18 fraction



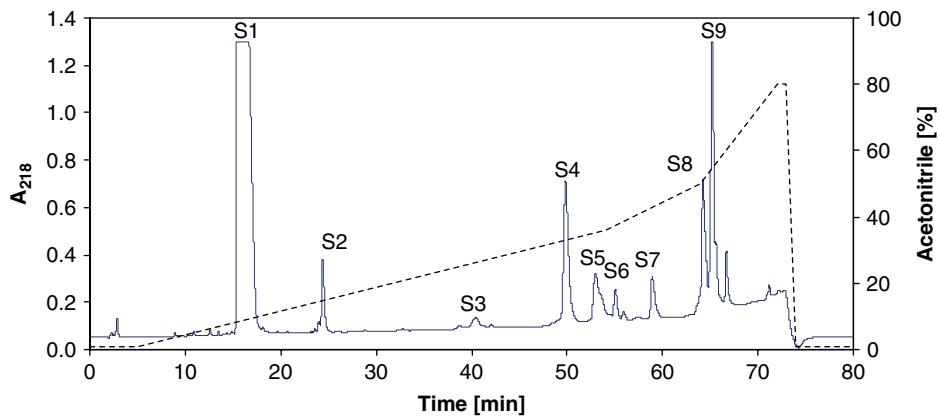
**Figure 2** RP-HPLC analysis of Chromabond C-18 hydrophilic fraction from *S. bullata* hemolymph obtained after precipitation with acidified methanol. Chromatogram of control larvae is shown in blue and of induced larvae is shown in red. The peak of  $\beta$ -alanyl-tyrosine is marked by M1.



**Figure 3** RP-HPLC analysis of Chromabond C-18 hydrophobic fraction from *S. bullata* hemolymph obtained after precipitation with acidified methanol. Chromatogram of control larvae is shown in blue and of induced larvae is shown in red. The isolated peaks are marked as M1–M19.



**Figure 4** SDS-PAGE of HPLC-isolated fractions M7–M19 obtained after precipitation with acidified methanol.

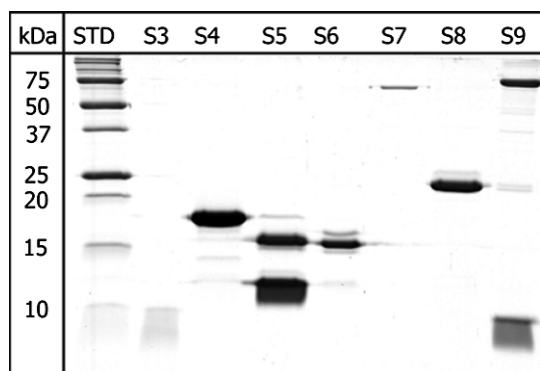


**Figure 5** RP-HPLC analysis of Chromabond C-18 hydrophobic fraction of *S. bullata* hemolymph obtained after precipitation with ammonium sulfate. The isolated peaks are marked as S1–S9. Chromatograms from induced and control larvae were essentially the same.

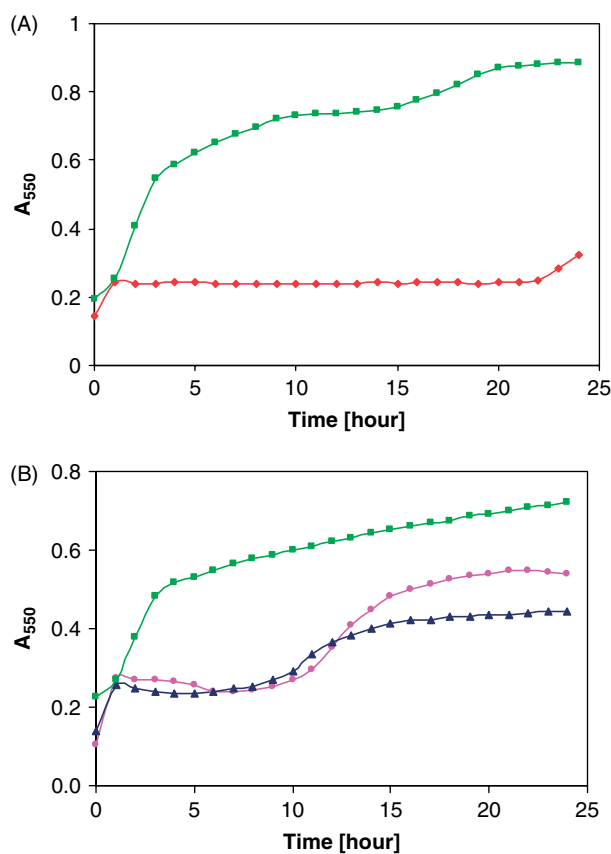
obtained after precipitation of hemolymph with acidified methanol. The compound was identified as dipeptide  $\beta$ -alanyl-tyrosine. The structure was determined by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. Proton and carbon signals were structurally assigned by means of the series of 1D- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT) and 2D-NMR spectra ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC). We also synthesized  $\beta$ -alanyl-tyrosine using solid-phase synthesis and found

the NMR spectra of the pairs of native and synthetic compounds to be identical (data not shown).

Using capillary electrophoresis with a cyclodextrin-based chiral pseudo stationary phase, we proved that tyrosine in the isolated  $\beta$ -alanyl-tyrosine is present in its L-form (Šolínová *et al.* manuscript in preparation). Interestingly, capillary electrophoresis also revealed that fraction M1 contains an admixture

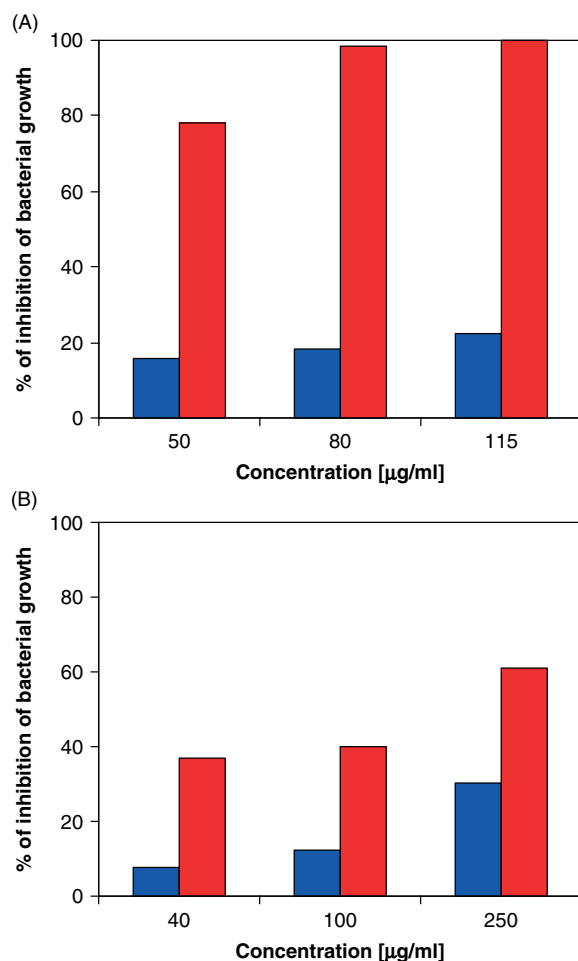


**Figure 6** SDS-PAGE of RP-HPLC-isolated fractions S3–S9 obtained after precipitation with ammonium sulfate.



**Figure 7** (A) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* growth by fraction M13 at 970  $\mu\text{g/ml}$  ( $\blacklozenge$ ). The control growth of *Pseudomonas aeruginosa* is displayed as  $\blacksquare$ . B. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by fraction M14 at 400  $\mu\text{g/ml}$  ( $\bullet$ ) and fraction M15 at 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $\blacktriangle$ ). The control growth of *Staphylococcus aureus* is displayed as  $\blacksquare$ .

(about 1–3%). This admixture was not detectable in the M1 fraction using  $^1\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$  NMR. The admixture was highly enriched using free-flow electrophoresis (FFE), (see Methods, data not shown) and the FFE prepurified fraction was further separated using RP-HPLC (Figure 9). We isolated two compounds, M1a

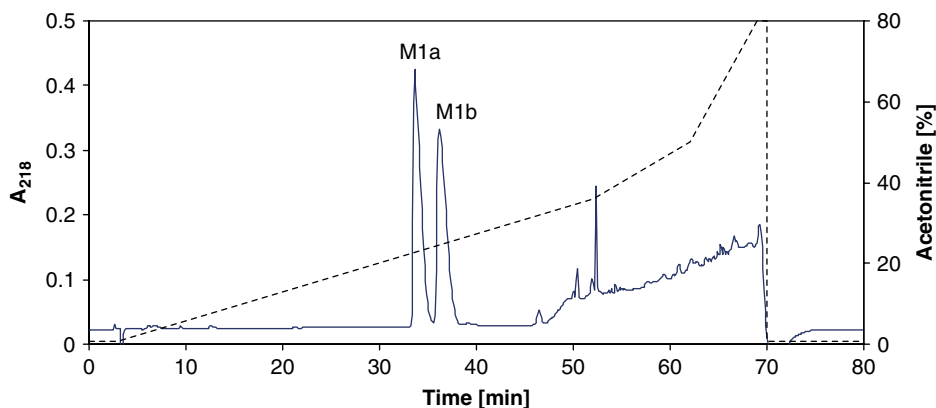


**Figure 8** Dose-dependent inhibition of bacterial growth of *Staphylococcus aureus* (red) and *Escherichia coli* (blue) by fractions S4 (Figure 8(A)) and S7 (Figure 8(B)).

and M1b. Using MS we found that fraction M1a is  $\beta$ -alanyl-tyrosine (Mr 252.11) and that fraction M1b is a compound with a higher Mr (414.28). The structure of the compound in fraction M1b was determined by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. Proton and carbon NMR data are summarized in Table 1. We concluded that fraction M1b is, with a high probability,  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine with D-fructose attached to its N-terminus ( $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine, see Figure 10). We also synthesized this compound using Amadori rearrangement [47] (see Methods) and found the NMR spectra of the native and synthetic pairs were identical.

Dipeptide  $\beta$ -alanyl-tyrosine has already been identified in *Neobellieria (Sarcophaga) bullata* by Meylaers *et al.* [20]. The authors found that this compound displays antimicrobial activity in the range 8–30 mM. For this reason we decided to test the antimicrobial activity of fraction M1, synthetic  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine and several synthetic analogs at higher concentrations than 1 mg/ml (4 mM). Fraction M1b and synthetic  $\beta$ -D-fructose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine were also tested for their

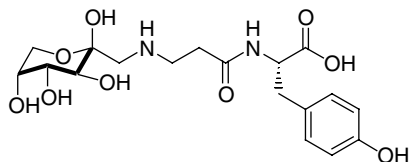




**Figure 9** RP-HPLC separation of FFE-prepurified fraction M1. Injection of 30  $\mu$ g of crude material. The isolated peaks are marked as M1a and M1b. For details, see Methods.

antimicrobial activity. All compounds together with their antimicrobial activities are listed in Table 2.

We succeeded in determining the MIC for some of the  $\beta$ -alanyl-tyrosine derivatives against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*. Fraction M1, a mixture of M1a and M1b, inhibited microorganisms with MIC in the range of 10–15 mM. Interestingly, synthetic  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH was more active against all microorganisms than fraction M1 as well as synthetic  $\beta$ -alanyl-D-tyrosine-OH. Acetylation of the *N*-terminus of  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH had a slightly negative effect



**Figure 10** Structure of  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine.

**Table 2** Antimicrobial activities of  $\beta$ -alanyl-tyrosine and its analogues. The MIC is defined as the lowest final concentration of the compound, at which no growth is observed during exponential phase of the bacteria growth. NI means no inhibition at 5 mM concentration

Compound	MIC (mM)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
M1	10	15	15
$\beta$ -Ala-L-Tyr-OH	6	7.5	6
$\beta$ -Ala-D-Tyr-OH	8.5	15	15
<i>N</i> -Ac- $\beta$ -Ala-L-Tyr-OH	8.5	8.5	8.5
<i>N</i> -Ac- $\beta$ -Ala-L-Tyr-NH <sub>2</sub>	>20	>20	>20
$\beta$ -Ala-L-Tyr-NH <sub>2</sub>	≫ 20	≫ 20	≫ 20
M1b	NI	NI	NI
D-fructopyranose- $\beta$ -Ala-L-Tyr-OH	NI	NI	NI

on the antimicrobial activity compared to  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH. Amidation of the *C*-terminus resulted in the loss of activity of respective derivatives *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH and *N*-Ac- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-NH<sub>2</sub>. Isolated (M1b) and synthetic D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine-OH were inactive at the highest dose used (5 mM).

### Characterization of Active Protein and Peptide Fractions

Active protein and peptide fractions S4, S7, and M13–M15 were further analyzed by MALDI-TOF-MS and ESI-TOF-MS to determine the exact relative molecular weights of the respective peptides and proteins. The data are summarized in Table 3 and are compared with the data obtained from gel electrophoresis.

Antimicrobially active protein and peptide fractions were further characterized to identify respective peptides and proteins. Protein spots were excised from SDS gels, digested by trypsin or chymotrypsin, and analyzed by MALDI-MS. Alternatively, proteins were submitted to the *N*-terminal sequencing after electroblotting into PVDF membrane. The resulting peptide sequences were analyzed by searching available protein databases (Swissprot or Uniprot). Results are shown in Table 4.

The sequence of protein in fraction S4 revealed about 50% identity with odorant-binding protein 99b (OBP99b) from *Drosophila melanogaster*. The protein in fraction S7 was identified as transferrin both by enzymatic digests/MALDI-MS and by *N*-terminal sequencing. Comparing the obtained sequence with available protein databases did not allow identifying peptide(s) from fraction M13. The sequence of peptide in fraction M15 is almost identical to the sequence of antimicrobial peptide sapeцин from *S. peregrina*. The same is true for the short sequence of peptide in fraction M14. The results obtained from *N*-terminal sequencing of fractions M14 and M15 were confirmed by MALDI-MS analysis of chymotryptic digests.

**Table 3** Determination of relative molecular weight (Mr) of peptides and proteins by direct mass spectrometry analysis or by SDS gel electrophoresis. Mr<sub>Tris-PAGE</sub> or Mr<sub>Tricine-PAGE</sub> means that the SDS-electrophoresis was performed in Tris or Tricine-buffered system, respectively

Fraction name	Mr <sub>Tris-PAGE</sub>	Mr <sub>Tricine-PAGE</sub>	Mr <sub>ESI-MS</sub>	Mr <sub>MALDI-MS</sub>
S4	19 000	—	16 783	16 777
S7	69 000	—	69 097	69 549
M13	10 000	10 000, 6000	4808, 3498	4813
M14	12 000, 5000	10 000, 4000	3754	3714, 9632
M15	12 000, 5000	10 000, 4000	4060	4060, 9630

**Table 4** Identification of active protein fractions by N-terminal sequencing or MALDI-MS of tryptic digests

Fraction	N-terminal sequencing		Tryptic digest MS/NP/SC	Chymotryptic digest MS/NP/SC
S4	DHHEGHHEHHEHDTXEYVVKTQQDLVKYRE DXGAKLXVSXELMXKYKNE	OBP99b	Unidentified	Unidentified
S7	EEQTYMCV	Transferrin	Transferrin 84/9/12	Transferrin 72/16/22
M13	AIAMARSN	Unidentified	Unidentified	Unidentified
M14	ATXDLLSG	Sapcein	Unidentified	Unidentified
M15	ATXDLLSGTGINHSAXAAHXLLRGNRGGY XNGKGVXVXRN	Sapcein	Unidentified	Sapcein 69/3/72

MS, Mascot score; NP, number of peptides assigned; SC, sequence coverage in %

## DISCUSSION

We attempted to isolate and identify new antimicrobial compounds from hemolymph of larvae of *Sarcophaga bullata*, which is in some studies, assigned as *Neobellieria bullata*. However, both names belong to the same fleshly species. We used third-instar larvae in their wandering period. The larvae were injected with bacterial suspensions of *E. coli* or pricked by an entomological needle to induce an immune response and production of antimicrobial compounds. The induction of larvae with other bacteria gave very similar results.

Supernatant 1 (Figure 1) as well as both pellets 2 (after ammonium sulfate or acidified methanol precipitation) contained one major 75-kDa protein as revealed by electrophoretic analysis (data not shown). We identified this protein as prophenoloxidase, a zymogen, which is processed to phenoloxidase (EC 1.14.18.1). This result shows that prophenoloxidase is a major protein in *S. bullata* larvae hemolymph. The most immediate immune response within minutes is the activation of the prophenoloxidase-activating enzyme that converts prophenoloxidase to phenoloxidase [33]. Phenoloxidase is an enzyme involved in melanin biosynthesis and is also important in cuticular sclerotization, wound healing, and in the encapsulation of foreign material [49].

We did not detect any antimicrobial activity of prophenoloxidase in our study.

Using C-18 cartridges, supernatants 2 were separated into hydrophilic and hydrophobic fractions. The hydrophilic fraction obtained after precipitation with acidified methanol contained one major compound (peak M1, Figure 2), which was identified as dipeptide  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine. The hydrophilic fraction obtained after ammonium sulfate precipitation contained a high concentration of salts and was not further analyzed. However, it is highly probable that this fraction also contained  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine as a major component. Both hydrophobic fractions also contained a major peak with a short retention time, M1 or S1 as shown in Figures 2 and 4, respectively. We again identified dipeptide  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine in both peaks M1 and S1.

Considering the above-described results, it is clear that major peptide/protein components in *S. bullata* hemolymph are enzyme prophenoloxidase and dipeptide  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine. Both these two compounds have an important role in larvae melanization [49]. Other roles, especially in larvae antimicrobial defense, will be discussed later.

On the other hand, regardless of the fact that chromatograms shown in Figures 2 and 4 both have major peaks M1 and S1 ( $\beta$ -alanyl-L-tyrosine), they

differ significantly in other peaks. Figure 4 shows that fractions M7–M19 contain peptides or small proteins of Mr about 3–15 kDa. Among fractions S3–S9 we found proteins of higher Mr in S4, S7, and S9 (15–75 kDa). It means that acidified methanol treatment does not precipitate smaller proteins from hemolymph and that ammonium sulfate precipitation (saturation to 70%) allows detection of larger proteins in the supernatant. Both precipitation protocols are thus complementary and enable detection of different proteins or peptides.

We identified dipeptide  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine in fractions M1 and S1. Its structure was confirmed by MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and the L-form of tyrosine by capillary electrophoresis using chiral selectors. This compound has previously been found in *S. (N.) bullata* by Levenbook *et al.* [50] and Meylaers *et al.* [20]. Levenbook *et al.* also proposed that tyrosine is present in its L-form by comparing specific rotation with the synthetic dipeptide.  $\beta$ -Alanyl-tyrosine is known to cause paralysis in adult insects but it is not toxic for larvae where its concentration changes significantly during development with highest levels (around 20 mM) reached just before puparization [51,52]. The role of this dipeptide in larvae melanization and puparization is highly probable [50,53] and is in agreement with our finding that prophenoloxidase and  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine are the most abundant species in the hemolymph of third-instar larvae of *S. bullata* in the wandering period.

Meylaers *et al.* [20] detected an antimicrobial activity of  $\beta$ -alanyl-tyrosine against various bacteria at 8–30 mM concentration range. They also prepared several inactive analogs of this compound. In our study, we found  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine slightly more active (MICs in the range of 6–15 mM) than Meylaers *et al.* [20]. The reason for this difference may be due to the sensitivity of microorganisms or the high hygroscopicity of the dipeptide. This is why we determined the concentration of  $\beta$ -alanyl-tyrosine and its analogs based on the absorption of tyrosine (see methods). In the course of capillary electrophoresis analyses of fraction M1 we found an admixture, which was then identified as  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine. We have not detected any antimicrobial activity of this compound in our experiments. This may explain the somewhat weaker potency of fraction M1 to inhibit bacterial growth compared to synthetic  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine. We tested fraction M1b and synthetic  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine only up to 5 mM concentration (2.25 mg/ml). To achieve a higher concentration it would be necessary to isolate more of the compounds, which is difficult to achieve due to the laborious and difficult separation of fractions M1a and M1b (Figure 9). This was also the case of synthetic  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine because the reaction (see Methods) results in the 1:1 equilibrium of  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine and the product. Concerning other  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine analogs, we can observe a slightly negative effect

of *N*-acetylation and a highly negative effect of the C-terminus amidation. L-Tyrosine is more favorable for antimicrobial activity of  $\beta$ -alanyl-tyrosine than D-tyrosine. We agree with Meylaers *et al.* [20] that a weak antimicrobial activity of  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine could have physiological relevance due to its high concentration in larvae hemolymph (20 mM according to Levenbook *et al.* [50]).  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine can be a reaction product of highly abundant  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine with D-glucose, which is certainly present in larvae bred on beef liver. Both compounds readily react following Amadori rearrangement [47]. It is also possible that  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine can possess antimicrobial effect or other roles against other microorganisms than tested in this study.

Among all isolated fractions, only fractions M13–M15 and fractions S4 and S7 displayed antimicrobial activity below 1 mg/ml. We were not able to determine MICs for all fractions against tested microorganisms due to the difficulty of isolating sufficient amounts of the material.

Proteins in fractions S4 and S7 inhibited the growth of *S. aureus* more potently than the growth of *E. coli* (Figure 8). We can conclude from the available data that the MIC of fraction S4 against *S. aureus* is between 80 and 115  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Active protein in fraction S4 has been partially characterized. The 50 amino acid *N*-terminal sequence of this 16-kDa reveals about 50% sequence identity to odorant-binding protein 99b (OBP99b, CG7592-PA) from *D. melanogaster*. It is probable that protein S4 is a *S. bullata* homologue of *Drosophila*'s OBP99b. The difference in the *N*-terminal sequence may be due to the low homology between *Drosophila* and *S. bullata* proteins. To further substantiate the identification of this potential *S. bullata* OBP99b we amplified the cDNA sequence of the 'potential' gene with PCR using a degenerated primer designed according to the *N*-terminal amino acid sequence of protein S4 (Table 3). PCR amplicon approximately 500 bp long was isolated and sequenced. However, only partial nucleotide sequence was readable (data not shown). Comparing the obtained sequence with *Drosophila* nucleotide sequences has not revealed any significant homology. Further experiments to identify the respective gene are in course.

OBPs are abundant, small, soluble proteins that are believed to participate in odor detection by facilitating or restricting access of the odorant to the receptors. There are 51 OBP genes in *Drosophila* [54]. We have not found any report concerning antimicrobial activity of odorant-binding proteins. Levy *et al.* [55] showed that OBP99c in *Drosophila* was specifically over-expressed after fungal infection but repressed after bacterial infection. In our study we did not find any significant induction of protein S4 after bacterial induction of larvae. Chromatograms from induced and noninduced larvae were essentially the same (Figure 5). It will be interesting to produce higher quantity of recombinant

OBP99b and to investigate its antimicrobial activity and mode of action more in detail using different methods and microorganisms.

Protein in fraction S7 was identified as transferrin by *N*-terminal sequencing and MS analysis of tryptic digest. Transferrin is involved in the immune response of vertebrates and invertebrates [56,57]. It can inhibit bacterial growth by reducing free iron levels [58]. If we consider that both fractions S4 (probably *S. bullata* OBP99b) and S7 (transferrin) consisted of pure proteins of 16 and 70 kDa, respectively, the inhibition of bacterial growth as displayed in Figure 8 was achieved at low micromolar concentrations.

Fraction M13 inhibited the growth of *P. aeruginosa* but not the growth of *E. coli*. It seems that fraction M13 has bactericidal antibacterial effect against *P. aeruginosa* with an MIC value lower than 1 mg/ml (Figure 7(A)). The basis for the different susceptibilities of bacterial species against particular peptides is not clear [2]. One hypothesis that explains different bacterial sensitivities to antimicrobial peptides is due to the different lipopolysaccharide composition in the outer membranes of bacteria or different resistance mechanisms [25]. We have not succeeded in identifying the peptide in fraction M13 either by *N*-terminal sequencing or by tryptic or chymotryptic digests. The identification was complicated with low amount of isolated material.

Using *N*-terminal sequencing, we determined the entire amino acid sequence (40 amino acids) of peptide in fraction M15, but we succeeded in determining only ten *N*-terminal amino acids in fraction M14. Provided that cysteines are in positions X (Table 4), the sequence of peptide M15 almost completely matches with *S. peregrina* sapecin [59]. The only difference is in the position 34 (G for *S. bullata* and A for *S. peregrina*). We suppose that active peptide M15 is a *S. bullata* homologue of *S. peregrina* antimicrobial peptide sapecin. The theoretical relative molecular weight (Mr) of peptide M15 is 4060 (provided that X residues are cysteines forming disulfide bridges, Table 4) and is in perfect agreement with the experimental value 4060 obtained with ESI/MALDI-MS (Table 3). In the case of fraction M14, we found signals 3754 (ESI-MS) and 3714 (MALDI-MS), which match neither with the Mr of peptide M15 shortened by two or by three amino acids nor with sapecin C from *S. peregrina* [60] and its possible fragments. We also performed MS-MS analysis of fraction M14 to determine if this peptide is or is not *N*-terminal fragment of peptide M15 or other sapecin, but these experiments were not successful.

Sapecin, which consists of 40 amino acids, is an insect defensin and can inhibit the growth of G+ bacteria. Sapecin is the first identified defensin in *S. peregrina* and was isolated from the embryonic cell line NIH-Sape-4 by Matsuyama and Natori [61]. Both fractions M14 and M15 inhibited the growth of *S.*

*aureus*, which is in agreement with the data of Yamada and Natori [62]. Peptide in fraction M14 displays lower antibacterial potency than peptide M15 (Figure 7(B)) and it is not excluded that the peptide in M14 is a *S. bullata* homologue of *S. peregrina* sapecin C [60] or its fragment.

In M1–M19, obtained after acidic methanol precipitation, we detected the induction of fractions M13–M15 (Figure 3). However, we have not detected the induction of any of fractions S1–S9 obtained after ammonium sulfate precipitation (Figure 5). Using RT-qPCR technique we confirmed the massive induction of sapecin (M15 and M14) and also a moderate induction of transferrin (S7) (unpublished results, manuscript in preparation).

Insect immune response is a complicated process. Antimicrobial peptides frequently act synergistically; some proteins have transporter functions; peptide inhibitors can block processing enzymes involved in activating cascades or different enzymes can activate antimicrobially active proteins or peptides. In this study we presented two different isolation protocols, which resulted in the identification of several already known and two novel antimicrobial proteins or peptides from the hemolymph of fleshfly *S. bullata*. We hope that our study will shed more light into the complicated process of immune response in *S. bullata* larvae.

## Acknowledgements

The project was supported by Grants 203/05/0832 (to B.K.) and 203/05/2539 (to V.K.) of the Grant Agency of the Czech Republic, by the Chemical Genetics Consortium No. LC060777 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (to J.J.) and by the Research Project Z4 055 0506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. We thank to Dr. Miroslav Ledvina (IOCB) for the help with the synthesis of  $\beta$ -D-fructopyranose- $\beta$ -alanyl-L-tyrosine and to Mrs. Jarmila Titzenthalerová (IOCB) for the breeding of fleshfly larvae.

## REFERENCES

1. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 2004; **198**: 169–184.
2. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; **415**: 389–395.
3. Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; **349**: 418–422.
4. Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; **23**: 494–496.
5. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Int. Med.* 2003; **254**: 197–215.
6. Ryge TS, Hansen PR. Novel lysine-peptoid hybrids with antibacterial properties. *J. Pept. Sci.* 2005; **11**: 727–734.
7. Tossi A. AMPs database, 2007; <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html>.
8. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981; **292**: 246–248.

9. Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 1998; **47**: 465–477.
10. Okada M, Natori S. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.* 1983; **211**: 727–734.
11. Yamauchi H. Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer, *Anomala cuprea*: purification, amino acid sequences and antibacterial activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001; **32**: 75–84.
12. Gobbo M, Biondi L, Filira F, Gennaro R, Benincasa M, Scolaro B, Rocchi R. Antimicrobial peptides: synthesis and antibacterial activity of linear and cyclic drosocin and apidaecin 1b analogues. *J. Med. Chem.* 2002; **45**: 4494–4504.
13. Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Vandorsaelaer A, Hoffmann JA. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 14893–14897.
14. Otvos L. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; **59**: 1138–1150.
15. Goumon Y, Lugardon K, Gadroy P, Strub JM, Welters ID, Stefano GB, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 38355–38362.
16. Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 2001; **22**: 285–288.
17. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; **93**: 412–416.
18. Leem JY, Nishimura C, Kurata S, Shimada I, Kobayashi A, Natori S. Purification and characterization of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 13573–13577.
19. Leem JY, Jeong IJ, Park KT, Park HY. Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki*. *S. FEBS Lett.* 1999; **442**: 53–56.
20. Meylaers K, Cerstiaens A, Vierstraete E, Baggerman G, Michiels CW, De Loof A, Schoofs L. Antimicrobial compounds of low molecular mass are constitutively present in insects: characterisation of beta-alanyl-tyrosine. *Curr. Pharm. Des.* 2003; **9**: 159–174.
21. Fogaca AC, da Silva PI, Miranda MTM, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PEM, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 25330–25334.
22. Huang HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 2000; **39**: 8347–8352.
23. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1999; **1462**: 55–70.
24. Silvestro L, Weiser JN, Axelsen PH. Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**: 602–607.
25. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003; **55**: 27–55.
26. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 2001; **40**: 3016–3026.
27. Otvos LOI, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 2000; **39**: 14150–14159.
28. Basak A, Ernst B, Brewer D, Seidah NG, Munzer JS, Lazure C, Lajoie GA. Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1. *J. Pept. Res.* 1997; **49**: 596–603.
29. Verbanac D, Zanetti M, Romeo D. Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors. *FEBS Lett.* 1993; **317**: 255–258.
30. Yan H, Hancock RE. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; **45**: 1558–1560.
31. Dimarcq JL, Hunneyball I. Pharma-entomology: when bugs become drugs. *Drug Discov. Today* 2003; **8**: 107–110.
32. Otvos L. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* 2000; **6**: 497–511.
33. Royet J. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Mol. Immunol.* 2004; **41**: 1063–1075.
34. Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2000; **30**: 953–967.
35. Leclerc V, Pelte N, Chamy LE, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, Reichhart JM. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 2006; **7**: 231–235.
36. Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 1998; **62**: 59–66.
37. Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005; **38**: 128–150.
38. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol.* 2002; **3**: 121–126.
39. Hultmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; **15**: 12–19.
40. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002; **5**: 102–110.
41. Leclerc V, Reichhart JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Rev.* 2004; **198**: 59–71.
42. Fraenkel G. Molting and development in undersized fly larvae. In *The Insect Integument*, Hepburn AR (ed.). Elsevier: Amsterdam, 1976; 323–338.
43. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; **25**: 697–743.
44. Zdarek J. Endocrine control of the pupariation behavior in flies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1980; **40**: 361–361.
45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
46. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; **166**: 368–379.
47. Mossine VV, Glinsky GV, Feather MS. The preparation and characterization of some Amadori compounds (1-amino-1-deoxy-D-fructose derivatives) derived from a series of aliphatic omega-amino acids. *Carbohydr. Res.* 1994; **262**: 257–270.
48. Kasicka V, Prusik Z, Sazelova P, Jiracek J, Barth T. Theory of the correlation between capillary and free-flow zone electrophoresis and its use for the conversion of analytical capillary separations to continuous free-flow preparative processes. Application to analysis and preparation of fragments of insulin. *J. Chromatogr., A* 1998; **796**: 211–220.
49. Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 2002; **15**: 2–9.
50. Levenbook L, Bodnaryk RP, Spande TF. Beta-alanyl-L-tyrosine. Chemical synthesis, properties and occurrence in larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata* Parker. *Biochem. J.* 1969; **118**: 837–841.

51. Chiou SJ, Cerstiaens A, Kotanen SP, De Loof A, Schoofs L. Insect larvae contain substances toxic to adults: the discovery of paralytins. *J. Insect Physiol.* 1998; **44**: 405–411.
52. Chiou SJ, Kotanen S, Cerstiaens A, Daloz D, Pasteels JM, Lesage A, Drijfhout JW, Verhaert P, Dillen L, Claeys M, De MH, Nuttin B, De LA, Schoofs L. Purification of toxic compounds from larvae of the gray fleshfly: the identification of paralytins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **246**: 457–462.
53. Dunn PE, Fader RG, Regnie FE. Metabolism of beta-Alanyl-L-Tyrosine in *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.* 1977; **23**: 1021–1029.
54. Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, Mckinney AJ, Tanouye MA. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Lab. Press* 2002; **12**: 1357–1369.
55. Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol. Cell Proteomics* 2004; **3**: 156–166.
56. Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH. *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur. J. Biochem.* 1999; **260**: 414–420.
57. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; **25**: 101–115.
58. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov. Today* 2005; **10**: 267–273.
59. Hanzawa H, Shimada I, Kuzuhara T, Komano H, Kohda D, Inagaki F, Natori S, Arata Y. H-1 nuclear-magnetic-resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Lett.* 1990; **269**: 413–420.
60. Yamada K, Natori S. Purification, Sequence and antibacterial activity of 2 novel sapecin homologs from *Sarcophaga* embryonic-cells – similarity of sapecin-B to charybdotoxin. *Biochem. J.* 1993; **291**: 275–279.
61. Matsuyama K, Natori S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 17112–17116.
62. Yamada K, Natori S. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. *Biochem. J.* 1993; **291**(Pt 1): 275–279.

**Gene expression responses in larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata* upon immune stimulation**

Alice Mášová<sup>1</sup>, Radek Šindelka<sup>2</sup>, Mikael Kubista<sup>2</sup>, Jiří Kindl<sup>1</sup> and Jiří Jiráček<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Biotechnology, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic

Email: Alice Mášová - masova@uochb.cas.cz; Radek Šindelka - sindelka@img.cas.cz;

Mikael Kubista - mikael.kubista@img.cas.cz; Jiří Kindl - kindl@uochb.cas.cz; Jiří Jiráček<sup>\*</sup> - jiracek@uochb.cas.cz

<sup>\*</sup>Corresponding author

## Abstract

---

**Background:** Insect larvae develop in decaying organic matter and their defense against various microorganisms must therefore be highly efficient. Recently, we published a study mapping the immune response in larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. We have described the isolation and characterization of several antimicrobial compounds from the larval hemolymph. In the present study, we decided to explore the transcriptional kinetics and levels of induction of eight selected genes in *Sarcophaga bullata* larvae after infection or injury.

**Results:** Using real-time PCR, we studied the time-dependent immune response of larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. We compared levels of mRNA expression of eight selected genes in induced and non-induced larvae. The third-instar larvae of *Sarcophaga bullata* were induced by injection with a bacterial suspension of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*, or by simple aseptic injury with an entomological pin. We used intact larvae as a control to distinguish basal mRNA expression. Total RNA was isolated from the whole body, fat body and hemocytes. We determined the mRNA expression of genes encoding sapecin, transferrin, prophenoloxidase 1 and 2, storage-binding protein, cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease.

**Conclusion:** We found that there was a massive up-regulation of genes encoding the fleshly peptide sapecin, and also the protein transferrin in all organs studied. We also detected down-regulation, or no change in the expression of the genes that encode prophenoloxidase 1 and 2, storage-binding protein, cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease.

---

## Background

Insects and microorganisms co-exist within the biosphere and interact in numerous ways. Often, insect larvae develop in decaying organic matter and their defense against various



microorganisms must therefore be highly efficient. The first line of defense consists of physical barriers such as the outer exoskeleton, and the chitinous linings of the gut and trachea. At the molecular level, insects have developed an efficient host defense against microorganisms that involves both humoral and cellular mechanisms [1].

Rapid humoral response reactions are triggered by injury and microbial infection. The humoral response includes the production of lectins and rapid *de novo* synthesis of antimicrobial peptides by the fat body, which is the functional homologue of the mammalian liver, as well as by hemocytes and surface epithelia [2,3]. Studies in *Drosophila* mutants have revealed that the Toll and Imd pathways control the synthesis of specific antimicrobial peptides. The Toll pathway is activated by, and reacts against G-positive bacteria and fungi. The Imd pathway governs defense reactions against G-negative bacteria [4-7]. Blood coagulation is one of the most important defense reactions of insects that prevents the animal from bleeding when injured, and aids in limiting the spread of microbes in the hemocoel [8].

Cellular defense is provided by insect blood cells, called hemocytes. In *Drosophila*, there are three classes of hemocytes that have different and specialized functions, the plasmocytes, crystal cells and lamelocytes. Plasmocytes are responsible for the phagocytic removal of dead cells and microbial pathogens. Lamelocytes have a role in the encapsulation and neutralization of objects that are too large to be phagocytosed. Crystal cells serve as storage cells for the large amount of prophenoloxidase (PPO) that is present in a crystallized form in their cytoplasm, and they also contain enzymes for PPO activation [1].

Recently, we published a study mapping the immune response in larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata* [9]. We have described the isolation and characterization of antimicrobial

compounds from the larval hemolymph. The larvae of fleshfly were injected with a bacterial suspension. The hemolymph from injected and control larvae was separated by different protocols and the results were compared. The RP-HPLC analysis showed induction of proteins/peptides with antimicrobial activities (e.g., sapecins). We also found antimicrobial active proteins (e.g., transferrin) without noticeable microbial induction. However, in this previous study [9], we only determined protein and peptide responses, and did not analyze the mRNA expression patterns of the genes that encode the proteins of interest.

Several studies using northern blot expression profiling in *Drosophila* have reported novel peptides and proteins with insect antimicrobial activity [10-12]. Recently, large-scale analyses at the levels of the transcriptome (microarrays) and proteome have revealed that in addition to peptides with direct antimicrobial activities, the production of many other peptides and proteins are upregulated after septic injury of *Drosophila* [13-18].

In the present study, we decided to explore the transcriptional kinetics and levels of induction of eight selected genes in *Sarcophaga bullata* larvae after infection or injury. We determined the mRNA expression of genes encoding sapecin, transferrin, PPO 1 and 2, proteins, which we examined at protein level in our recent study [9]. Simultaneously, we analyzed levels of RNA induction of storage-binding protein, cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease, proteins for which cDNA sequences in *Sarcophaga bullata* were available.

Tranferrin is a protein involved in the immune response of vertebrates and invertebrates [19]. Transferrin can inhibit bacterial growth by reducing free iron levels [20]. Termite transferrin gene expression has been shown to be increased upon infection [21]. Its upregulation in response to infection has also been detected in *Drosophila* [15,19]. However, in our previous

study [9] we have not detected the induction of transferrin at protein level and thus we were interested in investigating changes in transferrin RNA after the immune challenge.

Sapecins, or defensins, are well studied insect antimicrobial peptides. Sapecin was the first identified defensin in *Sarcophaga peregrina*, and was isolated from the embryonal cell line NIH-Sape-4 by Matsuyama and Natori [22]. Matsuyama et al. also investigated the expression of the gene for sapecin precursor protein after damage of the larval body wall and found that sapecin precursor RNA is activated in *Sarcophaga peregrina* hemocytes [11]. Expression of the defensin gene during normal development and after bacterial challenge was analyzed by northern blot analysis in *Drosophila* [10]. The pattern of induction of the defensin gene in housefly (*Musca domestica*) was studied by Wang et al. [23] who found defensin mRNA induction in fat body and epidermis. Recently, we found induction of sapecin protein in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae [9]. In this study, we decided to investigate also levels of *Sarcophaga bullata* sapecin mRNA.

The most immediate immune response in insects occurs within minutes and consists of the activation of prophenoloxidase activating enzyme (PPAE), which converts enzymatically inactive PPO into active phenoloxidase. PPAE also exists as an inactive zymogen that is activated by a serine protease [24,25]. Phenoloxidase is an enzyme involved in melanin biosynthesis and is also important in cuticular sclerotization, wound healing and encapsulation of foreign material [26]. Steady levels of PPO mRNA have been monitored in the *Drosophila melanogaster* hemocyte-like cell line mbn-2 after induction by crude lipopolysaccharides, or by *Escherichia coli* bacteria [8]. In our previous study [9] we detected very high levels of PPO protein in both immune challenged and control *S. bullata* larvae

hemolymph and it was not clear if PPO is induced or not. That is why we included PPO gene into the present study of *S. bullata* RNA expression.

We decided to analyze another four genes with putative roles in the immune defense of *Sarcophaga bullata* larvae for which cDNA sequences in *Sarcophaga bullata* were available; storage-binding protein (SBP), cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease. Storage-binding protein or arylphorin-binding protein is believed to participate in the selective uptake of arylphorin, a storage protein with a high content of aromatic amino acids, from hemolymph to the fat body. Storage proteins are used as sources of amino acids and energy to construct adult structures during insect metamorphosis [27] and might be involved also in the response to bacterial infection. Cathepsin L is a lysosomal enzyme that may be involved in degradation of phagocytosed microorganisms [15]. Sarcocystatin is an inhibitor of cysteine proteases and was identified in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae [28]. The 26/29 kDa protease is secreted by hemocytes into the hemolymph when the larvae of *Sarcophaga peregrina* are injected with foreign cells [29]. Proteases, their inhibitors or SBP are certainly very interesting targets for the study of the possible role of these proteins in insect immune response and that is the reason we included them into this study.

Since Northern blot analysis and microarrays have mainly been used to monitor gene expression profiles in *Drosophila*, we used real-time quantitative PCR in this study for a more precise estimation of comparative transcriptional rates of the genes encoding eight selected proteins in the larvae of *Sarcophaga bullata*.

## **Results**

### **Isolation of RNA from larvae**

Total RNA was isolated from the whole bodies, hemocytes and fat bodies of induced and control larvae. Agarose gel analysis of the total RNA showed that there was one broad band containing the 18.7, 18.0 and 17.4S rRNAs, and a weaker band that contained the 5.8S rRNA (Figure 1A). The 18.7S and 17.4S fragments result from the cleavage of 26S rRNA. Similar results regarding the sizes of the two fragments have previously been reported by French et al [30] (Figure 1).

### **Comparison of levels of gene expression in induced and control larvae using qPCR**

#### **Whole body**

Levels of gene expression in the whole bodies of *Sarcophaga bullata* larvae were compared between induced and control larvae. Figure 2 shows the expression of the eight different genes that encode sapecin, transferrin, PPO1, PPO2, storage-binding protein (SBP), cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 KDa protease at 3, 6, 15 and 22 hours after induction. The data are presented as ratios of gene expression between the induced and control larvae. Larvae were induced using four different stimuli, the G-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, two different G-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, or injury with a sterile entomological pin.

According to the differential responses to immune stimulation, we can divide the genes studied into two groups. The transcription of sapecin and transferrin genes was rapidly increased after all four types of induction. The expression of transferrin gradually increased, reaching a maximum at 22 hours after induction, and mRNA levels were increased

approximately 25-50 fold. Sapecin expression was increased up to 125-250 fold at 12 hours after induction.

In contrast, expression of the genes encoding PPO1, PPO2, cathepsin L, storage binding protein (SPB) and sarcocystatin was suppressed, or fluctuated around the normal level. The expression ratio of PPO1 and PPO2 transcripts decreased 2-5 fold in induced larvae compared to controls upon stimulation. The expression of the genes that encode cathepsin L, SPB and sarcocystatin also decreased slightly. The mRNA level of the 26/29 kDa protease remained essentially unchanged.

Expression profiles for all studied genes showed no significant differences between G-positive infection, G-negative infection or mechanical aseptic injury and therefore we used only the induction with the suspension of *E. coli* in further experiments.

### **Fat body**

Larval fat bodies were isolated from larvae induced only by injections with a bacterial suspension of *E. coli*. RNA from the larval fat bodies was isolated at 0.5, 6 and 22 hours after induction. The expression of the eight selected genes was measured in induced and control larvae.

The levels of sapecin and transferrin in the induced subjects were increased almost 80 and 35-fold, compared to the control larvae, respectively (Figure 3A). PPO1, PPO2 and SBP expression decreased about 2.5-fold upon induction (Figure 3B). The levels of sarcocystatin and cathepsin L mRNA decreased even more significantly (Figure 3B). The mRNA level of 26/29 kDa protease remained unchanged (Figure 3B).

## **Hemocytes**

Time-dependent expression analysis in hemocytes of *Sarcophaga bullata* larvae after induction with *E.coli* suspension is shown in Figure 4. The expression of the eight genes of interest was measured at 3, 6 and 22 hours after induction.

Sapcecin and transferrin expression increased 13 and 11-fold, respectively, 6 hours after induction. PPO1 expression decreased approximately 2-fold. The expression of the genes that encode PPO2, SBP, cathepsin L, sarcocystatin, and the 26/29 kDa protease were not significantly affected by induction.

## **Discussion**

In this study, we investigated the transcriptional kinetics and levels of induction of eight selected *Sarcophaga bullata* larvae genes after the infection of larvae with different bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), and after the mechanical injury of larvae with a sterile entomological pin. We investigated mRNA expression of respective genes in the whole body, fat body and hemocytes of *Sarcophaga bullata* larvae.

We observed no significant differences in the expression profiles of all studied genes between the induction with Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) or with Gram-positive-bacteria (*S. aureus*) in larvae whole body. The sensitivity of the immune response of larvae or adult insects to bacteria may certainly be influenced by different pathogenicity of individual bacterial strains and species [31]. Irving et al. [18] also found that Gram-positive infection had a similar effect to Gram-negative infection in their study of adult *Drosophila* immune

responses. In our experiments with the larvae whole body, the expression of the analyzed genes was also similarly affected by different bacteria and by mechanical aseptic injury of the larval body wall without bacterial infection. Lemaitre et al. [12] also observed a similar level of expression of antimicrobial peptides (diptericin, attacin, cecropin A or drosocin) in adult *Drosophila* after the induction with aseptic injury or with Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus*. We believe that the main reason of similar gene expression response to immune challenge with different bacteria and with aseptic injury in our experiments is due to the fact that we worked with *S. bullata* larvae and not with adult flies. In most studies, scientists have focused upon the systemic immune response in adult flies (e.g., *Drosophila*). However, during their development, flies first develop through distinct larval stages that live within a highly septic environment, such as decaying organic matter, and adult flies are exposed less to these kinds of environments. Although a systemic immune response also exists in larvae, there are features that are specific to this developmental stage that cannot be extended to adults. These include a fat body that is distinct from that of adults, hormonal control of antimicrobial peptide gene expression (larvae must be accurately staged to avoid artefacts), and hemocytes that are more numerous in larvae than in adults. Therefore, the cellular immune response is likely to have a more important role in larvae [32]. It was also shown that *Drosophila* third-instar larvae in their wandering period are highly sensitive to septic injury due to the 20-hydroxyecdysone-regulated genomic response [33-36]. All these specificities of fly larvae, compared to adult flies, might cause the high sensitivity of larvae to simple aseptic injury or the same response to challenge with Gram-positive or Gram-negative bacteria.

Transferrin is abundant in insect hemolymph and is generally believed to be a product of the insect fat body. However, transferrin is also known to be expressed in other cells, such as neuronal cells of the honeybee *Apis mellifera* [37]. In our study, we observed an



approximately 50-fold increase of transferrin expression 22 h after bacterial infection or injury in the larval whole body, and a 35-fold increase in the fat body. We also detected upregulation of transferrin in larval hemocytes, where transferrin expression was increased 11-fold. Our results are in a good agreement with findings of other groups working with *Drosophila* transferrin which show a high amino acid identity to *dipterae* transferrins (sequence identity with *Sarcophaga peregrina* is about 63.5%). Yoshiga et al. [19] demonstrated that when adult *Drosophila*'s were inoculated with bacteria (*E. coli*), transferrin mRNA synthesis was markedly increased relative to controls both in sterile needle or bacteria challenged flies. The effect was monitored by Northern blot analysis 6, 12 and 24 hours after induction. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response using oligonucleotide microarrays detected an 11-fold induction of transferrin after septic injury [15]. A quantitative PCR assay confirmed a significant increase in termite transferrin expression following infection, suggesting that its up-regulation is part of the innate immune response. These results indicated a 2.5-3.5-fold increase in termite transferrin expression levels at 84 h after fungal infection [21]. Our results suggest that transferrin is more actively expressed in other organs than in the fat body, because the increase in expression was higher in the whole body. However, we did not identify the organs that may express transferrin more actively than the fat body. In our previous study [9] we have not detected the induction of *Sarcophaga bullata* transferrin protein in larvae hemolymph after the immune challenge. This result controverts with our present observation of massive transferrin mRNA induction. The reason of this discrepancy may be in relatively high basal levels of larvae transferrin compared to other antimicrobial proteins (e.g. sapecin, see bellow) or the possible damages of transferrin protein during purification process.

Among the eight genes studied, we observed the highest induction of the gene of sapecin (member of the defensin family). We detected the highest expression of sapecin in the whole body of *Sarcophaga bullata* larvae. In our previous study [9] we detected significant induction of sapecin protein in the larvae hemolymph. Our present results indicate that sapecin may also be expressed in other larval tissues apart from the fat body and hemocytes (Figs. 2-4). In contrast, the defensins in *Drosophila* are synthesized predominantly in the fat body and are secreted into the hemolymph [7]. In adult *Drosophila*, antimicrobial peptides are expressed in several epithelia that are potentially in contact with the environment. These include the respiratory tract, oral region, digestive tract, malpighian tubules, and the male and female reproductive tracts. Expression of *Drosophila* defensin can be also induced in the oral region of larvae [38]. Matsuyama et al. [11] investigated the expression of the gene for sapecin precursor protein 6 hours after damage of the *Sarcophaga peregrina* larval body wall by Northern blot analysis. Their results showed that hemocytes, as well as the fat body, respond to the injury and that hemocytes synthesize sapecin and secrete it into the hemolymph. We detected the highest expression of the gene that encodes sapecin in the whole body after 12 h, but in hemocytes, we were able to detect the highest expression after 6 h, and in the fat body, the highest levels of expression were only detected after 22 h. These differences may reflect different activation mechanisms of sapecin expression in various tissues. It was shown that the *Drosophila* defensin gene can be induced by various microorganisms, as well as by simple injury, and has been monitored by Northern blot analysis or RT-PCR [10,12]. A time course of transcription of defensin was monitored over 0-48 h after inoculation with two different bacteria in the housefly *Musca domestica*. The induction pattern of the defensin gene in housefly *Musca domestica* was similar to that observed in *Drosophila*, but was not exactly the same [23]. The transcription of defensin reached its highest level at 3 h in *Drosophila*, and at 36-48 h in *Musca domestica*. Our present

results indicate that the localization of sapecin expression and its timing may be different depending on organism studied.

The expression of the genes encoding prophenoloxidase (PPO) 1 and 2 in *Sarcophaga bullata* was slightly decreased, or unchanged in our study. In agreement with our finding, the steady levels of mRNA of the three prophenoloxidase genes of *Drosophila* have also been recorded by microarray analysis of immunized adult *Drosophila* [15], as well as of *Drosophila* hemocytes [8]. In insects, phenoloxidase-mediated melanin synthesis plays a major role in immune defense [26]. Mature crystal cells express PPO and store large amounts of PPO in their cytoplasm in a crystallized form. The inactive precursor of PPO is proteolytically activated by a serine protease cascade, which controls the amount of active phenoloxidase in the hemolymph [1]. Our results suggest that novel expression of PPO1 and PPO2 are not necessary for the acute immune response.

Storage-binding protein (SBP), also known as arylphorin-binding protein, is believed to participate in the selective uptake of arylphorin from the hemolymph into the pupal fat body during metamorphosis. Arylphorin is a storage protein with a high content of aromatic amino acids, and is used as a source of amino acids and energy to construct adult structures during insect metamorphosis [27]. The mRNA of the SBP gene was found to increase several times during pupation. In our study, we found that third-instar larvae have a slight decrease in the expression of the SBP gene after immune challenge. It is possible that an efficient response to infection, which involves intense synthesis of transcripts from a high number of genes, requires the repression of dispensable metabolic pathways.

In our experiments, the level of cathepsin L expression decreased in the whole body, and this effect was even more pronounced in the fat body. This is in contrast to the results of De Gregorio et al. [15], who observed up-regulation of the gene encoding cathepsin L in adult *Drosophila* challenged by septic injury. Cathepsin L is a lysosomal cysteine protease that may be involved in phagocytosis of invading microorganisms [15,39]. Liu et al. [40] reported higher cathepsin L gene expression in the larvae of the lepidopteran *Helicoverpa armigera* during moulting. Philip et al. [41] recently published the characterization of cathepsin L-like protease from *Sarcophaga peregrina*, which is involved in differentiation of imaginal discs. It is probable that cathepsin L-like proteases have a distinct role in the development of fly larvae and it is possible that the suppression of the respective gene expression takes place during bacterial infection or injury.

The mRNA level of 26/29 kDa protease remained nearly unchanged after immune challenge in our experiments. The 26/29 kDa protease has been shown to be secreted by hemocytes into the hemolymph when larvae of *Sarcophaga peregrina* are injected with foreign protein or cells [29,42]. Saito et al. [29], predicted that new mRNA synthesis, and therefore probably new protein synthesis, is not needed for secretion of this protease. The direct interaction between hemocytes and foreign substances probably triggers the release of the stored protein [29]. Our data do not support these findings and rather follow the trend, which we observed for cathepsin L gene. The exact role of cathepsin-like proteases in the immune response of sarcophagi larvae is still to be elucidated.

In our study, the expression of the gene that encodes sarcocystatin was decreased in the whole body and in the fat body, but it was not significantly affected by induction in hemocytes. Sarcocystatin is a low molecular mass cysteine protease inhibitor, that has previously been

found in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae [28]. The authors showed that the level of sarcocystatin progressively increased in third-instar larvae and continued to increase after pupation. In hemocytes, sarcocystatin selectively inhibits the activity of cysteine proteases, which digest most of the larval tissues during metamorphosis. Thus, sarcocystatin is thought to protect developing adult tissues in pupae from attack by cysteine proteases [43]. Sarcocystatin may also modulate the activity of cysteine proteases involved in the degradation of foreign proteins. In our study we observed the decrease in cathepsin-L expression after the immune challenge (see above). It is not excluded that the expression of cysteine protease inhibitors as sarcocystatin is closely related to the expression of targeted proteases and that follows the same trend upon bacterial infection.

## **Conclusion**

In conclusion, we found that there was a massive up-regulation of genes encoding the fleshly peptide sapecin, and also the protein transferrin in all larvae organs studied. We also detected down-regulation, or no change in the expression of the genes that encode prophenoloxidase 1 and 2, storage-binding protein, cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease. We hope that our study will help to shed more light into the complex processes of immune responses in *Sarcophaga bullata* larvae.

## **Methods**

The *Sarcophaga (Neobellieria) bullata* Parker fleshflies were reared under laboratory conditions as previously described [44]. We used third-instar larvae in their wandering period. Briefly, larvae of *S. bullata* were kept at 200-300 specimens per batch on beef liver in small open disposable packets made from aluminium foil at  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **Induction of larvae**

Before induction, larvae were immobilized by chilling on ice. A bacterial suspension was injected into the abdomen of larvae during their third-instar wandering period using a calibrated glass capillary with a finely drawn tip. Larvae were also induced by simple injury with a sterile entomological pin. We used *Escherichia coli* DBM 3001, *Staphylococcus aureus* DBM 3002 and *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3081 bacteria to induce larvae. Bacteria used for induction were cultivated in Luria-Bertani broth at 37°C or 28°C for 12 hours to the mid-exponential phase of growth, and a final concentration of cells of 10<sup>9</sup> cfu/ml. After cultivation, the cells were centrifuged at 3000 g for 10 min and washed twice with 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. The final suspension of cells in physiological saline was diluted to have an absorbance reading of 1.5-1.8 at 550 nm.

### **Isolation of hemocytes from larval hemolymph**

The hemolymph from induced and control larvae (hemolymph from 5 larvae in each isolation tube) was collected on ice at 3, 6, and 22 hours after induction. The hemocytes were separated from the hemolymph by centrifugation for 10 min at 1000 g at 4°C. The hemocytes were washed twice using 50 mM Hepes buffer pH 7.4 supplemented with 90 mM NaCl and then deep frozen.

### **Isolation of larval fat bodies**

The fat bodies were isolated from induced and control larvae at 0.5, 6, and 22 hours after induction. All larvae were anesthetized with CO<sub>2</sub>. The anterior and posterior tips of the third-instar larvae were cut off with fine scissors. The fat body was excised from the larvae under a binocular microscope and was placed into physiological saline in a Petri dish, which was placed on ice. The malpighian tubules and tracheas were carefully removed using tweezers.

### **Homogenization of larval whole bodies**

The whole bodies of induced or control larvae were collected at 3, 6, 12, and 22 hours after induction. At least two larvae for each time point and induction challenge were used. The larvae were deep frozen using liquid nitrogen and then homogenized to powder with a pre-cooled pestle and mortar.

### **RNA extraction**

Total RNA from hemocytes, fat bodies or whole bodies of *Sarcophaga bullata* fleshflies was extracted using 300  $\mu$ l (for hemocytes and fat bodies) or 1000  $\mu$ l (for whole bodies) of TriReagent (Molecular Research Center, Inc.), according to the manufacturer's instructions.

RNA samples were treated with a DNA-free kit (Ambion) to avoid genomic DNA contamination. The RNA concentration was determined by UV spectrophotometry at 260 nm, and the quality of the RNA samples was analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (Figure 1). The RNA samples were stored at -80°C.

### **cDNA preparation**

cDNA was synthesized using 1  $\mu$ g total RNA, 10 pmoles oligo25-dT and 10 pmoles random hexamers. The mixture was incubated at 72°C for 10 min. 100 U of MMLV reverse transcriptase (Promega), 12 U of RNasin (Promega) and 5 nmol dNTPs were then added to a total volume of 10  $\mu$ l, and incubation was continued at 37°C for 70 min. The reactions were further diluted in water to 100  $\mu$ l and frozen (-20°C).

### **Real-time RT-PCR (qPCR)**

Primers for *Sarcophaga peregrina* sapecin, transferrin, cathepsin L, storage-binding protein (SBP), sarcocystatin and 26/29 kDa protease and *Sarcophaga bullata* 18S ribosomal RNA, PPO1 and PPO2 were designed using the Primer3 software. The nucleotide sequences of these primers are shown in Table 1. After optimization of qPCR reactions, the amplicon sizes for all genes were verified by electrophoresis of the products on 2 % agarose gels. Efficiencies of all of the qPCR assays were determined to be close to 100 % using standard curves.

The qPCR mixtures, in a final volume of 25  $\mu$ l, contained 2  $\mu$ l cDNA, SYBRGreen solution (Molecular Probes, diluted 200-fold with dimethyl sulphoxide and then diluted 20-fold with water), forward and reverse primers (0.4 mM solution of each), 0.3 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 1U Taq polymerase (Promega). qPCR reactions were measured with an Opticon2 instrument (Bio-Rad) using the following cycling conditions: 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 20 sec and 72°C for 30 sec. A melting curve analysis was performed in order to confirm the unique and specific qPCR product for each reaction. Controls containing no template gave no signal, or primer-dimers appeared only at Ct (cycle of threshold) values (>35).

We were not able to find and validate *S. bullata* sequences for frequently used reference genes such as  $\beta$ -actin [23] or  $\alpha$ -amylase [21]. Only the sequence for 18S rRNA was accessible and therefore comparison of 18S rRNA levels between the induced and control samples was used as internal control for the reliability of total RNA isolation, DNase treatment, cDNA synthesis and qPCR quantification. Since 18S rRNA is highly abundant when compared to the studied genes and it was not used as a classical reference gene [45,46]. As expected, the level



of 18S rRNA remained nearly constant after induction. Therefore, we concluded that normalization to 18S rRNA would not significantly change the results.

The Ct values of the induced and control groups were analyzed using Excel software (Microsoft). The ratios of gene expression of induced and control larvae were calculated using the dCt method (ratio =  $2^{(Ct(\text{induced})-Ct(\text{control}))}$ ).

Biological duplicates of the whole larvae, hemocytes and fat bodies for all of the time points and treatment conditions were examined in parallel. Mean (columns) and standard deviation (error bars) are shown in the graphs. All experiments were independently repeated 2-3 times with similar results.

### **Authors' contributions**

AM participated in the design and evaluation of experiments, performed the induction of larvae, carried out the RNA extraction and q-PCR experiments and has been involved in drafting the manuscript. RS was responsible for the design of primers and participated in the interpretation of qPCR experiments. MK performed the statistical analysis. JK was responsible for the insect material and for isolation and collection of larvae organs. JJ conceived the study, participated for the design of the study, was responsible for coordination of the study and finalization of the manuscript.

### **Acknowledgements**

The project was supported by Grant 203/05/0832 (to J.J.) of the Grant Agency of the Czech Republic, by the Chemical Genetics Consortium No. LC060777 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (to J.J.) and by the Research Project Z4 055 0506 of

the Academy of Sciences of the Czech Republic. R.Š. and M.K. were supported by grant B500520601 and project AV0Z50520701 awarded by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic. We would like to thank Mrs. Jarmila Titzenthalerová (IOCB) for breeding the fleshfly larvae.

## References

1. Lemaitre B, Hoffmann J: **The host defense of *Drosophila melanogaster***. *Annu Rev Immunol* 2007, **25**: 697-743.
2. Vilmos P, Kurucz E: **Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system**. *Immunol Lett* 1998, **62**: 59-66.
3. Iwanaga S, Lee BL: **Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals**. *J Biochem Mol Biol* 2005, **38**: 128-150.
4. Hoffmann JA, Reichhart JM: ***Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective**. *Nat Immunol* 2002, **3**: 121-126.
5. Hultmark D: ***Drosophila* immunity: paths and patterns**. *Curr Opin Immunol* 2003, **15**: 12-19.
6. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B: **How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions**. *Curr Opin Microbiol* 2002, **5**: 102-110.
7. Leclerc V, Reichhart JM: **The immune response of *Drosophila melanogaster***. *Immunol Rev* 2004, **198**: 59-71.
8. Johansson KC, Metzendorf C, Soderhall K: **Microarray analysis of immune challenged *Drosophila* hemocytes**. *Exp Cell Res* 2005, **305**: 145-155.
9. Cencialova A, Neubauerova T, Sanda M, Sindelka R, Cvacka J, Voburka Z *et al.*: **Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata***. *J Pep Sci* 2008, in press.
10. Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, Bulet P, Lanot R, Reichhart JM *et al.*: **Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity**. *Eur J Biochem* 1994, **221**: 201-209.
11. Matsuyama K, Natori S: **Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina***. *J Biol Chem* 1988, **263**: 17117-17121.
12. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA: ***Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 14614-14619.

13. Levy F, Rabel D, Charlet M, Bulet P, Hoffmann JA, Ehret-Sabatier L: **Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of Drosophila.** *Biochimie* 2004, **86**: 607-616.
14. Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Van den Bergh G, Arckens L *et al.*: **A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in Drosophila melanogaster hemolymph.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 470-475.
15. De Gregorio E., Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B: **Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 12590-12595.
16. Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L: **Proteomic analysis of the systemic immune response of Drosophila.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**: 156-166.
17. Vierstraete E, Cerstiaens A, Baggerman G, Van den Bergh G, De Loof A, Schoofs L: **Proteomics in Drosophila melanogaster: first 2D database of larval hemolymph proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **304**: 831-838.
18. Irving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart JM *et al.*: **A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 15119-15124.
19. Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH: **Drosophila melanogaster transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection.** *Eur J Biochem* 1999, **260**: 414-420.
20. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J: **Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.** *Drug Discov Today* 2005, **10**: 267-273.
21. Thompson GJ, Crozier YC, Crozier RH: **Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**: 1-7.
22. Matsuyama K, Natori S: **Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of Sarcophaga peregrina.** *J Biol Chem* 1988, **263**: 17112-17116.
23. Wang JX, Zhao XF, Liang YL, Li L, Zhang W, Ren Q *et al.*: **Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (Musca domestica).** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**: 3072-3082.
24. Royet J: **Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from Drosophila and other insect models.** *Mol Immunol* 2004, **41**: 1063-1075.
25. Leclerc V, Pelte N, Chamy LE, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA *et al.*: **Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in Drosophila.** *EMBO Rep* 2006, **7**: 231-235.

26. Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M: **Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidasases from *Sarcophaga bullata*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2000, **30**: 953-967.
27. Chung SO, Kubo T, Natori S: **Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of the *Sarcophaga* fat body. Implications of a post-translational processing mechanism.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 4624-4631.
28. Suzuki T, Natori S: **Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae.** *J Biol Chem* 1985, **260**: 5115-5120.
29. Saito H, Kurata S, Natori S: **Purification and characterization of a hemocyte proteinase of *Sarcophaga*, possibly participating in elimination of foreign substances.** *Eur J Biochem* 1992, **209**: 939-944.
30. French CK, Fouts DL, Manning JE: **Sequence arrangement of the rRNA genes of the dipteran *Sarcophaga bullata*.** *Nucleic Acids Res* 1981, **9**: 2563-2576.
31. Lazzaro BP, Sackton TB, Clark AG: **Genetic variation in *Drosophila melanogaster* resistance to infection: A comparison across bacteria.** *Genetics* 2006, **174**: 1539-1554.
32. Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA: **The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**: 862-874.
33. Meister M, Richards G: **Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipteracin gene in *Drosophila* larvae.** *Insect Biochem Mol Biol* 1996, **26**: 155-160.
34. Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA: **Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*.** *Eur J Biochem* 1999, **262**: 49-55.
35. Beckstead RB, Lam G, Thummel CS: **Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in *Drosophila*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**: 570-578.
36. Beckstead RB, Lam G, Thummel CS: **The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis.** *Genome Biol* 2005, **6**: R99.
37. Kucharski R, Maleszka R: **Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*.** *J Insect Sci* 2003, **3**: 27.
38. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B *et al.*: **Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia.** *Immunity* 2000, **13**: 737-748.
39. Kocks C, Maehr R, Overkleeft HS, Wang EW, Iyer LK, Lennon-Dumenil AM *et al.*: **Functional proteomics of the active cysteine protease content in *drosophila* S2 cells.** *Mol Cell Proteomics* 2003, **2**: 1188-1197.

40. Liu J, Shi GP, Zhang WQ, Zhang GR, Xu WH: **Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.** *Insect Mol Biol* 2006, **15**: 823-834.
41. Philip JMD, Fitches E, Harrison RL, Bonning B, Gatehouse JA: **Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**: 589-600.
42. Natori S, Shiraishi H, Hori S, Kobayashi A: **The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis.** *Dev Comp Immunol* 1999, **23**: 317-328.
43. Saito H, Suzuki T, Ueno K, KUBO T, Natori S: **Molecular cloning of cDNA for sarcocystatin A and analysis of the expression of the sarcocystatin A gene during development of *Sarcophaga peregrina*.** *Biochemistry* 1989, **28**: 1749-1755.
44. Zdarek J: **Endocrine Control of the Pupariation Behavior in Flies.** *Gen Comp Endocrin* 1980, **40**: 361.
45. Bustin SA, Nolan T: **Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.** *J Biomol Tech* 2004, **15**: 155-166.
46. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G: **Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue.** *Synapse* 2008, **62**: 302-309.

### **Figure 1**

Agarose gel analysis of *Sarcophaga bullata* rRNA isolated from larvae whole bodies (A). For comparison, total RNA isolated from *Xenopus leavis* embryos (B).

### **Figure 2**

Time-course of gene expression in the whole body of *Sarcophaga bullata* larvae by induction.

I - injury, E - *E.coli*, S - *S. aureus* and P - *P. aeruginosa*.

### **Figure 3**

Time-dependent analysis of gene expression in the fat body of *Sarcophaga bullata* larvae after infection with *E. coli*. PPO1 and 2, prophenoloxidase 1 and 2; SBP, storage-binding protein; CatL, cathepsin L; Sarc, sarcocystatin; 26/29, 26/29 kDa protease.

### **Figure 4**

Time-dependent analysis of gene expression in hemocytes of *Sarcophaga bullata* larvae after infection by *E. coli*. PPO1 and 2, prophenoloxidase 1 and 2; SBP, storage-binding protein; CatL, cathepsin L; Sarc, sarcocystatin; 26/29, 26/29 kDa protease.

**Table 1: Forward and reverse primers used for qPCR analysis.**

Gene	GenBank Accession Number	Forward primer	Reverse primer
Sapelin	<b><u>J04053</u></b>	TCGCTGTTACCTTGTGCT TG	TAAGGCATGCAAACCAT CAA
Transferrin	<b><u>D28940</u></b>	AGCTCGCGATGGAAAAC TTA	GATGGGCATGCTTTGTAG GT
PPO1	<b><u>AF161260</u></b>	TTCATGGAAAAGGGCAA AAC	CTTTTCGCCAAAACGTGA TT
PPO2	<b><u>AF161261</u></b>	TCACTGGCACTGGCATT AG	CCTTGCCAATATCTGGTG GT
Cathepsin L	<b><u>D297741</u></b>	GTACCCAAATCGGTGGA TTG	GCGGAAATGTTGTCCCTC TA
SBP	<b><u>D16533</u></b>	CGCATTGCAGAACGTAG AAA	CTGTTGTCCCTGTTGGAC CT
Sarcocystatin	<b><u>J02847</u></b>	GTCGGTTGTCCCAGTGAA GT	TGTGTGGTGGCTGAGTTG AT
26/29kDa protease	<b><u>AB011375</u></b>	GGCAAACCATTCCCTTAC AA	ATGGCCAATAGTGCCAA AAG
18S-rRNA	<b><u>AF322419</u></b>	CCTGCGGCTTAATTTGAC TC	AACTAAGAACGGCCATG CAC

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne