

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
- Přírodovědecká fakulta -

Bakalářská práce

Expresie rekombinantního defensinu ze Zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)



Zpracovala: Nikola Křížková

Vedoucí práce: prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

Mgr. Robert Fedič Ph.D.

2010

Křížková N., 2009 Expres rekombinantního defensinu ze Zavíječe voskového [Expression of the recombinant defensin peptide from the waxmoth *Galleria mellonella*, Bc. Thesis, in Czech]- p.51, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotace:

This study reports isolation, cloning and preparation of expression vector of the antimicrobial defensin gene Galiomicin from the waxmoth *Galleria mellonella*. The protein will be expressed, purified and used as the positive control in the next experiments.

Bakalářská diplomová práce byla financována z grantu GA AVČR IAA 5007402

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala sama pouze s využitím níže uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Františku Sehnalovi za umožnění podílet se na tomto projektu, stejně tak i za materiální a odbornou pomoc. Dále také velmi děkuji Robertu Fedičovi za odborné vedení, cenné rady a připomínky a za podporu při vypracování této práce. V neposlední řadě děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V Českých Budějovicích 12. ledna 2010

.....
Nikola Křížková

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	8
2.1 Řád <i>Lepidoptera</i>	8
2.2 Zavíječ voskový (<i>Galleria mellonella</i>)	9
2.3 Imunitní systém	11
2.4 Imunitní systém hmyzu	12
2.5 Antimikrobiální peptidy	13
2.6 Typy antimikrobiálních peptidů	14
2.7 Defensiny	15
2.8 Defensiny u zavíječe voskového	16
2.9 Galiomicin	17
3. Cíl práce	19
4. Materiál	20
4.1 Materiál	20
5. Metodika práce	21
5.1 Pokusná zvířata	21
5.2 Preparace larev	21
5.3 Izolace RNA	21
5.4 Syntéza prvního vlákna cDNA	22
5.4.1 Polymerázová řetězová reakce k amplifikaci cDNA	23
5.4.2 Elektroforéza amplifikovaných vzorků	23
5.4.3 Purifikace DNA z gelu	24
5.4.4 Měření koncentrace dsDNA pomocí spektrofotometru	24
5.4.5 Sekvenování	24
5.5 Úprava konců cDNA pro zaklonování do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO	25
5.5.1 Příprava plazmidu	26
5.5.2 Ligace templátové cDNA do expresního vektoru pET160/GW/D- TOPO	26
5.5.3 Transformace plazmidu do TOP 10 buněk	26
5.5.4 Detekce klonované cDNA v bakteriálních koloniích	27

5.5.5	Polymerázová řetězová reakce bakteriálních kolonií	27
5.5.6	Izolace plazmidu z bakterií	28
5.5.7	Sekvenování	28
5.6	Ligace PCR produktu do kontrolního vektoru pGEM-T Easy vektor	28
5.6.1	Transformace	29
5.6.2	Izolace plazmidu	29
6.	Výsledky	30
7.	Diskuze	35
8.	Závěr	36
9.	Seznam příloh	37
	Příloha 1: Sekvence genu Galiomicin zavíječe voskového	37
	Příloha 2: Sekvence plazmidu/pET160/GW/D-TOPO vektor	38
	Příloha 3: Sekvence plazmidu/pGEM-T Easy vektor	40
	Příloha 4: Mapa pET160/GW/D-TOPO vektoru (Invitrogen)	42
	Příloha 5: Mapa pGEM-T Easy vektoru (Promega)	43
10.	Seznam zkratk	44
11.	Seznam použité literatury	45

1. Úvod

Populace buněk, ze kterých se skládají mnohobuněčné organismy, mají schopnost prozkoumávat své okolní prostředí a vlastnosti sousedních buněk. Tato funkce se uplatňuje při buněčném dělení během embryonálního vývoje, při spouštění opravných procesů buňky, které eliminují její poškození či nefunkčnost, při zjišťování přítomnosti cizorodých buněk a působení při jejich odstraňování. Společně tyto mechanismy sloužící k pozdějším opravám a obranným funkcím tvoří imunitní systém organismu (Dunn, 1986, 1990, 1991; Boman a Hultmark, 1987; Duwel-Eby a Karp, 1990; Karp a Duwel-Eby, 1991).

U hmyzu, který tvoří největší skupinu uvnitř zvířecí říše, je rezistence vůči napadajícím patogenům způsobena především jeho velkou rozmanitostí a růstovými schopnostmi. První obrannou linii u hmyzu tvoří obrana tělesná, což znamená kutikula. Když je tato obrana prolomena a patogeny se dostanou do těla hostitele je vyvolán komplex reakcí nazývaný imunitní odpověď vedoucí k rychlé eliminaci cizích agens (Bulet a kol., 1999). Efektory vrozené imunitní odpovědi tvoří makrofágy, fagocyty a neutrofile. Další důležitou složku vrozené imunitní odpovědi představují antimikrobiální peptidy, z nichž defensiny tvoří unikátní skupinu. Přesto, že jde o velmi starou část imunitního systému jsou pro všechny živé organismy vysoce konzervované (Hancock a Diamond, 2000).

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou v přírodě široce rozšířeny. Tvoří součást důležitého přírodního obranného systému. Jsou to relativně malé peptidy působící na široké spektrum mikroorganismů. Jedná se o gram-pozitivní nebo gram-negativní bakterie, kvasinky, některé houby a viry. Některé antimikrobiální peptidy se dokonce projeví jako cytotoxické pro sperma a nádorové buňky (Reddy a kol., 2004).

Zájem o jejich výzkum vzrůstá v souvislosti s jejich možnou náhradou antibiotik, vůči nimž je stále více bakteriálních kmenů odolnějších.

Imunitní systém hmyzu je v současnosti nejvíce prozkoumán u octomilky *Drosophila melanogaster*, u které bylo také popsáno nejvíce AMP (Lemaitre a Hoffmann, 2007). Nicméně výzkum dalších druhů hmyzu je zejména v posledních pár letech na vzestupu. Larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) byly použity pro studium imunitních reakcí již dříve (Briggs, 1958; Stephens, 1959, 1962; Hink a Briggs,

1968) a v současné době se objevilo několik nových prací, které se tímto problémem zabývají systematictěji (Brown a kol., 2009; Wojda a kol., 2009).

2. Literární přehled

2.1 Řád *Lepidoptera*

Řád *Lepidoptera* (motýli) patří do říše *Animalia* (živočichové), kmene *Arthropoda* (členovci), třídy *Insecta* (hmyz).

Hmyz můžeme rozdělit na základě vývoje na tři základní skupiny: 1. s proměnou dokonalou (holometabolata), 2. s proměnou nedokonalou (hemimetabolata) a 3. ametabolní druhy, u kterých nedochází k metamorfóze.

Motýli (*Lepidoptera*) řadíme do skupiny holometabolního hmyzu, to znamená s proměnou dokonalou. Během jejich životního cyklu se střídají jednotlivá, vzájemně nepodobná vývojová stádia. Samička dospělého motýla naklade vajíčka, z nichž se vylíhnou housenky, které se mění v kukly a z kukel se pak líhnou dospělci. Touto přeměnou je celý cyklus dokončen (Novák a Pokorný, 2003).

Vajíčko a kukla představují stádia klidu, kde pouze uvnitř tělesné schránky dochází k anatomickým a fyziologickým přeměnám. Larvální vývoj je rozdělen do několika stádií, které jsou známé jako instary. Během larválního vývoje nejsou obvykle zřetelné změny v tělesné podobě, jen u posledního stupně přeměny z posledního instaru larvy na dospělého je změna zřetelná. Této přeměně se říká metamorfóza (Snordgrass, 1935; Wigglesworth, 1940). Larvy dělíme do tří základních skupin. Tou první jsou beznohé (apodní) larvy, druhou skupinu tvoří larvy se třemi páry noh (oligopoda) a třetí skupinou jsou larvy se třemi páry hrudních noh a dvěma a více páry panožek (polypoda). Do třetí skupiny spadají i larvy motýlů (*Lepidoptera*).

Jediným stádiem růstu je housenka. Dospělec, kterému se jinak také říká imágo, již dále neroste, což znamená, že jeho velikost je po vykuklení konečná. Pouze se mu krátce po vylíhnutí narovnají a ztuhnou křídla. Důležitým orgánem housenek, který u imág vymizí, je snovací trubice, ta je propojena se snovací žlázou. Snovací žláza produkuje tekutinu, která vytéká ze snovací trubice a na vzduchu tuhne v hedvábné vlákno. Housenky předou hedvábná vlákna po celý svůj život a jejich tvorbu před kuklením zintenzivní a upředou si z nich pevný kokon, ve kterém se přemění v kuklu (Novák a Pokorný, 2003).

Primitivní hmyz má obvykle více larválních instarů než vyspělejší druhy. Larvy řádu *Lepidoptera* chovaných v izolaci mohou projít pěti, šesti, nebo sedmi instary, zatímco larvy, které žijí ve skupinách, prochází pouze pěti instary. V závislosti na množství jídla se rozlišuje i množství instarů. Ne však u všeho hmyzu to takto funguje. U druhů jako jsou některá *Hemiptera*, *Diptera*, *Hymenoptera* a *Coleoptera* je množství instarů konstantní (Chapman, 1998).

Konečným stádiem je dospělec, který je jako jediný uzpůsoben k rozmnožování. Většina motýlích druhů stihne za jeden rok v našich klimatických podmínkách vytvořit do roka jednu, někdy i více generací. Pokud ovšem nestihnou dokončit některé ze stádií, vytvořili si motýli různé mechanismy a strategie jak přežít nepříznivé podmínky. Mohou upadat do klidu neboli dormance. Některé druhy dokážou zpomalit svůj vývoj následkem zimního ochlazení, to nazýváme hibernace, nebo v létě kvůli suchu a nedostatku potravy, to nazýváme estivace. Některé druhy přímo upadají do geneticky podmíněného letního nebo zimního spánku. Jde o tzv. diapauzy. Ty mohou nastat v kterémkoli vývojovém stadiu, ale vždy ve stejném u téhož druhu. Nejméně časté jsou dormance ve stadiu dospělého naopak nejčastěji ve stadiu kukly (Novák a Pokorný, 2003).

2.2 Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*)

Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) patří do čeledi zavíječovitých (*Pyralidae*). Zavíječi (*Pyralidae*) tvoří skupinu rozmanitých motýlů aktivních převážně v noci. Tato skupina se svými 10 000 druhy je jednou z nejpočetnějších čeledí hmyzu. Do této čeledi patří také velmi mnoho významných škůdců. Jedním z nich je i zavíječ voskový, který je již po desítky let oblíbeným hmyzím modelovým organismem mezi fyziology, imunology a parazitology (Novák a Pokorný 2003; Salášková a Hyršl, 2008). Lze ho snadno celoročně chovat na umělé potravě.

Jeho přirozeným prostředím jsou včelí úly, kde se vyvíjí ve včelích plástech. Tím se u nás stává jedním z velkých problémů vyskytujících se u chovu včel. Jím způsobené škody přímo ve včelstvech nejsou tak velké jako škody způsobené ve skladech plástů, voští a mezistěn, kde jsou odhadovány až na 25 – 30 tun ročně (Charriere a Imdorf, 1999)

Dospělý zavíječ voskový je motýl dlouhý 8 – 16 mm, který může v rozpětí křídel dosáhnout délky až 30 mm. Tělo je zbarveno šedě, rezavě nebo modrostříbřitě. Přední křídla jsou obdélníkovitého tvaru a mají na zadním okraji hnědé skvrny, druhý pár křídel je světlý. U samic je druhý pár křídel výrazně bílý, s tmavším lemováním a roztřepeným zadním okrajem. Dospělci kvůli zakrnělému ústnímu ústrojí nepřijímají potravu a žijí tedy jen krátkou dobu (Novák a Pokorný, 2003).



Obr. č.1.: Fotografie Zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)- samička
(autor J. Stockard)

Samička je schopna se již za několik hodin po vylíhnutí pářit. Na chráněná místa, na která dosáhne svým jemným trubičkovitým kladélkem do 24 hodin naklade sklovitá vajíčka o průměru 0,3. Ve volné přírodě je to například do skulin a škvír úlu, rámu a skříní na plásty. Vajíčka jsou kladena na hromádky a samička jich naklade až 400. Po pěti dnech se z vajíček líhnou pohyblivé larvičky, které se mohou snadno rozšířit do svého okolí. Po několika dnech se larvy svlékají a mění se ve velmi žravé housenky. Během svého vývoje se housenky ještě 7x svlékají. V osmém stadiu si vytvoří zámotek a zakuklí se. Celý vývoj trvá 8 - 9 týdnů.

Housenky dorůstají délky až 30 mm, mají tři páry článkovaných hrudních nožek a pět párů panožek na zadečkových člancích. Housenky potřebují velké množství potravy.

Zavíječi bývají chováni nejen pro laboratorní potřeby. Chovný materiál si lze opatřit ve včelínech pro navození optimálních podmínek pro rozmnožování a růst. Vývoj trvá při teplotě 30° C asi 8 týdnů. Jako potrava slouží včelí plásty nebo umělé půdy, které

jsou levnější. Návodů na umělou dietu je celá řada, některé z nich dokonce ani neobsahují včelí vosk.

Umělé diety ovlivňují dobu vývoje jednotlivých vývojových stádií. Larvální vývoj probíhá v VII instarech a trvá přibližně 30 dní, dospělci se líhnou za dalších 7 dní. Nejrychlejší vývoj byl zaznamenán u larev, které byly chované na Haydakově dietě. Na přirozené potravě i dalších dietách byl vývoj minimálně o týden delší (Akvárium terárium 11/1993, Část 4.). Larvy rostou 25-30 dní, pak se kuklí.

2.3 Imunitní systém

Imunita je schopnost organismu bránit se proti cizorodým látkám. Rozlišujeme dva typy imunity: 1. imunitu specifickou, kterou zajišťují lymfocyty T a lymfocyty B a 2. imunitu nespecifickou, na níž se podílí například mechanická zábrana, lysozym nebo fagocytující buňky (Chapman, 1998).

Imunitní systém tvoří základní homeostatické mechanismy organismů a jeho funkcí je udržení integrity organismu rozpoznáním a následnou likvidací patogenů či vlastních potenciálně škodlivých buněčných struktur. Obecně se imunitní systém skládá z evolučně starých nespecifických kaskád a reakcí a evolučně mladších, specifických mechanismů (T- a B- lymfocyty tzv. buňky s pamětí).

Postupem času vytvořily evolučně starší mechanismy efektivní formu obrany imunitního systému a umožnily rostlinám a bezobratlým stát se jednou z evolučně nejúspěšnějších skupin na Zemi (Bulet a kol, 2004). Při nespecifických imunitních reakcích je odpověď rychlá a dlouhodobá. Neadaptivní imunitní systémy rostlin a bezobratlých se v určitých rysech shodují s neadaptivní částí imunity u obratlovců (Vilmos a Kurucz, 1998). I přes tyto shody se imunitní systém u bezobratlých a obratlovců v mnoha věcech liší. Přesto ho lze u obou kmenů rozdělit na dva základní typy a to buněčnou a humorální (Dunn, 1986; Gillispie a kol, 1997).

Buněčnou imunitu zajišťují krevní buňky (imunocyty, hemocyty). Hemocyty se účastní několika imunitních reakcí v organismu, které zamezují cizorodým látkám vniknout do organismu a chrání ho před ztrátou tekutin. Hemocyty se účastní reakcí při hojení ran, enkapsulace, nodulace a fagocytózy. Při hojení ran se hemocyty shlukují a vytvářejí v místě poranění zátku (Chapman, 1998).

Enkapsulace neboli opouzdření slouží k odstranění cizorodé látky, která je příliš velká na to, než aby mohla být fagocytována. Jde zejména o parazity (tasemnice, hlístice,..). K nodulaci dochází tehdy, objeví-li se v organismu velké množství větších cizorodých látek, např. bakterií, ty jsou pak v hemocoelu obaleny několika hemocyty současně. Nejdůležitější reakcí v buněčné imunitě je fagocytóza, při které jsou malé částice či bakterie pohlcovány. Fagocytóza se vyskytuje u všech bezobratlých.

Humorální část zastupují fenoloxidázová a koagulační kaskáda, aglutininy, lysozym a další antibakteriální peptidy. U některých bezobratlých byly objeveny i další reakce podílejících se na hojení ran jako například vazokonstrikce (Chapman, 1998).

2.4 Imunitní systém hmyzu

První obranou linií při setkání s patogenem tvoří vnější kutikula a epitel trávicí soustavy. Přes tyto bariéry je náročné proniknout a některé mikroorganismy je narušují tvorbou a působením enzymu chitinasy. Po poranění kutikuly je aktivován iniciační enzym proteolytické kaskády. Tento enzym katalyzuje přeměnu profenoloxidasy na fenoloxidasu (Royet, 2004).

Mikroorganismy jsou po proniknutí do těla vystaveny působení imunitní odpovědi na humorální a buněčné úrovni.

Na buněčné úrovni je imunitní odpověď zprostředkována hemocyty, které v hemolymfě cirkulují. Morfologicky hemocyty dělíme na plasmocyty (fagocytující), lamelocyty (tvorba kapsulí), a krystalové buňky (obsahují fenoloxidasu a podílí se na proteolytické kaskádě) (Hultmark, 2003). Hemocyty jsou strukturně a funkčně podobné neutrofilům, které hrají roli při savčí vrozené imunitní odpovědi na mikrobiální patogeny (Kavanagh a Reeves, 2007).

Výsledkem humorální odpovědi je rychlá produkce antimikrobiálních peptidů. Některé z těchto peptidů mohou být přítomny i konstitutivně. Antimikrobiální peptidy jsou produkovány především tukovým tělískem (funkční ekvivalent lidských jater) a poté jsou sekretovány do hemolymfy (Bulet a kol., 1999).

2.5 Antimikrobiální peptidy

Obranné peptidy hrají klíčovou roli v přirozené imunitě proti bakteriím a houbám jak u obratlovců tak i u bezobratlých. U hmyzu hrají antimikrobiální peptidy rozhodující roli v boji proti napadajícím patogenům.

Jsou syntetizovány při odpovědi na mikrobiální infekci nebo septické poranění hlavně v tukovém tělisku (ekvivalent savčích jater) a v nezralých krevních buňkách, než se vydají do hemolymfy, kde bojují proti mikroorganismům (Hetru a kol., 1998; Irving a kol., 2004; Tzou a kol., 2002).

Antimikrobiální peptidy jsou do budoucna brány jako alternativy za nynější klasická antibiotika. Výhody antibakteriálních peptidů jsou: selektivita, rychlé zabíjení, široké antimikrobiální spektrum a především žádný rezistentní vývoj (Boman, 2003; Matsuzaki, 1999).

Mnoho antimikrobiálních peptidů bylo poprvé popsáno u hmyzu. Jedním z nejlépe prozkoumaných druhů hmyzu je octomilka *Drosophila melanogaster*. U *D. melanogaster* bylo identifikováno 20 antimikrobiálních proteinů a jejich peptidových produktů, které byly rozčleněny do sedmi rodin: attaciny, cekropiny, defensiny, diptericiny, drosomyciny, drosociny a metchnikowiny (Irving a kol., 2004).

Od té doby byly peptidy s antimikrobiální aktivitou popsány u mnoha dalších řádů hmyzu například u *Lepidopter*, *Dipter*, *Coleopter*, *Odonat*, *Trichopter*, *Hemipter* a *Hymenopter* (Hetru a kol., 1998).

U hmyzu z řádu *Lepidoptera*, konkrétně ze zavíječe voskového se stal modelový organismus pro studování mechanismu přirozené imunity a také pro testy patogenicity s rozdílnými mikroorganismy, například u filament hub *Aspergillus fumigatus* (Reeves a kol., 2004), *Aspergillus flavus* (Leger a kol., 2006), kvasinek *Candida albicans* (Brennan a kol., 2002; Cotter a kol., 2000; Dunphy a kol., 2003), *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis a kol., 2005) a bakterií (Kavanagh a Reeves, 2004)

Z počtu 890 druhů antimikrobiálních peptidů eukaryotního původu, jich bylo více než 180 popsáno u hmyzu. (www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm)

Peptidy mající antimikrobiální aktivitu jsou převážně malé, amfipatické, kationové molekuly. Na základě aminokyselinové sekvence a strukturní charakteristiky jsou rozděleny do tří základních tříd: lineární α -helixové peptidy bez cysteinového zbytku;

peptidy, jejichž struktura je stabilizována pomocí disulfidových můstků a peptidy s převažujícími prolinovými anebo glycinovými zbytky (Bulet a kol., 1999).

Antimikrobiální aktivita byla zkoumána zejména proti gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím, v menší míře proti kvasinkám a vláknitým houbám.

V průběhu posledních dvou dekad byly některé antimikrobiální peptidy izolovány z široké škály zvířat, bezobratlých i obratlovců, rostlin a stejně tak z bakterií a hub (Reddy a kol., 2004).

2.6 Typy antimikrobiálních peptidů

Je známo několik druhů antimikrobiálních peptidů – kationické, anionické, aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vázajících kyslík. Nejpočetnější skupinu tvoří kationické peptidy, které vykazují mnohonásobně vyšší aktivitu než ostatní druhy (Vizioli a kol., 2002).

Kationické peptidy rozdělujeme na základě jejich struktury do čtyř základních tříd. První třídu tvoří antimikrobiální proteiny, které mají přes 100 aminokyselin a jejich aktivita je zaměřena proti gram-negativním bakteriím (Tossi a kol., 2002; Brogden a kol., 2003). U hmyzu bylo izolováno několik polypeptidů s touto aktivitou. Patří sem například attaciny, které se váží k lipopolysacharidům v buněčné stěně gram-negativních bakterií a inhibují tak syntézu membránových proteinů. Pro strukturu attacinů a sarkotoxinů, které taktéž řadíme do této skupiny, je typický vysoký obsah glycinu.

Druhou třídu tvoří tzv. lineární peptidy, které zahrnují antimikrobiální peptidy s méně než 100 aminokyselinami. Lineární peptidy se dají dále rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou lineární amfipatické peptidy tvořící α -helixy. Do této skupiny patří například cekropiny. Délka aminokyselinových řetězců je od 16-40 aminokyselin a na N-konci se vyskytují α -helikální domény, které jsou nezbytné pro jejich účinky. Antimikrobiálním účinkem je permeabilizace buněčné membrány pomocí nespécifických interakcí s membránovými fosfolipidy. Další skupinu tvoří krátké lineární peptidy, které patří k nejmenším v přírodě. Produkuje je žába rodu *Rana* a jde o tzv. temporiny s 13 aminokyselinami a amidovaným C-koncem. Temporiny vykazují aktivitu proti některým gram-negativním bakteriím a kvasinkám (Tossi a kol., 2000).

Třetí třídu tvoří peptidy se zvýšeným obsahem určité aminokyseliny. Sem patří peptidy bohaté na prolin, u kterých je mimo jiné bohatě zastoupen arginin jako bazická aminokyselina. Antimikrobiální aktivitu mají zaměřenou proti gram-negativním bakteriím a není provázena hemolytickým působením (Tossi a kol., 2002; Otvos, 2002). Další skupinou jsou peptidy bohaté na glycin, které jsou produkovány pouze hmyzem (Tossi a kol., 2002). Dále sem patří peptidy bohaté na histidin, jejichž aktivita je zaměřena proti kvasinkám a plísním. Při vstupu do buňky napadají mitochondrie. Poslední skupinou jsou peptidy bohaté na tryptofan. U této skupiny jsou zatím známy pouze dva peptidy a to indolicin a tritypticin. Oba mají široké spektrum účinku (Tossi a kol., 2002).

Poslední třídu tvoří peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky. Peptidy můžeme podle počtu cysteinů dělit na peptidy se dvěma nebo čtyřmi cysteiny, které vytvářejí vlásečkové struktury nebo tzv. „ranaboxy“ a disulfidové můstky slouží ke stabilizaci struktury. Peptidy se šesti a více cysteiny tvoří další skupinu vyskytují se zejména u eukaryotních organismů. Struktura těchto peptidů je stabilizována vznikem hřebenové struktury tzv. β -listu. Tyto peptidy se souhrnně nazývají defensiny a lze je dělit na pět druhů. První tři (α -, β - a θ -) se vyskytují u obratlovců včetně člověka, čtvrtý druh u rostlin a pátý druh u hmyzu (Yamasaki, 2008).

2.7 Defensiny

Defensiny hmyzu patří do rozšířené skupiny antimikrobiálních peptidů charakteristické primární strukturou složenou z konzervovaných cysteinových (Cys) zbytků (Bulet a kol., 2004) tvořících 3 intramolekulární disulfidové páry. Páry mezi cysteiny tvoří: Cys1/Cys4, Cys2/Cys5 a Cys3/Cys6. Tyto peptidy jsou většinou dlouhé 36 až 46 aminokyselin, výjimku tvoří defensiny včel dlouhé 51 aminokyselin. První dva defensiny byly izolovány popsány u masačky *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama a Natori, 1988).

Defensiny jsou syntetizované jako prekurzorové molekuly jejichž součástí je signální sekvence následovaná propeptidem, který je dále zpracován na zralý peptid. Bylo zjištěno, že tkáňová exprese antimikrobiálních peptidů odráží jejich genovou strukturu (Bevins a kol., 1996; Tsutsumi-Ishii a kol., 2000).

Defensiny jsou konzervované skrz celou fylogenetickou oblast (Hubert a kol., 1996) a jsou známy především pro svou antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím. Některé z nich jsou také účinné proti gram-negativní bakteriím, některým houbám (Gillespie a kol., 1997) a parazitickým prvokům (Richman a kol., 1997). Antibakteriální aktivita je defensinům připisována pro jejich účinky na mikrobiální membrány (Lai a kol., 2004).

Kladně nabité defensiny reagují s negativně nabitými složkami mikrobiálních membrán, které u gram-negativních bakterií obsahují lipopolysacharid, polysacharid u gram-pozitivních bakterií a fosfolipidy (Lai a kol., 2004). V bakteriální membráně se působením defensinů vytvářejí kanály, které usnadňují průnik lysozymu do buňky a následnou destrukci patogena.

U hmyzu jsou defensiny přítomny u endopterygot (*Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* a *Trichoptera*) a exopterygot (*Hemiptera* a *Odonata*) (Froy a Gurevitz, 2003).

2.8 Defensiny u zavíječe voskového

Hmyz má tři hlavní obranné linie, hemolymfu, pokožku a střevo. Předpokládá se, že hemolymfa hmyzu obsahuje několik obranných systémů ekvivalentních těm, které se vyskytují v krvi obratlovců. Proto se většina studií soustředí na imunitní mechanismy hemolymfy, ačkoli pokožka a střevní epitel představují primární bariéry proti napadajícím patogenům.

Hmyz produkuje příslušné antimikrobiální peptidy v závislosti na druh infekce či poranění, kterému je vystaven (Bulet a kol., 1999). Většina těchto peptidů je syntetizována v tukovém tělese, které hraje hlavní roli při imunitní odpovědi. Tyto peptidy jsou vylučovány do hemolymfy a mají schopnost odstraňovat mikroby v brzkém stádiu imunitní odpovědi. Výskyt některých antimikrobiálních peptidů byl popsán ve střevech (Lehane a kol., 1997) a epitelu pokožky (Tzou a kol., 2000).

Kompletní repertoár antimikrobiálních peptidů zavíječe voskového byl poprvé zkoumán pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrofotometrií teprve nedávno (Brown a kol., 2009)

Z hemolymfy larvy Zavíječe voskového (*Galleria mellonella*; Gm) bylo izolováno a charakterizováno osmnáct známých nebo předpokládaných antimikrobiálních peptidů

nebo proteinů. Jmenovitě to jsou lysozym, peptidy podobné moricinu (5), cekropiny (2), gloveriny, Gm na prolin bohatý peptid 1, Gm na prolin bohatý peptid 2, Gm anionické peptidy 1(P1) a 2, galiomicin, gallerimycin, indukované serin proteázové inhibitory a peptid podobný heliocinu. U šesti z nich jsou prozatím známy pouze jejich aminokyselinové sekvence. Gm na prolin bohaté peptidy 1 a 2 a Gm anionický peptid 2, mají unikátní aminokyselinové sekvence a nebyly u nich objeveny žádné homologie. Bylo také popsáno klonování a exprese jiného peptidu účinnému proti houbám, gallerimycinu (Schumann a kol., 2003).

2.9 Galiomicin

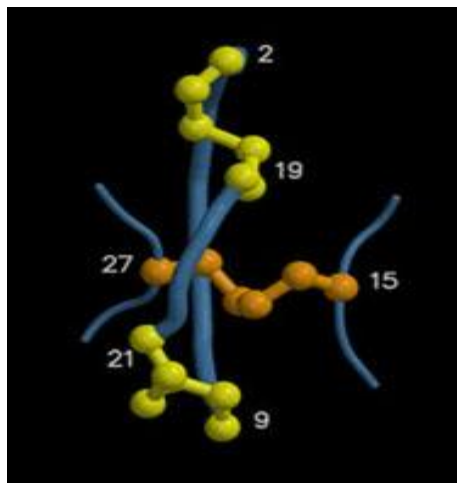
První zmínka popisující purifikaci, cDNA klonování a expresi hmyzího defensinu byla u druhů patřících do řádu motýlů (*Lepidoptera*). Galiomicin, který patří do této rodiny defensinů, byl poprvé popsán při purifikaci z hemolymfy larvy zavíječe voskového, který byl imunizován *E. Coli*. Základní struktura tohoto defensinu vykazuje 90,7% podobnost s heliomicinem izolovaného z *Heliothis virescens* (Lee a kol., 2004).

Zavíječ voskový byl imunizován gram-negativními bakteriemi *E. coli*. Peptid se skládá ze 43 aminokyselinových zbytků obsahujících šest cysteinových zbytků, které jsou spojeny třemi disulfidovými můstky. Plná cDNA kódující *Galleria defensin* byla klonována z tukového tělíska imunizované larvy. Analýza pomocí "Northern blot" odhalila, že *Galleria defensin* byl při napadení bakterií v hemocoelu exprimován nejen z tukového tělíska, ale také ze středního střeva (Lee a kol., 2004).

Délka sekvence Galiomicinu je 72 aminokyselin o molekulové váze 7823 Da. Peptid se skládá z části signální (aminokyseliny 1-29) a části zvané zralý neboli tzv. „mature“ peptid (aminokyseliny 30-72). „Mature“ peptid je dlouhý 43 aminokyselin a obsahuje tři disulfidové můstky, které spojují aminokyseliny 36/61, 47/69, 51/71 (7/32, 18/40, 22/42) (Defensins Knowledgebase).

U tohoto peptidu byly prokázány antibakteriální a fungicidní vlastnosti. Galiomicin má několik domén, mezi které patří například peptid podobný toxinu škorpiónů, defensiny bezobratlých a transmembránové oblasti ([ExPASy Proteomics Server](#)). Nejzajímavější z těchto domén je však doména „knotinová“. Proteiny obsahující „knotinové“ domény se vyskytují jen u Eukaryot. Antibakteriální defensiny a alfa-neurotoxin škorpiónů se vyskytují převážně u členovců.

„Knotiny“ představují rostlinné případně antimikrobiální peptidy. Jsou to malé peptidy bohaté na sloučeniny obsahující disulfidové vazby, v tomto případě cystin. Tyto jsou charakteristické velice speciálním knotem tzv. „*disulfide through disulfide knot*“. Tohoto knotu je dosaženo když jeden disulfidový můstek zkříží makrocyclickou molekulu tvořenou dvěma dalšími disulfidovými můstky a průchozí kostrou. Knot znamená, že „knotiny“ obsahují nejméně tři disulfidové můstky. Stavba „knotinové“ rodiny má disulfidové vazby mezi Cys3/Cys6 jdoucí skrz disulfidové vazby Cys1/Cys4 a Cys2/Cys5



Obr. 2.: Knottinová struktura

Oranžově jsou vyznačeny Cys3/Cys6, žlutě pak Cys1/Cys4 a Cys2/Cys5

„Knotiny“ jsou občas označovány za cystinové knot inhibitory. „Knotinová“ strukturální rodina obsahuje i několik nepříbuzných rodin jako jsou například protézové inhibitory z rostlin, antimikrobiální peptidy, toxiny pavouků a škorpiónů.

Mnoho proteinů bohatých na sloučeniny obsahujících disulfidové vazby může vypadat jako „knotiny“ ovšem nejde o ně pokud neobsahují již zmiňovaný knot. „Knotiny“ jsou atraktivní i ve výrobě léčiv neboť jsou lehce přístupné a chemicky syntetické. Jsou velmi stabilní díky vysokému obsahu disulfidových vazeb a topologií a jsou silně sekvenčně tolerantní (The Knottin Database).

3. Cíl práce

Cílem bakalářské diplomové práce byla příprava rekombinantního peptidu genu Galiomicin

Jednotlivé kroky zahrnují:

1. Amplifikace cDNA genu Galiomicinu
2. Příprava expresního vektoru
3. Exprese rekombinantního proteinu

4. Materiál

4.1 Materiál

- Celková RNA připravená ze žláz larvy zavíječe voskového v posledním instaru
- Pracovní kit – *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen)
- Pracovní kit – *pGEM®-T Easy Vector System*
- *TOP 10 cells* – kompetentní buňky *Escherichia coli* (*TOPO expression kit*)
- Buňky DH5α – kompetentní buňky *Escherichia coli* (Promega)
- Sekvence genu Galiomicin zavíječe voskového
- Genově specifické primery
 - Galiomicin forward 1:*
5' CACCATGGCGAAAAATTTCCAGTCC
 - Galiomicin reverse 1:*
5' TTATTACTCGCACCAACAATTGACGTT
- Vektorově specifické primery
 - T7 Promotor Primer:* TAATACGACTCACTATAGGG
 - T7 Reverse Primer:* TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
 - SP6 Promotor Primer:* TATTTAGGTGACTATAG
- Oligo (dT)_n, *TRIKANT'*: TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA(T)₁₉

5. Metodika práce

5.1 Pokusná zvířata

Pro pokus byl použit druh zavíječ voskový *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), který pochází z chovů Entomologického ústavu v Českých Budějovicích. Zvířata byla chována při konstantní teplotě 37°C v temném prostředí. Larvy byly krmeny speciální dietou (1kg kukuřičného šrotu, 0,5kg pšeničného šrotu, 0,5kg polohrubé mouky, 0,5kg sušeného mléka, 0,25kg sušených kvasnic, 0,8kg včelího vosku, 0,5 kg medu a 0,5kg glycerinu).

5.2 Preparace larev

Postup:

1. Veškerý materiál, který byl použit při preparaci byl vydesinfikován ethanolem.
2. Larvy *Galleria mellonella* byly anestetizovány ponořením do vody.
3. Poté byla larva špendlíkem připíchnutá na podložku v oblasti hlavy a zadečku.
4. Larva byla rozstříhnutá podélně od zadečku k hlavě a pinzetou byly vypreparovány žlázy, které byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku.

5.3 Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA byly použity žlázy vypreparované z posledního larválního instaru *Galleria mellonella*. RNA byla izolována pomocí Trizolu (Invitrogen). Na spektrofotometru byla změřena koncentrace RNA.

5.4 Syntéza prvního vlákna

Pro syntézu prvního řetězce cDNA bylo použita celková RNA. Syntéza byla provedena pomocí kitu *SuperScript III* (Invitrogen).

Postup:

1. Připravíme pracovní směs I.

Pracovní směs I.	Množství pro 1 reakci[μ l]
50 μ M oligo(dT) _n	1
směs nukleotidů (2,5 mM každý)	2
Celková RNA (220 ng/ μ l)	1

2. Inkubujeme 5 minut při 65 °C.
3. Inkubujeme 1 minutu na ledu
4. Ke směsi I. přidáme složky směsi II.

Pracovní směs II.	Množství pro 1 reakci [μ l]
Reakční pufr (5 \times)	4
0,1 M DTT	1
dsH ₂ O	1
Reverzní transkriptáza (200U/ μ l)	1
Celkový objem reakční směsi	7 μ l

5. Jemně promícháme, spustíme program RT – PCR
6. PCR reakce proběhla za těchto podmínek:
 - našedání primerů, polymerace 90 min. při 55 °C
 - inaktivace enzymu 15 min. při 72 °C
 - držet při 4 °C

cDNA může nyní být použita jako vzorek pro amplifikaci v PCR.

5.4.1 Polymerázová řetězová reakce k amplifikaci cDNA

Polymerázová řetězová reakce byla provedena pomocí pracovního kitu *TaKaRa TaqTM* (Takara).

Postup:

1. Příprava pracovní směsi

Pracovní směs	Množství pro 1 reakci[μ l]
PCR pufr (10 \times)	2,5
Směs nukleotidů (2,5 mM každý)	2
Primer <i>Galiomicin fw1</i> (10pmol/ μ l)	1
Primer <i>Galiomicin rev1</i> (10pmol/ μ l)	1
cDNA	1
dsH ₂ O	17,5
r-Taq polymeráza (Takara)	0,13
Celkový objem reakční směsi	25 μ l

2. PCR reakce proběhla za těchto podmínek

Počáteční denaturace	2 min. při 94°C	} 30 \times
Tepelná denaturace	30 sek. při 94°C	
nasedání primerů	30 sek. při 55°C	
extenzní polymerace	45 sek. při 72°C	
závěrečná polymerace	7 min. při 72°C	

5.4.2 Elektroforéza amplifikovaných vzorků

Výsledky reakce byly vyhodnoceny na 1,25% agarózovém gelu v 0,5x TAE pufru při napětí 50V.

Postup:

1. Příprava 1,25% agarózového gelu:

1. 1,25g agarózy rozpustíme ve 100ml 0,5 × TAE v mikrovlnné troubě.
 2. Po zchladnutí na 60°C do gelu přidáme 4μl ETBR a vlijeme do připravených forem s hřebínkem.
 3. Dokonale ztuhlý gel umístíme do elektroforetické aparatury a přelijeme TAE (0,5 ×).
2. PCR produkty smícháme s 2μl nanášecího pufru a napipetujeme do gelu. Elektroforetickou aparaturu zapneme při 50V na 50 minut.

5.4.3 Purifikace DNA z gelu

Purifikace DNA z gelu byla provedena pomocí kitu *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen).

Postup: Pracujeme dle protokolu *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen).

5.4.4 Měření koncentrace dsDNA pomocí spektrofotometru

Postup:

1. Na spektrofotometru nastavíme vlnovou délku pro dsDNA (260nm).
2. Proti kontrolnímu vzorku, ve kterém byla DNA rozpuštěna, změříme koncentraci.
3. Zkontrolujeme čistotu vzorků na přítomnost proteinů poměrem absorbancí 260 / 280 nm.

5.4.5 Sekvenování

K sekvenování byl použit pracovní kit *ABI PRISM® BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

Postup:

1. Vzorky DNA naředíme na koncentraci 28ng/ μ l.
2. Na jednu reakci použijeme 7,5 μ l vzorku.
3. Sekvenaci provede specializovaná laboratoř ÚMBR na přístroji 3130xl Genetic Analyza (Applied Biosystems).

Byly použity primery *T7 Promotor Primer* a *T7 Reverse Primer*.

5.5 Úprava konců cDNA pro zaklonování do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO

Pro zaklonování do expresního vektoru *pET160/GW/D-TOPO* musí mít náš PCR produkt tupé konce. Těch dosáhneme použitím Pfx Platinum DNA polymerázy z pracovního kitu *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen)

Postup:

1. Příprava pracovní směsi

Pracovní směs	Množství pro 1 reakci[μ l]
Směs nukleotidů (10mM)	0,75
Pfx reakční pufr (10x)	2,5
MgSO ₄ (50mM)	0,5
Pfx DNA Polymeráza	0,2
Primer <i>Galiomicin fw.1</i> (10pmol/ μ l)	0,37
Primer <i>Galimicin rev.1</i> (10pmol/ μ l)	0,37
DNA	1
dsH ₂ O	19,6
Celkový objem reakční směsi	25

2. PCR reakci proběhla za těchto podmínek

Počáteční denaturace	2 minut při 94 °C	}	35x
Denaturace	30 vteřin při 94 °C		
Nasedání primerů	30 vteřin při 58 °C		

Polymerace.....30 vteřin při 68 °C
Závěrečná polymerace.....7 minut při 72 °C

5.5.1 Příprava plazmidu

Postup: pro přípravu plazmidu byl použit pracovní kit *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen)

5.5.2 Ligace templátové cDNA do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO

Postup:

1. Příprava reakční směsi

Pracovní směs	Množství pro 1 reakci[μ l]
PCR produkt	4
Roztok solí	1
TOPO vektor	1
Celkový objem reakční směsi	6

2. Směs opatrně promícháme a necháme 30 minut v pokojové teplotě
3. Reakci pak vložíme ihned na led

5.5.3 Transformace plazmidu do TOP 10 buněk

Postup:

1. Připravíme transformační reakci tak, že 3 μ l reakční směsi napipetujeme do chemicky kompetentních TOP 10 buněk (*TOP 10 cells*).
2. Transformační reakce inkubujeme 15 min na ledu.
3. Reakce inkubujeme 30 sekund při 42°C, poté okamžitě umístíme na led.
4. Do každé reakce přidáme 250 μ l S.O.C. media.
5. Inkubujeme v třepačce 60 minut při 37°C, rychlost třepání 180 ot/min

- Z každé reakční zkumavky odebereme 100 μl a 200 μl bakteriální kultury, které poté vysejeme na LB agarové s přidavkem ampicilinu (výsledná koncentrace ampicilinu je $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- Agary necháme inkubovat v termostatu při 37°C přes noc

5.5.4 Detekce klonované cDNA v bakteriálních koloniích

Postup:

- Mikrobiologickou kličkou nabere část vybraných kolonií a protřepeme ve 25 μl dsH₂O.
- Provedeme teplotní šok inkubací 5 minut při 95°C a následným okamžitým ochlazením na ledu.
- Centrifugujeme 10 minut, 13 000 ot/min při 4°C . Dále pracujeme se supernatantem.
- Provedeme PCR .

5.5.5 Polymerázová řetězová reakce bakteriálních kolonií

Postup:

- Připravíme pracovní směs

Pracovní směs	Množství pro 1 reakci [μl]
Pufr (10x)	2,5
Směs nukleotidů (2,5 mM)	2
Primer <i>Galiomicin fwI</i> (10 pmol/ μl)	1
Primer <i>Galiomicin revI</i> (10 pmol/ μl)	1
H ₂ O	8,3
Templát	10
rTaq polymeráza Takara	0,2
Celkový objem reakční směsi	25

- PCR reakce proběhla za těchto podmínek

Počáteční denaturace	2 minuty při 94 °C	} 35x
Denaturace	30 vteřin při 94 °C	
Nasedání primerů	30 vteřin při 55 °C	
Polymerace	30 vteřin při 68 °C	
Závěrečná polymerace	7 minut při 72 °C	

5.5.6 Izolace plazmidu z bakterií

Postup: Pracujeme dle protokolu *Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit* za použití pracovního kitu *QIAprep® Miniprep Purification kit* (Qiagen)

5.5.7 Sekvenování

Postup: Sekvenaci provede specializovaná laboratoř UMBR na přístroji 3130xl Genetic Analyza (Applied Biosystems) za použití primerů *T7 Promoter Primer* a *T7 Reverse Primer*

5.6 Ligace PCR produktu do kontrolního vektoru *pGEM-T Easy*

Pro ověření přítomnosti inzertu jsme PCR produkt zaklonovali do kontrolního vektoru *pGEM-T Easy* od firmy Promega a postupovali jsme dle přiloženého protokolu z pracovního kitu *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega)

Postup:

1. Příprava ligační směsi

Pracovní směs	Množství pro 1 reakci[μ l]
ligační pufr (2x)	5
pGEM-T easy vektor	1
PCR produkt	2
T4 DNA ligáza	1
ds H ₂ O	1
Celkový objem reakční směsi	10

2. Ligační směs inkubujeme přes noc při 4 °C

5.6.1 Transformace

1. Inkubujeme 10 minut na ledu
2. Teplotní šok 1 minutu při 42 °C, pak přeneseme reakci na led a inkubujeme 2 minuty
3. Přidáme 700 μ l LB media, inkubujeme v třepačce 1 hod. při 37 °C, 180 ot/min.
5. Směs přeneseme na dva LB agarové plotny, do kterých byl přidán ampicilin o koncentraci 100 mg \cdot ml⁻¹, 2% X-gal a 20% IPTG
6. Inkubujeme v termostatu při 37°C přes noc
7. Vybrané kolonie přeočkujeme na nové LB agarové misky s ampicilinem
8. Inkubujeme v termostatu při 37 °C přes noc

5.6.2 Izolace plazmidu**Postup:**

- 1) Vybrané kolonie bakterií pomnožíme v 5 ml LB media s přidavkem ampicilinu (výsledná koncentrace ampicilinu je 1 μ l \cdot ml⁻¹)
Izolujeme plazmidovou DNA pomocí purifikačního kitu (viz 5.5.6)

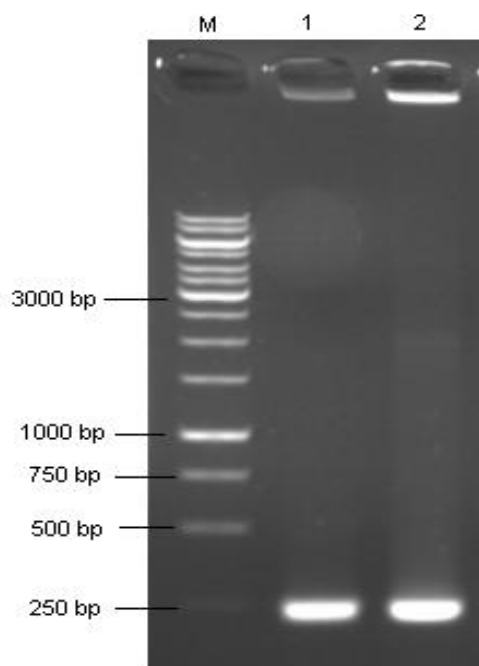
6. Výsledky

6.1 Syntéza cDNA

Pro syntézu dvouvláknové cDNA byla použita celková RNA vyizolovaná z larev zavíječe voskového v posledním larválním stádiu. Reverzní transkripce byla provedena pomocí *Superskript III*. Dvouvláknový inzert byl amplifikován primery *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1*. Sekvenování inzertu ve specializované laboratoři Entomologického ústavu prokázalo, že se skutečně jedná o hledaný úsek genu *Galiomicin*.

6.2 Amplifikace části genu

K amplifikaci genu pro *Galiomicin* byly použity primery *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1*. *Galiomicin fw1* primer obsahuje na 5' konci sekvenci CACC, která je nutná pro pozdější směrové klonování do expresního vektoru. PCR reakcí jsme získali produkt o velikosti přibližně 250 bází (obr. č.1.).

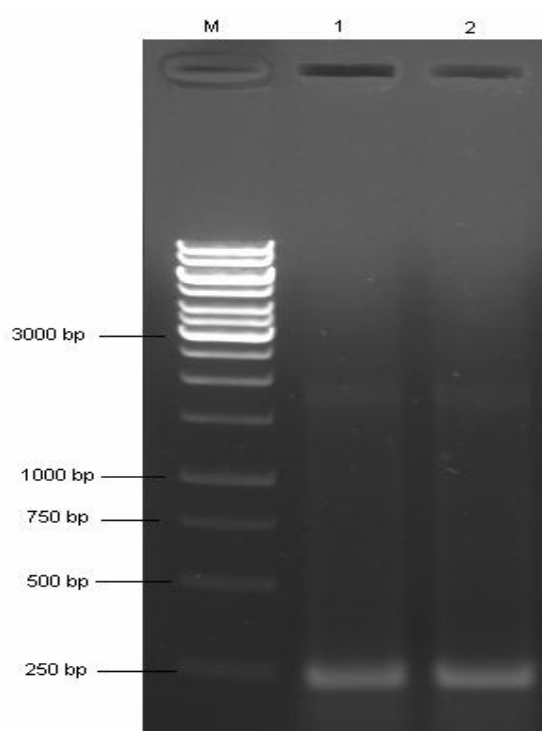


Obrázek č.1.: Výsledek amplifikace cDNA

V dráze M je standard molekulových hmotností (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas)
V dráze 1 a 2 je amplifikovaná cDNA přibližně odpovídající svou velikostí požadovanému inzertu což je kolem 250 bp

6.3 Úprava cDNA

Pro expresi proteinu je nutné ho zaklonovat do expresního vektoru. My jsme použili pET160/GW/D-TOPO (Invitrogen). Tento vektor vyžaduje PCR produkt s tupými konci a na 5' konci sekvenci CACC, která umožňuje směrové klonování. Proto jsme námi zaklonovaný Galiomicin amplifikovali pomocí *Platinum Pfx* polymerázy (Invitrogen) (obr. č. 2.) Na obrázku vidíme v drahách 1 a 2 produkty o velikosti přibližně 250 bází. Tyto velikosti odpovídají námi očekávané délce 223 bází.



Obrázek č.2.: Výsledek PCR s použitím Pfx Platinum polymerázy

V dráze M je standard molekulových hmotností (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas)

V drahách 1 a 2 jsou PCR produkty, které leží v oblasti 250 bp což je oblast přibližně odpovídající velikosti požadovaného inzertu

Oba produkty byly zaklonovány do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO (Invitrogen), pomnoženy v bakteriálních buňkách TOP10 (Invitrogen) a osekvenovány. Výsledky sekvenování viz příloha č. 2

6.4 Ligace do expresního vektoru

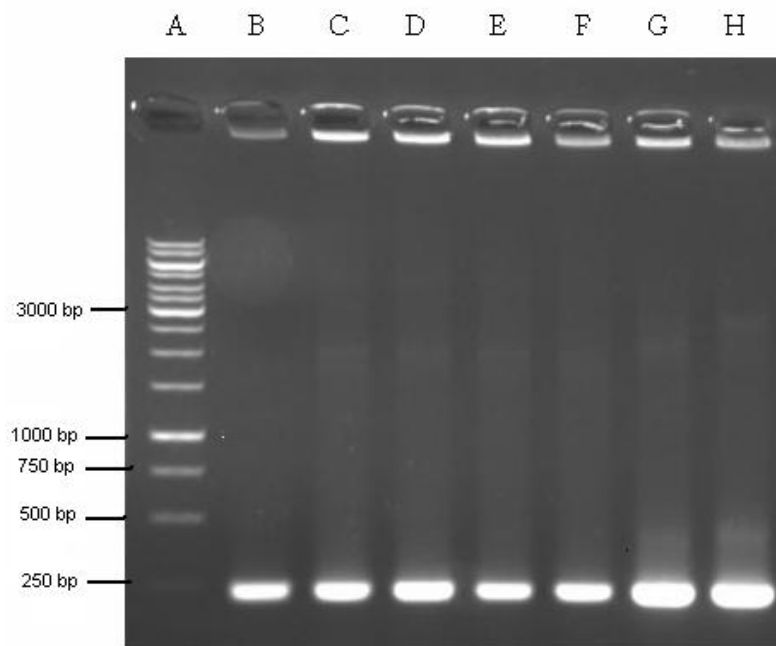
Pro ligaci do expresního vektoru byl použit systém umožňující přímé aklonování PCR produktu do vektoru. Principem reakce je vazba 5' upraveného konce PCR produktu s 3' koncem linearizovaného vektoru, který obsahuje komplementární sekvenci. U používaného kitu *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen) je důležité dodržet přesný poměr mezi množstvím klonované cDNA a *pET160/GW/D-TOPO* vektoru. Proto byla koncentrace vzorku upravena tak, aby molární poměr vzorku k vektoru odpovídal 5 : 1.

6.5 Transformace plazmidu do bakteriálních buněk

Rekombinantní plazmid byl zaklonován do chemicky kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, buněk TOP 10 (Invitrogen). Ke kultivaci byly použity agarové plotny s přidaným ampicilinem, na kterém narostly pouze kolonie obsahující plazmid s genem pro rezistenci na uvedené antibiotikum. Jako další analýza narostlých kolonií byla v bakteriích pomocí PCR s použitím primerů *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1* prokázána přítomnost plazmidu s klonovaným inzertem.

6.6 Ověření přítomnosti genu zaklonováním do kontrolního vektoru

Pro ověření sekvence Galiomicinového genu byl PCR produkt zaklonován do vektoru *pGEM-T Easy* (Promega). Poté byl plazmid transformován do bakterií (DH5- α), pomnožen a byla provedena selekce na přítomnost našeho produktu pomocí PCR z bakteriálních kolonií (obr. č.3).



Obrázek č. 3.: PCR z bakteriálních kolonií

V dráze A je standard molekulových hmotností (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas)

V drahách B-H jsou kolonie setřené z plotny a ověřené pomocí PCR a na agarózovém gelu. Velikost ukazuje na přítomnost inzertu.

Na obrázku č.3 vidíme, že všechny kolonie obsahovaly námi vnesený PCR produkt o velikosti odpovídající genu pro Galiomicin. Vybrali jsme si kolonie G a H, ze kterých jsme vyizolovali plasmidovou DNA a oba produkty zaslali na sekvenování. Pro sekvenční reakci jsme použili plasmidové primery *SP6* a *T7* (viz 4.1 Materiál). Výsledky sekvenování viz příloha č. 3.

6.7 Sekvenční variabilita

Po prosekvenování genu Galiomicin, v porovnání s publikovanou sekvencí, byla v oblasti genu zvané zralý peptid zjištěna sekvenční variabilita, která však nemá vliv na sekvenci aminokyselinovou.

ATGGCGAAAAATTTCCAGTCCGTTTTGTTGTTGGTCTGCCTATCATTTTTAGT
GATCGTATCGTCACCGCAAATGCTGTACAAGCGGATACGCTGATAGGGAG
GTGCGTGTGGGGTTCGACGAATTACACCTCTGATTGCAATGCTGAGTGCAA
ACGTCGTGGGTATAAAGGTGGTCATTGCGGCAGCTTCTTGAACGTCAATTGT
TGGTGCAGTAA

Obrázek č. 4.: Publikovaná sekvence Galiomicinu. Zeleně je označena signální část peptidu, modře pak tzv. „mature“ peptid neboli zralý peptid.

ATGGCGAAAAATTTCCAGTCCGTTTTGTTGTTGGTCTGCCTATCATTTTTAGT
GATCGTATCGTCACCGCAAATGCTGTACAAGCGGACACACTCATTGGTAG
CTGCGTATGGGGTTCGACGAATTACACCTCTGATTGCAATGCTGAGTGCAA
ACGTCGTGGGTATAAAGGTGGTCATTGCGGCAGCTTCTTGAACGTCAATTGT
TGGTGCAGTAA

Obrázek č.5.: Sekvence Galiomicinu se sekvenční variabilitou. Zeleně je označena signální část peptidu, modrá označuje zralý peptid a červeně jsou označeny sekvenční změny (Popřadě jsou to změny v těchto bázích: C/T, A/G, C/G, T/A, T/G, C/G, A/G).

Diskuze

Cílem této bakalářské práce byla příprava a exprese antimikrobiálního peptidu defensinu Galiomicinu ze zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Gen, který tento defensin kóduje byl amplifikován z připravené cDNA, osekvenován a následně zaklonován do expresního vektoru. Následně exprimovaný protein bude vyčistěn a po ověření jeho aktivity bude sloužit jako pozitivní kontrola v dalších experimentech.

K amplifikaci genu pomocí PCR byly použity genově specifické oligonukleotidy a jako templát byla použita cDNA. Ta byla připravena z larev posledního instaru zavíječe voskového. Dvouvláknová cDNA byla připravena reverzní transkripcí za pomoci kitu *Superskript III*. Byl zvolen tzv. „dvoukrokový“ postup, kde bylo nejprve syntetizováno první vlákno cDNA pomocí univerzálního primeru, tzv. ssDNA. Dvouvláknový inzert byl amplifikován primery *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1*. Z gelu pak byly vyizolovány potencionálně specifické pruhy tzv. PCR produkty o očekávané velikosti přibližně 223 bp. Tyto izolované produkty byly sekvenovány a prokázalo se, že se skutečně jedná o Galiomicin. Sekvenování prokázalo sekvenční variabilitu, která ale nemá vliv na sekvenci aminokyselin. Produkt odpovídající publikované sekvenci (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/42540507>) byl následně přenesen do expresního vektoru.

Závěr

- Za pomoci reverzní transkripce a následné polymerázové řetězové reakce byl amplifikován gen pro *Galiomicin*, který byl následně osekvenován pro ověření sekvence.
- Následně byl ověřený produkt přenesen do expresního vektoru a opět byla sekvenováním zkontrolována jeho sekvence.

9. Seznam příloh

Příloha 1: Sekvence genu *Galiomicin* zavíječe voskového

(barevně jsou označena místa nasedání primerů: růžová- *Galiomicin fw1*, modrá- *Galiomicin rev1*)

```
agtttgtcttcgagcgtaaagtactaaaaattttattaacaacaattaatttgta
F V L R A - S T K K F Y - T T N - F V I
ttaaatggcgaaaaattccagtcggtttgtgtgtgctgcctatcatttttagtga
K M A K N F Q S V L L L V C L S F L V I
tcgtatcgtcaccgcaaatgctgtacaagcggatacgtgatagggaggtgcg
V S S P Q N A V Q A D T L I G R C V
tgtggggtgcgacgaattacacctctgattgcaatgctgagtgcaaacgtcgtgggt
W G A T N Y T S D C N A E C K R R G Y
ataaaggtggtcattgcggcagcttctgaacgtcaattgttggtgcgagtaataattt
K G G H C G S F L N V N C W C E - - F F
tttttactacaaattcagttttaagattataaaataactgctgttcaccgcatcagcgg
F L L Q I Q F L R L - N N C C F T A S A D
actaccactgcagcctagaattcttgattagtccattcagaagctgcaaaaagtaac
Y H C S L E F L D - F H S E A A K V T F
atTTTTttattggattttcccaagaatgatgcatttttaattggacgctattttttatactt
F L L D F P K E - C I F N W T L L F L Y F D
tgataatgtctttgtttatatttaaaaaattgtacctgttgactaactggcagcatttgaa
N V F V Y I - K N C T C - L T W Q H L N V
tgtatacaaattgtaaggattgtttgtttaatctgcctattgtaattggatatttaattaa
Y K L - G F V L F N L P I V I G Y L I N K
taaatttatattatcattaaaaaaaaaaaaaaaaaa
F I L S L K K K K K
```

Příloha 2: Výsledek sekvenování Galiomicinu v pET160/GW/D-TOPO vektor

(**oranžově** je označen vektor pET160/GW/D-TOPO, **červeně** je označen 6x His tag, **fialově** je označen Lumio taq, **zeleně** je označeno místo nasedání primerů *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1*, **modře** je označen inzert)

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
TTACGTCTTC TGTCTAGAAT AATTTTGTTC AACTTTAAGA AGGAGATATA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90         100
CATATGCATC ATCACCATCA CCATGGTGCT GGTGGCTGTT GTCCTGGCTG
          6x his tag

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
TTGCGGTGGC GGCGAAAACC TGTATTTTCA GGGAATTATC ACAAGTTTGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
ACAAAAAGC AGGCTCCGCG GCCGCCCCCT TCACCATGGC GAAAAATTTTC
                                     CACCATGGC GAAAAATTTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
CAGTCCGTTT TGTTGTTGGT CTGCCTATCA TTTTTAGTGA TCGTATCGTC
CAGTCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
ACCGCAAAT GCTGTACAAG CGGACAACT TATTGGTAGC TGTGTGTGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
GTGCGACGAA TTACACCTCT GATTGCAATG CTGAGTGCAA ACGTCGTGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
TATAAAGGTG GTCATTGCGG CAGCTTCTTG AACGTCAATT GTTGGTGCGA
                                     TTGCAGTTAA CAACCACGCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
GTAATAAAG GGTGGGCGCG CCGACCCAGC TTTCTTGTAC AAAGTGGTGA
CATTATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
TAATTAATTA AGATCAGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510         520         530         540         550
```

AGTTGGCTGC TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC CCTTGGGGCC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 560 570 580 590 600
TCTAAACGGG TCTTGAGGGG TTTTTTGCTG AAAGGAGGAA CTATATCCGG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 610 620 630 640 650
ATATCCCGCA AGAGGCCCGG CAGTACCGGC ATAACCAAGC CTATGCCTAC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 660 670 680 690 700
AGCATCCAGG GTGACGGTGC CGAGGATGAC GATGAGCGCA TTGTTAGATT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 710 720 730 740 750
TCATACACGG TGCCTGACTG CGTTAGCAAT TTAACGTGA TAAACTACCG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 760 770 780 790 800
CATTAAGCT AGCTTATCGA TGATAAGCTG TCAAACATGA GAATTAATTC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 810 820 830 840 850
TTGAAGACGA AAGGGCCTCG TGATACGCCT ATTTTATAG GTTAATGTCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 860 870 880 890 900
TGATAATAAT GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 910 920 930 940 950
CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 960 970 980 990 1000
GCTCATGAGA CAATAACCCT GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 1010 1020 1030 1040 1050
GAGTATGAGT ATTCACATTT CCGTGTCGCC TTATTCCCTT TTTTTCGCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 1060 1070 1080 1090 1100
TTTGCACTGT TTTGCTCCAC CAGAACGCTG TGAAGTAAAA GATGCTGAGA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 1110 1120 1130 1140 1150
ATCAGCTGGG TGCACGRATG CTTACATCGA CTGAATCTCA ACAAGCCGGT

Příloha 3: Výsledek sekvenování Galiomicinu v pGEM-T Easy vektor

(**oranžově** je označen vektor pGEM-T Easy, **zeleně** je označeno místo nasedání primerů *Galiomicin fw1* a *Galiomicin rev1*, **modře** je označen insert)

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
TWCTCGTGCA GCTCCGGCGC CATGGCGGCC GCGGGAATTC GATTCACCAT
                                         CACCAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
GGCGAAAAAT TTCCAGTCCG TTTTGTGTT GGTCTGCCTA TCATTTTTAG
GGCGAAAAAT TTCCAGTCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
TGATCGTATC GTCACCGCAA AATGCTGTAC AAGCGGACAC ACTCATTGGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
AGCTGCGTAT GGGGTGCGAC GAATTACACC TCTGATTGCA ATGCTGAGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
CAAACGTCGT GGGTATAAAG GTGGTCATTG CGGCAGCTTC TTGAACGTCA
                                         TTGCAGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
ATTGTTGGTG CGAGTAATAA AATCACTAGT GAATTGCGGG CCGCCTGCAG
TAACAACCAC GTCATTATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT TGGATGCATA GCTTGAGTAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510         520         530         540         550
AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTGCTGCC
```


.....|.....||.....||.....||.....||.....|
560 570 580 590 600
AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
610 620 630 640 650
GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTTCG

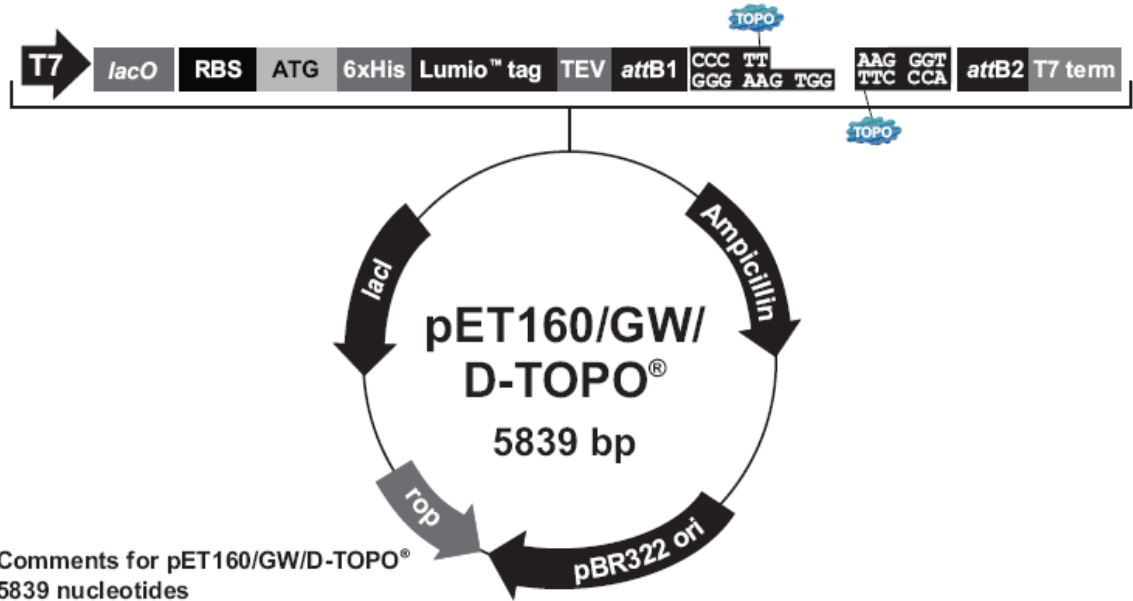
.....|.....||.....||.....||.....||.....|
660 670 680 690 700
GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA CGGTTATCCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
710 720 730 740 750
CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA

Aminokyselinová sekvence inzertu

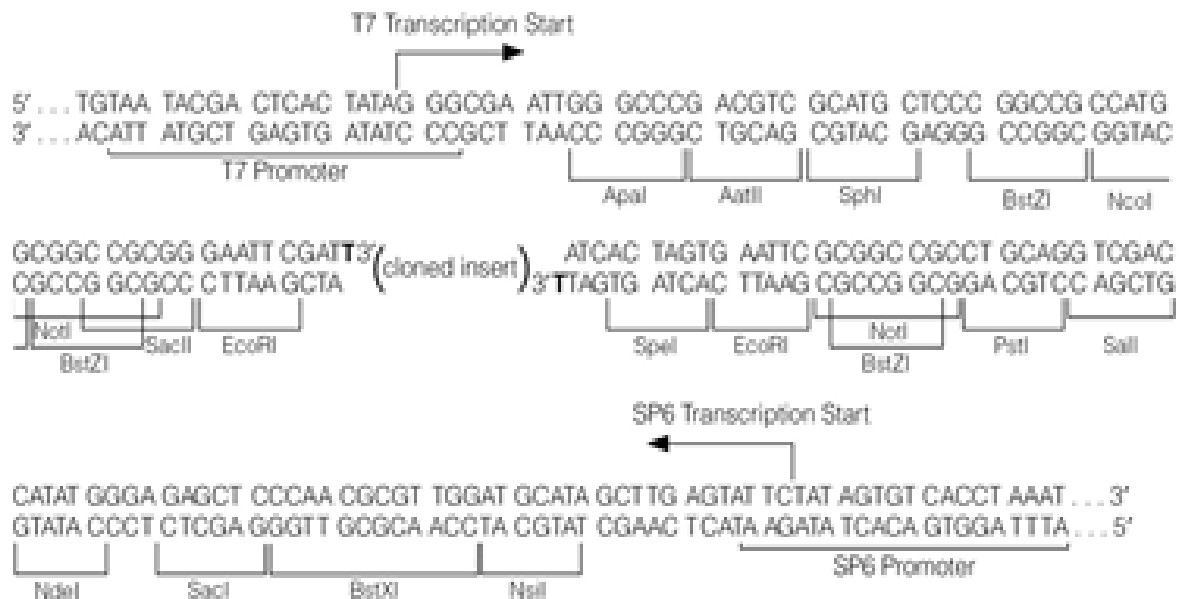
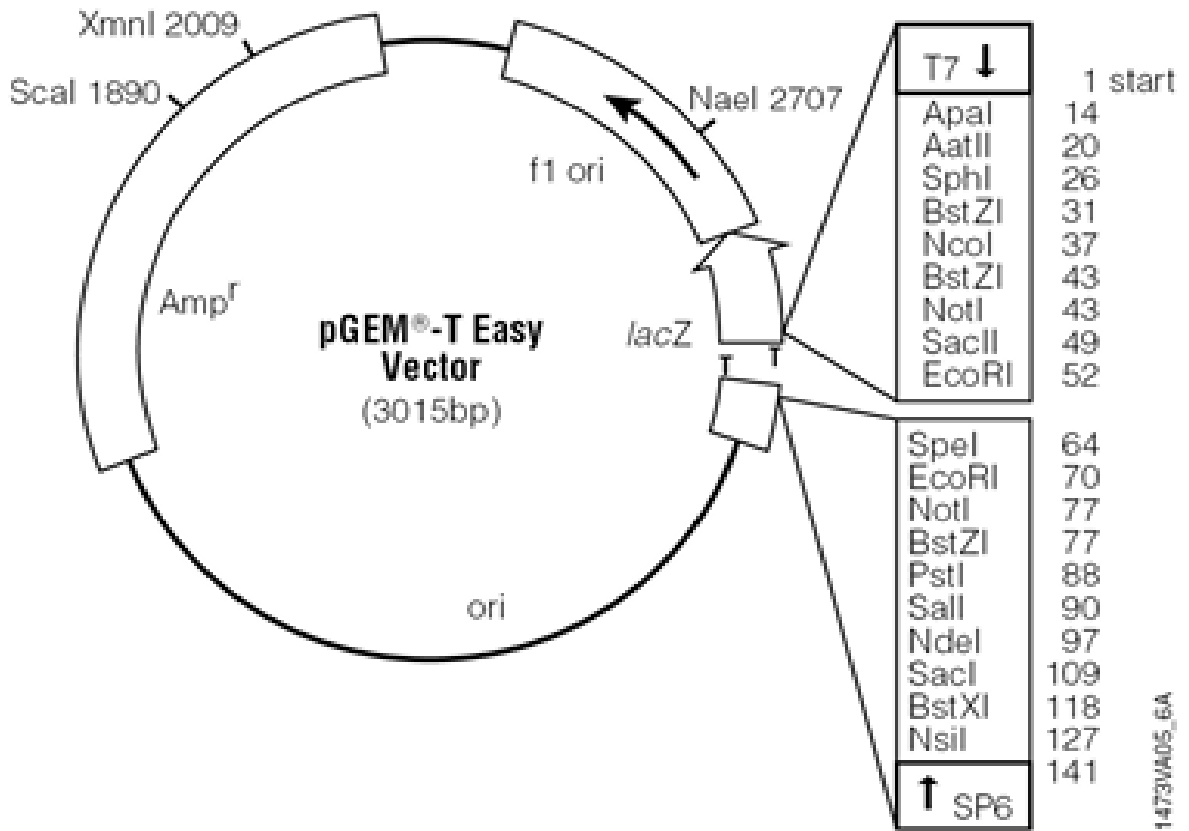
M A K N F Q S V L L L V C L S F L V I V S S P Q N A V Q A D T L I G R
C V W G A T N Y T S D C N A E C K R R G Y K G G H C G S F L N V N C W
C E

Příloha 4: Mapa pET160/GW/D-TOPO vektoru (Invitrogen)



		T7 promoter/priming site					lac operator									
1	AGATCTCGAT	CCCGCGAAAT	TAATACGACT	CACTATAGGG	GAATTGTGAG	CGGATAACAA										
61	TTCCCTCTA	GAAATAATTT	TGTTAACTT	TAAGAAGGAG	ATATACAT	ATG	CAT	CAT								
						TAC	GTA	GTA								
						Met	His	His								
118	CAC	CAT	CAC	CAT	GGT	GCT	GGT	GGC	TGT	TGT	CCT	GGC	TGT	TGC	GGT	GGC
	His	His	His	His	Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Pro	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly
166	GGC	GAA	AAC	CTG	TAT	TTT	CAG	GGA	ATT	ATC	ACA	AGT	TTG	TAC	AAA	AAA
	CCG	CTT	TTG	GAC	ATA	AAA	GTC	CCT	TAA	TAG	TGT	TCA	AAC	ATG	TTT	TTT
	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu	Tyr	Lys	Lys
214	GCA	GGC	TCC	GCG	GCC	GCC	CCC	TTC	ACC	AAGGGTGGGC	GCGCCGACCC			
	CGT	CCG	AGG	CGC	CGG	CGG	GGG	AAG	TGG	TTCCACCCG	CGCGGTGGG			
	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Phe	Thr							
261	AGCTTTCTTG	TACAAAGTGG	TGATAATTAA	TTAAGATCAG	ATCCGGCTGC	TAACAAAGCC										
	TCGAAAGAAC	ATGTTTCACC	ACTATTAATT													
321	CGAAAGGAAG	CTGAGTTGGC	TGCTGCCACC	GCTGAGCAAT	AACTAGCATA	ACCCCTTGGG										

Příloha 5: Mapa pGEM-T Easy vektoru (Promega)



10. Seznam zkratek:

AA / *amino acid* / aminokyselina

cDNA / *complementary DNA* / DNA syntetizovaná reverzní transkripcí z RNA

dNTP / *deoxyribonucleotide triphosphate* / deoxyribonukleotidtrifosfát

dsDNA / *double strand DNA* / dvouvláknová DNA

dsH₂O / *deionized sterille watter* / deionizovaná sterilizovaná voda

DTT / *dithiothreitol*

ENTU / entomologický ústav (biologické centrum akademie věd České Republiky)

ELFO / *elektroforesis* / elektroforéza

ETBR / *Ethidium bromide*

GM / *Galleria mellonella* / Zavíječ voskový

IPTG / *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

PCR / *polymerase chain reaction* / polymerázová řetězcová reakce

RT – PCR / *reverse transcription PCR* / reverzní transkripce

ssDNA / *single strand DNA* / jednovláknová DNA

TAE / *Tris-acetate-EDTA*

UMBR / ústav molekulární biologie rostlin (biologické centrum akademie věd České Republiky)

Seznam použité literatury

Akvárium terárium 11/1993, Část 4.

- Bevins, C.L.** (1996) Human enteric defensin genes: chromosomal map positron and a model for possible evolutionari relationships. *Genomics*, 31: 95-106
- Boman, H.G. & Hultmark, D.** (1987) Cell-free immunity in insect. *Annual Review of Mikrobiology*, 41: 103-26
- Boman, H.G** (2003) Antibacterial peptides: basic facta and emerging concepts. *J Inter Med*, 254: 197-215
- Brennan, M., Thomas, D.Y., Whiteway, M., Kavanagh, K.** (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larva. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34: 153-7
- Briggs, J.D.** (1958) Humoral imunity in lepidopterous larvae. *Journal of Experimental Zoology*, 138: 155-188
- Brogden, K. A, Ackermann, M., McCray, P.B. Jr, Tack, B.F.** (2003) Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents*, 22(5): 465-78
- Brown, S.E., Howard, A., Kasprzak, A.B., Gordon, K.H., East, P.D.** (2009) A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 39(11):792-800
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J-L, Hoffmann, D.** (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23: 329-44
- Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L.** (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunology Review*, 198:169-184

- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., Hoffmann, J.** (1993) Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensin and scorpion toxins. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 15:17-22
- Cotter, G., Doyle, S., Kavanagh, K.** (2000) Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 27: 163-9
- Defensins Knowledgebase** - <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>
- Dunn, P.E.** (1986) Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology*, 31: 321-39
- Dunn, P.E.** (1990) Humoral immunity in insects. *BioScience*, 40: 738-744
- Dunn, P.E.** (1991) Insect antibacterial proteins. In *Phylogenesis of Immune Functions*, ed. G.W. Warr & N. Cohen, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 19-44
- Dunphy, G.B., Oberholzer, U., Whiteway, M., Zakarian, R.J., Boomer, I.** (2003) Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Can. J. Microbiol*, 49: 514-24
- Duwel-Eby, L.E. & Karp, R.D.** (1990) The inducible humoral immune response to soluble proteins in the American cockroach. In *Defense Molecules*, ed. J.J. Marchalonis & C.L. Reinisch, New York: Wiley-Liss, pp. 63-78,
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J.A., Dorsselaer, A., Bulet, P.** (1996) Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 29537-29544
- ExPasy Proteomic Server** - www.expasy.ch

- Froy, O., Gurevitz, M.** (2003) Arthropod and mollusk defensins – evolution by exonshuffling. *Trends in Genetics*, 19: 684-687
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. & Trenczek, T.** (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611-43
- Hancock, R.E.W. & Diamond, G.** (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Mikrobiologie*, 8:402-410
- Hetru, C., Hoffmann, D., Bulet, P.** (1998) Antimicrobial peptides from insects. In: Brey, P.T., Hultmark, D., editors. *Molecular mechanisms of immune response in insects*. London: Chapman & Hall, pp. 40-66
- Hink, W.F. & Briggs, J.D.** (1968) Bacterial factors in hemolymph from normal and immune wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 14: 1025-1034
- Hubert, F., Noe, T., Roch, P.** (1996) A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 240: 302-306
- Hultmark, D.** (2003) Drosophila immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, 15(1):12-9
- Chapman, R.F.** (1998) *The insect- structure and function*. Cambridge university press, pp. 121-6
- Charriere, J.D., Imdorf, A.** (1999) Protection of Honey Combs From Wax Moth Damage. *American Bee Journal*
- Irving, P., Troxler, L., Hetru, C.** (2004) Is innate enough? The innate immune response in Drosophila. *CR biol.*, 327: 557-70

- Karp, R.D. & Duwel-Eby, L.E.** (1991) Adaptive immune responses in insects. In *Phylogenesis of Immune Functions*, ed. G.W. Warr & N. Cohen, Boca Raton FL: CLC Press, pp. 1-18.
- Kavanagh, K., Reeves, E.P.** (2004) Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbial Rev*, 28: 101-12
- Kavanagh, K., , Reeves, E.P** (2007) Insect and mammalian innate immune responses are much alike. *Microbe/volume 2*, 31(4): 347-59
- Lai, R., Lomař, L.O., Jonczy, J., Turner, P.C., Rees, H.H.** (2004) Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from hemolymph of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Biochemical Journal*, 681-685
- Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., a kol.** (2004) Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol Biol*, 13: 65-72
- Leger, R.J. St, Screen, S.E., Shams-Pirzadeh, B.** (2006) Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 320-4
- Lehane, M.J., Wu, D., Lehane, S.M.** (1997) Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21): 11502-7
- Lemaitre, B., Hoffmann, J.** (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.*, 25: 697-743

- Matsuyama, K., Natori, S.** (1988). Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biological Chemistry*, 263:17117-17121
- Matsuzaki, K.**, (1999) Why and how are peptide-lipid interaction utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochem. Biophys Acta*, 1462: 1-10
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J.B, Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S.B., et al.** (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*, 73: 3842-50
- Novák, I., Pokorný, V.** (2003) *Atlas motýlí*. Nakladatelství Paseka
- Otvos, L. Jr** (2002) The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(7):1138-50
- Reddy, K.V.R., Yeredy, R.D., Aranha, C.** (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 536–547
- Reeves, E.P., Messina, C.G.M., Doyle, S., Kavanagh, K.** (2004) Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, 158: 73-9
- Richman, A.M., Dimopoulos, G., Seeley, D., Kafatos, F.C.** (1997) *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitos. *The EMBO Journal*, 16:6114-6119
- Royet, J.** (2004) Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Mol. Immunol.*, 41(11):1063-75.

Salášková, V., Hyršl, P. (2008) Stále stejný zavíječ voskový *Galleria mellonella*?, *Zoologické dny České Budějovice 2008*, pp. 177-178,

Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., and Podsiadlowski, L. (2003) Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 53: 125-133

Snodgrass, R.E. (1935) Principles of insect morphology. London and New York: McGraw-Hill

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246-8

Stephens, J.M. (1959) Immune response of some insects to some bacterial antigens. *Canadian Journal of Microbiology*, 5: 203-228

Stephens, J.M. (1962) Bactericidal activity of the blood of actively immunized wax moth larvae. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 491-499

The Knottin database - <http://knottin.cbs.cnrs.fr/>

Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1):4-30

Tossi A., Sandri L. (2002) Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr. Pharm. Des.*, 8(9):743-61

Tsutsumi-Ishii, Y. (2000) Role of CCAAT/ enhancer-binding protein site in transcription of human neutrophil peptide-1 and-3 defensin genes. *Journal of Immunology*, 164: 3264-3273

- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L.** (2000) Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, 13(5): 737-48
- Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaire, B.** (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions.. *Curr Opin Microbiol*, 5: 102-10
- Vilmos, P., Kurucz, E.** (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett.*, 62(2):59-66
- Vizioli, J., Salzet, M.** (2002) Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23: 494-6
- .
- Wigglesworth, V.B.** (1940) The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 77: 91-121
- Wojda, I., Kowalski, P., Jakubowicz, T.** (2009) Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *J Insect Physiol*, 55(6):525-31
- www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm**
- Yamasaki, K., Gallo, R.L.** (2008) Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. Journal Dermatol*, 18: 11-21