

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Funkce oxidu dusnatého v signálních drahách vrozené imunity hmyzu**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Petra Gajdošíková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.</b>
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za věnovaný čas, odborné vedení, trpělivost a cenné rady při psaní této diplomové práce. Také děkuji katedře biochemie za vstřícný přístup a rady během práce na experimentální části.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Gajdošíková
Název práce	Funkce oxidu dusnatého v signálních drahách vrozené imunity hmyzu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Oxid dusnatý (NO) jako významná signální molekula může reagovat s celou řadou reaktivních sloučenin za vzniku reaktivních forem dusíku, které hrají roli v rámci signálních drah NO prostřednictvím posttranslačních modifikací cílových proteinů. Na rozdíl od obratlovců se u bezobratlých nachází pouze vrozená imunita, jejíž součástí je tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku. Signalizace zprostředkovaná NO hraje důležitou roli v obraně hmyzu při infekcích způsobených nejrůznějšími patogeny a NO také působí jako nespecifická cytotoxická molekula, kdy jeho přeměnou vznikají reaktivní molekuly, které se podílí na poškození DNA, proteinů a lipidů.

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty aktuální znalosti o funkci NO v rámci metabolismu a imunitního systému hmyzu. Jsou zde také popsány enzymové i neenzymové mechanismy vzniku NO a jeho reaktivita.

V experimentální části byly na vzorcích včely medonosné a octomilky obecné testovány metody stanovení aktivit enzymů – thio-redoxinreduktasy (TrxR), NO synthasy (NOS) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). Dále byly studovány změny metabolismu NO při vystavení včel modelovým patogenům. Metodou Western blotting s následnou imunochemickou detekcí proteinů byly testovány dvě protilátky – králičí polyklonální anti-GSNOR a univerzální anti-NOS a byly optimalizovány podmínky jejich použití.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, imunita, <i>Apis mellifera</i> , včela medonosná, <i>Drosophila</i>
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and Bc. Petra Gajdošíková  
surname

Title Functions of nitric oxide in signalling pathways of  
insect innate immunity

Type of thesis Master's

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2021

### Abstract

Nitric oxide (NO) as an important signaling molecule can react with a variety of reactive compounds to form reactive nitrogen species that play a role in NO signaling pathways through posttranslational modifications of target proteins. Unlike vertebrates, invertebrates have only innate immunity, which includes the production of reactive oxygen and nitrogen species. NO-mediated signaling plays an important role in insect defense in infections caused by a variety of pathogens, and NO also acts as a nonspecific cytotoxic molecule, transforming reactive molecules that contribute to DNA, protein, and lipid damage.

The theoretical part of the thesis summarizes the current knowledge about the function of NO in the metabolism and immune system of insects. Both enzymatic and nonenzymatic mechanisms of NO formation and its reactivity are also described. In the experimental part, methods for determining the activities of enzymes - thioredoxin reductase (TrxR), NO synthase (NOS) and S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) were tested on samples of honeybees and fruit flies. Furthermore, changes in NO metabolism during exposure of bees to model pathogens were studied. Two antibodies were tested by Western blotting followed by immunochemical detection of proteins - rabbit polyclonal anti-GSNOR and universal anti-NOS and the conditions of their use were optimized.

Keywords Nitric oxide, immunity, *Apis mellifera*, honey bee,  
*Drosophila*

Number of pages 93

Number of appendices 0

Language Czech

## **OBSAH**

1	Úvod .....	7
2	Současný stav řešené problematiky .....	9
2.1	Oxid dusnatý.....	9
2.1.1	Biosyntéza NO .....	9
2.1.2	Reaktivita NO.....	14
2.1.3	Funkce NO .....	16
2.2	Imunita hmyzu .....	19
2.2.1	NO v rámci imunity .....	20
2.2.2	Signální dráhy v rámci imunitní odpovědi.....	22
2.3	Regulace S-nitrosace proteinů .....	28
2.3.1	S-nitrosoglutathionreduktasa.....	29
2.3.2	Thioredoxinový systém.....	33
3	Experimentální část .....	38
3.1	Chemikálie .....	38
3.2	Přístroje a vybavení .....	39
3.3	Biologický materiál.....	39
3.4	Experimentální metody .....	41
3.4.1	Příprava vzorků pro stanovení aktivity GSNOR .....	41
3.4.2	Příprava vzorků pro stanovení aktivity NOS .....	41
3.4.3	Příprava vzorků pro stanovení aktivity TrxR.....	42
3.4.4	Příprava vzorků pro SDS-PAGE .....	42
3.4.5	Příprava S-nitrosoglutathionu .....	42
3.4.6	Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové .....	43
3.4.7	Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR .....	43
3.4.8	Spektrofotometrické stanovení aktivity TrxR .....	44
3.4.9	Stanovení aktivity NOS pomocí NO analyzátoru .....	45
3.4.10	Stanovení aktivity NOS metodou s 2,3-diaminonafalenem.....	46
3.4.11	Separace proteinů metodou SDS-PAGE.....	47
3.4.12	Semi-dry Western blotting .....	50
3.4.13	Imunochemická detekce proteinů.....	50
4	Výsledky.....	53

4.1	Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové .....	53
4.2	Zavedení metody stanovení aktivity TrxR .....	54
4.3	Optimalizace metody semi-dry Western blotting .....	55
4.4	Imunochemická detekce proteinů .....	56
4.4.1	Testování králičí polyklonální protilátky anti-GSNOR .....	56
4.4.2	Testování univerzální protilátky anti-NOS .....	63
4.5	Aktivita NOS u klinicky zdravých včel .....	66
4.5.1	Stanovení aktivity NOS metodou s 2,3-diaminonafalenem .....	66
4.5.2	Testování inhibice NOS .....	67
4.6	Stanovení aktivity GSNOR u klinicky zdravých včel a octomilky .....	68
4.7	Analýza GSNOR u včel infikovaných viry .....	69
4.7.1	Detekce GSNOR .....	69
4.7.2	Stanovení aktivity GSNOR .....	70
4.8	Detekce GSNOR u octomilky .....	71
5	Diskuze .....	72
5.1	Zavedení metody stanovení aktivity TrxR .....	72
5.2	Testování králičí polyklonální anti-GSNOR protilátky .....	72
5.3	Testování univerzální anti-NOS protilátky .....	75
5.4	Stanovení aktivity NOS a testování inhibitorů .....	77
5.5	Detekce GSNOR u octomilky a včel infikovaných viry .....	78
5.6	Stanovení aktivity GSNOR .....	79
6	Závěr .....	81
	Seznam citované literatury .....	83
	Seznam použitých zkratk .....	91

## **Cíle práce**

V rámci teoretické části bylo cílem vypracovat literární rešerši aktuálních znalostí o funkci oxidu dusnatého v imunitě hmyzu, se zaměřením na úlohu oxidu dusnatého v interakcích hmyzu s virovými, bakteriálními a houbovými patogeny.

Cílem v experimentální části bylo testování metod stanovení enzymů ve vzorcích hmyzu a dále studium změn metabolismu oxidu dusnatého při vystavení včel modelovým patogenům.



## 1 Úvod

NO je malá plynná signální molekula. Vzhledem k tomu, že se vyskytuje ve formě volného radikálu, má poměrně krátkou dobu života. Díky jeho malé velikosti a lipofilnímu charakteru snadno difunduje přes buněčné membrány a stává se tak biologicky aktivním poslem. V aerobním prostředí pak reaguje s O<sub>2</sub> za tvorby dusitanových a dusičnanových aniontů (Bogdan, 2015). Jako volný radikál také reaguje se superoxidem za tvorby reaktivních forem dusíku (RNS), jako jsou například peroxynitrit nebo oxidy dusíku (Goldstein a Merenyi, 2008). RNS pak hrají velkou roli v rámci signálních drah NO, a to prostřednictvím posttranslačních modifikací cílových proteinů. Mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů spojené s NO patří S-nitrosace cysteinových thiolů a nitrace tyrosinů nebo histidinů (del Río, 2015). NO může být v buňce produkován pomocí celé řady enzymových i neenzymových reakcí. Biosyntéza NO s využitím enzymu NO synthasy (NOS) probíhá u bezobratlých, obratlovců i bakterií. U rostlin nebyla zatím přítomnost tohoto enzymu potvrzena (Mur *et al.*, 2013; Kolbert *et al.*, 2019). NOS jsou poměrně velké enzymy obsahující vazebná místa pro hem a kofaktory. Mezi tyto kofaktory patří flavinadenindinukleotid (FAD), flavinadeninmononukleotid (FMN), nikotinamidadenindinukleotid (NADPH) a tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>).

Na rozdíl od obratlovců se u bezobratlých nachází pouze vrozená imunita, která zajišťuje veškerou imunitní odpověď. Jedním z mechanismů vrozené imunity je tvorba reaktivních kyslíkových a dusíkových metabolitů. Tento mechanismus lze nalézt jak u bezobratlých, tak u obratlovců. Imunitní systém hmyzu můžeme rozdělit na buněčnou (fagocytóza, enkapsulace a nodulace) a látkovou (syntéza antimikrobiálních peptidů a fenoloxidasová kaskáda) složku. Jedním z důležitých mechanismů obrany včel proti virům je RNA interference. Aktivace látkové odpovědi a následná produkce antimikrobiálních peptidů je řízena různými signálními drahami jako je JAK/STAT dráha, JNK dráha, MAPK a NF-κB zprostředkovaná Toll a Imd dráha (McMenamin *et al.*, 2018). NO signalizace hraje důležitou roli v obraně hmyzu při infekcích způsobených viry, bakteriemi, prvoky a dalšími mnohobuněčnými organismy. NO také působí jako nespecifická cytotoxická molekula, kdy jeho přeměnou vznikají reaktivní molekuly, které se podílí na poškození DNA, proteinů a lipidů (Rivero, 2006; Hillyer a Estévez-Lao, 2010). NO může také prostřednictvím S-nitrosace působit na funkci proteinů a ovlivňovat tak imunitní odpověď (Foster *et al.*, 2003).

S-nitrosoglutathion, jakožto S-nitrosovaný derivát nejhojněji zastoupeného buněčného thiolu glutathionu, je zásobní formou NO a je také důležitou součástí NO signalizace. S-nitrosothioly podléhají degradaci několika způsoby. Mezi neenzymové způsoby řadíme homolytický rozklad S-N vazby, fotolytické štěpení S-N vazby nebo degradaci zprostředkovanou kovovým iontem. Alternativní, dobře prostudovaný mechanismus rozkladu S-nitrosoglutathionu zahrnuje jeho reakci s ostatními thioly, kdy dojde k přenosu nitroso skupiny. Tato reakce je označována jako transnitrosace (Broniowska *et al.*, 2013). Denitrosace neboli odstranění NO skupiny primárně z thiolu cysteinů v postranním řetězci proteinů je důležitou součástí signalizace NO. Dříve se předpokládalo, že tento proces probíhá spontánně a není regulován. Později bylo zjištěno, že je katalyzován enzymy a podléhá regulaci (Benhar *et al.*, 2009). Narozdíl od NO, jehož vznik, funkce a zapojení v imunitních reakcích jsou u hmyzu dlouhodobě studovány, tak informace o výskytu S-nitrosace, S-nitrosoglutathionu a enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy nejsou u hmyzu příliš známé. Jedním z cílů této diplomové práce je proto rozšířit tyto informace.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Oxid dusnatý

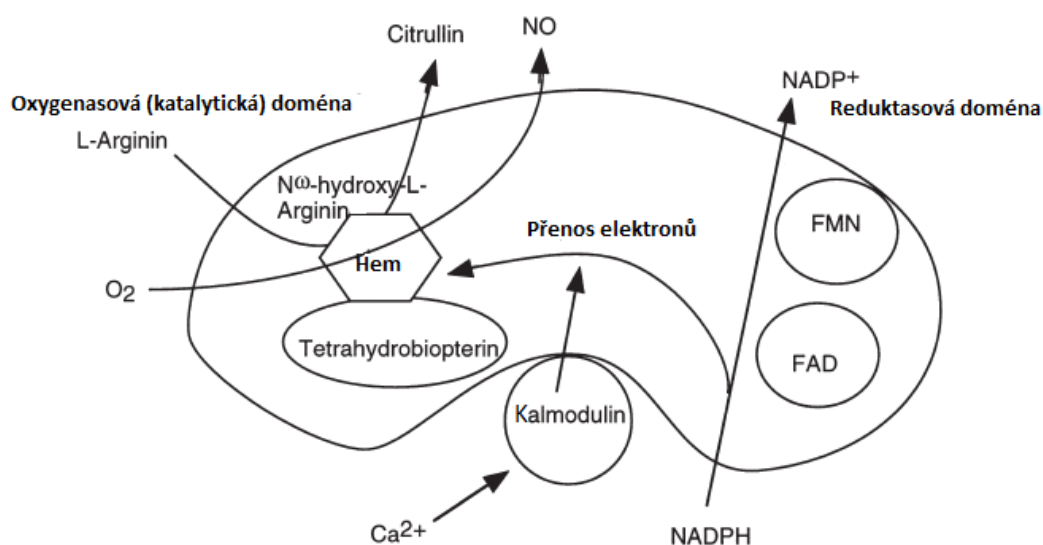
NO je malá plynná signální molekula, která se díky přítomnosti jednoho nepárového elektronu na  $2\pi^*$  protivazebném orbitalu řadí mezi radikály. Vzhledem k tomu, že se vyskytuje ve formě volného radikálu ( $\text{NO}\cdot$ ), má poměrně krátkou dobu života. Jeho stabilita však závisí na vlastnostech a složení prostředí. V aerobním vodném prostředí je jeho doba života několik sekund, v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku je stabilnější a doba života může být až 15 sekund. Díky jeho malé velikosti a lipofilnímu charakteru  $\text{NO}\cdot$  snadno difunduje přes buněčné membrány a může tak plnit funkci biologicky aktivního posla. V aerobním prostředí pak reaguje s  $\text{O}_2$  za tvorby dusitanových ( $\text{NO}_2^-$ ) a dusičnanových ( $\text{NO}_3^-$ ) aniontů (Bogdan, 2015). Jako volný radikál také reaguje se superoxidem ( $\text{O}_2^-$ ) za vzniku RNS, jako jsou například peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) nebo oxidy dusíku ( $\text{NO}_x$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ) (Goldstein a Merenyi, 2008). RNS pak hrají velkou roli v rámci signálních drah NO, a to prostřednictvím posttranslačních modifikací cílových proteinů. Mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů spojené s NO patří S-nitrosace cysteinových thiolů a nitrace tyrosinů nebo histidinů (del Río, 2015).

#### 2.1.1 Biosyntéza NO

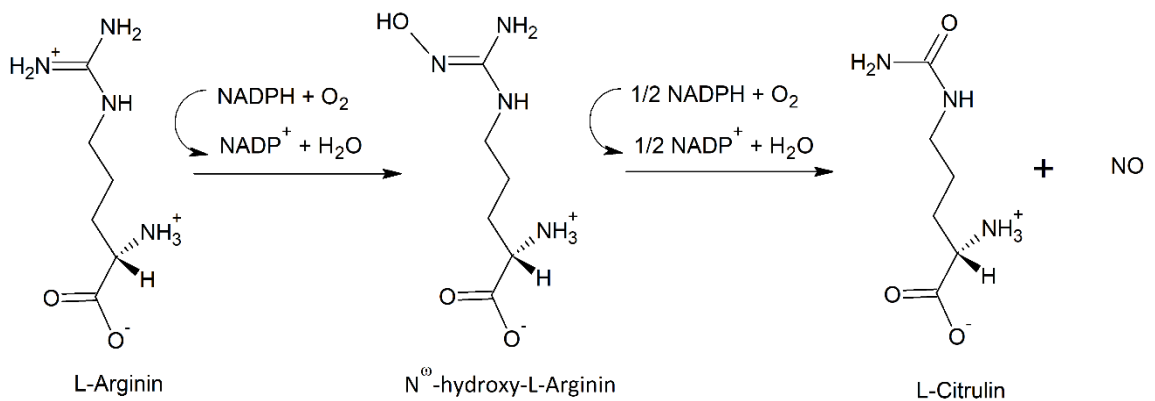
NO může být v buňce produkován celou řadou enzymových i neenzymových reakcí, a to v závislosti na místě vzniku a podnětu pro tvorbu NO. Biosyntéza NO s využitím enzymu NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) probíhá u bezobratlých, obratlovců i bakterií. U rostlin nebyla zatím přítomnost tohoto enzymu jednoznačně prokázána (Mur *et al.*, 2013; Kolbert *et al.*, 2019). Mezi neenzymové zdroje NO řadíme dusitany nebo S-nitrosothioly (RSNO). Tvorba NO z  $\text{NO}_2^-$  probíhá v buňce při sníženém pH a je urychlována přítomností reductantů. Za podmínek hypoxie dochází v tkáních ke hromadění takto vzniklého NO, a ten se pak váže na různé hemové proteiny. Například u člověka při ischemii či úrazových stavech, kdy dochází k acidóze a hypoxii, tento způsob vzniku NO převažuje nad enzymovou tvorbou pomocí NOS. Tento mechanismus neenzymové tvorby NO má důležitou úlohu v rámci pochopení mechanismu vývoje určitých patologických stavů a následné léčby daných onemocnění (Zweier *et al.*, 1999). Jelikož vazba S-NO u RSNO je silně polarizovaná, může dojít k snadnému uvolnění NO z nestabilních RSNO. Nejčastějšími produkty rozkladu RSNO je NO a příslušný disulfid (Jahnová *et al.*, 2013).

### 2.1.1.1 NO synthasa

Rodina enzymů, které tvoří NO oxidací L-argininu, jsou známy jako NOS. Jedná se o velké dimerní enzymy obsahující vazebná místa pro hem a kofaktory. Mezi tyto kofaktory patří FAD, FMN, NADPH a  $BH_4$ . NOS komplex se skládá z oxygenasové a reduktasové domény (Davies, 2000). Katalytická oxygenasová doména obsahuje hemovou skupinu,  $BH_4$  a váže substrát L-arginin. Reduktasová doména obsahuje vazebná místa pro FAD, FMN a NADPH. Komplex kalmodulinu a  $Ca^{2+}$  iontu se u endotheliální a neuronální NOS váže v regulačním místě mezi dvěma doménami a usnadňuje proces přenosu elektronů (Kavya *et al.*, 2006; Obr. 1). U indukovatelné NOS je kalmodulin pevně vázán a aktivita není závislá na koncentraci  $Ca^{2+}$ . Při oxidaci L-argininu nejdříve dochází k začlenění molekulárního kyslíku do nestabilního meziprojektu  $N^{\omega}$ -hydroxy-L-argininu. Během této reakce dochází k uvolnění elektronů z NADPH za vzniku  $NADP^+$  a konečnými produkty reakce jsou L-citrulin a NO (Schmidt *et al.*, 1996; Obr. 2).



Obr. 1 Reakční schéma tvorby NO enzymovým komplexem NOS. Ze substrátu L-argininu, molekulárního kyslíku a NADPH je tvořen L-citrulin a NO přes intermediát  $N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginin. Katalytická doména enzymu s vazebným místem pro substrát obsahuje hem, tetrahydrobiopterin a je aktivní jako dimer. Kofaktory FAD, FMN a NADPH se vážou k reduktasové doméně enzymu.  $Ca^{2+}$ /kalmodulin usnadňuje přenos elektronů mezi oběma doménami (převzato a upraveno podle Davies, 2000).



Obr. 2 Reakční mechanismus tvorby NO z L-argininu katalyzované enzymem NOS. Ze substrátu L-argininu, molekulárního kyslíku a NADPH je tvořen L-citrulin a NO přes intermediát N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginin.

NOS jsou kódovány velkou multigenovou rodinou a vyskytují se v několika isoformách. U obratlovců byly identifikovány 3 geny: *NOS1*, *NOS2* a *NOS3*. Konzervace struktury exonů a intronů u všech tří lidských genů naznačuje, že tyto geny pochází z jednoho původního genu (Hall et al., 1994). NOS isoformy byly nejdříve pojmenovány podle druhu tkáně, ve které byly původně popsány, jako endoteliální NOS (eNOS) a neuronální NOS (nNOS). Tyto dvě isoformy jsou také označovány jako konstitutivní (cNOS), jsou součástí bazálního metabolismu buňky, jsou exprimovány kontinuálně, a tudíž je produkce NO katalyzovaná cNOS konstantní a poměrně malá (Rivero, 2006). Indukovatelné, někdy také označované jako makrofágové NOS (iNOS), jsou ve velké míře syntetizovány fagocyty jako odpověď na prozánětlivé cytokiny při infekcích. Katalyzují produkci velkého množství NO až do vyčerpání substrátu L-argininu (Alderton et al., 2001). Různé buňky a tkáně mohou obsahovat současně několik aktivních isoform NOS, které mohou být jak konstitutivní, tak indukovatelné (Forstermann et al., 1998).

### 2.1.1.2 Hmyzí NO syntasa

NOS je u hmyzu považována za hlavní enzymový zdroj NO a v hmyzích genomech byla nalezena pouze jedna kopie genu NOS (Davies, 2000). V prvotních studiích byla cDNA NOS klonována u čtyř druhů hmyzu: octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*; Regulski a Tully, 1995), zákeřnice (*Rhodnius prolixus*; Yuda et al., 1996), komára rodu *Anopheles* (*Anopheles stephensi*; Luckhart et al., 1998) a lišaje tabákového (*Manduca sexta*; Nighorn et al., 1998). Klonování NOS z octomilky (dNOS) odhalilo rozsáhlé

podobnosti s živočišnou nNOS/*NOS1*, jak na úrovni sekvence DNA, tak i aminokyselinové sekvence proteinu. Heterologní exprese *dNOS* prokázala, že aktivita dNOS je závislá na  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu (Regulski a Tully, 1995). Sekvence hmyzích NOS obecně vykazují vysokou podobnost s *NOS1* genem (až 49 %) v porovnání s eNOS/*NOS3* (44% podobnost) a nNOS/*NOS2* (47% podobnost) (Luckhart a Rosenberg, 1999). Analýzou proteinových sekvencí hmyzích NOS byly objeveny rozsáhlé oblasti se 100% podobností s isoformami NOS u obratlovců. Tato místa zahrnují vazebná místa pro kalmodulin a kofaktory FAD, FMN a NADPH. NOS je u octomilky jedním z největších proteinů, obsahuje rozsáhlé polyglutaminové sekvence v blízkosti N-konce. Zajímavostí je, že N-koncové oblasti jsou u různých druhů hmyzu navzájem nejméně podobné. Naopak konzervované sekvence mezi různými druhy a jejich podobnost s konstitutivní nNOS naznačuje, že všechny členy hmyzí rodiny NOS jsou regulovány podobným způsobem. Aktivita NOS u rodu *Anopheles* se zvyšuje při infekci, což je příklad toho, že aktivita NOS může být za určitých podmínek u hmyzu také indukovatelná (Luckhart a Rosenberg, 1999).

Müller (1994) provedl experiment s využitím aktivity tzv. NADPH diaforasy (NADPHd; EC 1.6.99.1), jako markeru pro buňky exprimující aktivní NOS. Jedná se o nespecifickou enzymovou aktivitu, kdy NOS katalyzuje přenos elektronů z NADPH na umělý akceptor, jehož redukcí vzniká barevný produkt, který lze sledovat např. mikroskopickými metodami. V této studii byl zkoumán vztah mezi NADPHd a NOS v nervové tkáni u včely a octomilky. Provedením několika experimentů, například s využitím nitrotetrazoliové modři jako akceptoru elektronů pro NADPHd bylo potvrzeno, že NADPHd aktivita u hmyzu odpovídá přítomnosti NOS. Co se týče vlastností zkoumané hmyzí NOS, v přítomnosti  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  NADPH a  $50 \text{ nmol.l}^{-1}$  kalmodulinu byla pro maximální stimulaci NOS potřebná koncentrace  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ . V případě, kdy koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  přesáhla hodnotu  $0,3 \text{ mmol.l}^{-1}$  se aktivita enzymu snížila o 30 – 40 %. U této hmyzí NOS byla zjištěna vysoká afinita k L-argininu s hodnotou  $K_M$   $1,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $V_{\text{lim}}$   $1,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na mg proteinu za 1 min. Tyto výsledky byly ve stejném rozmezí hodnot, jako tomu bylo zjištěno v případě NOS u obratlovců (Bredt a Snyder, 1990). Dále bylo zjištěno, že  $\text{N}^{\omega}$ -monomethyl-L-arginin ( $K_I = 1,7 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) i  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-arginin ( $K_I = 1,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) jsou efektivními kompetitivními inhibitory hmyzí NOS. U obou zástupců hmyzu byla nejvyšší aktivita NOS v mozkové tkáni, zatímco v hrudní části byla aktivita NOS a NADPHd vzhledem k celkové aktivitě menší než 5%. V rámci mozku pak byla u včely i octomilky nejvyšší aktivita naměřena

v chemosenzorickém centru tykadlových laloků a nejmenší v oblasti zrakového centra. Později bylo prokázáno, že vysoké hladiny NOS v chemosenzorických oblastech mozku hmyzu souvisí s funkcí NO v rámci čichového vjemu, což bylo doposud známo pouze u obratlovců. Chemosenzorický vjem u hmyzu je přijímán přes tykadla a dále zpracován právě v tykadlovém laloku (Davies, 2000).

Imamura *et al.* (2002) popsali vlastnosti NOS bource morušového (*Bombyx mori*; *BmNOS*). Aminokyselinová sekvence *BmNOS* ukázala 84% shodu s NOS *M. sexta* (Nighorn *et al.*, 1998) a 54% shodu s *dNOS* (Regulski a Tully, 1995). Imamura *et al.* 2002 také zjistili, že gen pro *BmNOS* je v nízkých hladinách exprimován konstitutivně v tukovém tělísku larvy a u dospělců v hemocytech, Malpighických trubicích nebo tykadlech. Naproti tomu lipopolysacharidy silně indukovaná exprese tohoto genu byla nalezena v tukovém tělesu, což znamená, že *BmNOS* hraje v rozdílných tkáních odlišnou fyziologickou roli. U *B. mori* byly na úrovni proteinů nalezeny dvě rozdílné formy NOS. V obou případech se jedná o konstitutivní enzymy, ale jedna je  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulin závislá, zatímco druhá je  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislá, ale kalmmodulin závislá. Bylo zjištěno, že aktivity obou enzymů výrazně vzrostou během posledního larválního stádia před zakuklením (Choi *et al.*, 1995).

U bezobratlých byla tedy prokázána pouze jedna isoforma NOS, která může být jak konstitutivní (se signální funkcí), nebo indukovatelná (funkce obranná). V některých případech může mít jedna isoforma obě funkce (Rivero, 2006).

Ve hmyzí hemolymfě dochází během imunitní odpovědi k enkapsulaci a následně melanizaci, což je proces, při kterém je spotřebováván kyslík. V hemolymfě tak mohou vznikat místa s nízkou koncentrací kyslíku, tzv. melanózní kapsule. V těchto místech může uvnitř hemocytů docházet ke zvýšené nitritreduktasové aktivitě. Kombinace vyšší koncentrace dusitanů se zvýšenou nitritreduktasovou aktivitou hemocytů během tvorby melanózních kapsulí může vést k prudkému zvýšení produkce NO v určitých místech (Komarov *et al.*, 2006). Semenova *et al.*, 2014 provedli experiment, kdy sledovali tvorbu NO v hemocytech larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) během imunitní odpovědi. Pozorovali signifikantní nárůst hladiny NO v hemocytech, do kterých byly vneseny dusitanů o koncentraci  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . V tomto případě byla rychlost tvorby NO  $2 \text{ nmol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Přídavek dusitanů o stejné koncentraci k lyzovaným hemocytům také vedl ke zvýšení rychlosti tvorby NO, která byla  $20\text{-}30 \text{ nmol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Tyto výsledky poukazují na přítomnost nitritreduktasové aktivity především uvnitř hemocytů. Dá se tedy konstatovat, že tento způsob vzniku NO je důležitým zdrojem i modulátorem tvorby NO

v hemolymfě larvy zavíječe voskového během imunitní odpovědi. Navíc dráha redukce dusitanů za vzniku NO je pravděpodobně energeticky výhodnější než dráha NOS. Dusitany také mohou být lehce zavedeny do hmyzí hemolymfy jako součást potravy (Semenova *et al.*, 2014).

### 2.1.2 Reaktivita NO

Reakcí NO s reaktivními partnery jako jsou např. reaktivní formy kyslíku (ROS), thioly, lipidové radikály a přechodné kovy v hemových strukturách dochází ke změně jejich biologické aktivity. Mezi významné posttranslační modifikace proteinů spojené s NO patří nitrosace, nitrosylace či nitrace. Nitrace je připojení skupiny  $\text{NO}_2^+$  k aromatické skupině, například při nitraci tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu. Jako nitrosace se označuje adice nitrosoniové skupiny ( $\text{NO}^+$ ) na jinou chemickou skupinu. Nitrosylací se označuje připojení nitrosylové skupiny ( $\text{NO}\bullet$ ) k jiné chemické skupině pomocí koordinačně kovalentní vazby. N-nitrosací je označována vazba na atomu dusíku primárních a sekundárních aminů a označení S-nitrosace či S-nitrosylace pak popisuje vazbu mezi skupinou NO a atomem síry. S-nitrosace a S-nitrosylace jsou reverzibilní, místně specifické modifikace proteinů. V současnosti jsou považovány za jedny z nejdůležitějších mechanismů posttranslačních modifikací proteinů a regulace jejich aktivity. Jsou řazeny mezi tzv. redoxní signální dráhy, tedy založené na redoxních změnách molekul. Těmito procesy vznikají RSNO. Vedle proteinů podléhají těmto modifikacím také nízkomolekulární thioly, jako je například S-nitrosoglutathion (GSNO). V porovnání s NO mají delší dobu života, *in vivo* tedy mohou sloužit jako transportní a zásobní formy NO (Jahnová *et al.*, 2013).

Funkcí několika specializovaných enzymů jako je NADPH oxidasa (EC 1.6.3.1), myeloperoxidasa (EC 1.11.2.2) nebo NOS je produkce ROS nebo RNS. Kontrolovaný proces vzniku těchto reaktivních forem v extracelulárním prostoru byl evolučně vyvinut jako součást vrozeného imunitního systému k odstranění mikrobiálních patogenů. Nadměrná produkce ROS a RNS však může mít nežádoucí účinky, například poškození tkání. Další skupina enzymů uvolňuje reaktivní formy intracelulárně, případně mohou vznikat jako vedlejší produkt metabolických procesů. Například superoxid je tvořen v mitochondriálním dýchacím řetězci a monooxygenasovou aktivitou cytochromů P450 (CYP). Intracelulární vznik ROS a RNS je důležitou součástí intracelulárních signálních kaskád regulujících řadu základních fyziologických funkcí, jako je regulace tlaku



v cévách, syntéza inzulinu, proliferace buněk či diferenciaci. Nadměrná množství intracelulárních ROS a RNS mohou způsobovat oxidační poškození různých biomolekul. Oxidační stres značnou mírou přispívá k rozvoji chorob, především chorob spojených se stárnutím organismu (Weidinger a Kozlov, 2015).

NO• může reagovat se superoxidovým radikálem za vzniku peroxynitritu. Ten je za fyziologických podmínek nestálý a isomeruje na NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Vznik peroxynitritu závisí ve velké míře na množství superoxidového radikálu dostupného pro reakci s NO (Negri *et al.*, 2017). Peroxynitrit může podléhat dalším reakcím, jako je například tvorba kyseliny peroxodusité. Ta následně zprostředkovává řadu oxidačních a nitračních reakcí. Může například oxidovat thioly, kdy díky vysoké koncentraci glutathionu v organismu probíhá přednostně právě oxidace glutathionu před proteinovými RSNO. Reakcí ONOO<sup>-</sup> s NO vzniká NO<sub>2</sub> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. NO<sub>2</sub> vzniká také přímou oxidací NO molekulárním kyslíkem. Jedná se o reaktivní radikál, který je významně reaktivnější než NO. NO<sub>2</sub> může následně rychle reagovat s NO za vzniku N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který se dále účastní celé řady nitrosačních reakcí. Dále NO může reagovat s peroxylovým radikálem (RO•) za vzniku alkyl-peroxynitritu (ROONO), s hydroxylovým radikálem (OH•) za vzniku kyseliny dusité (HNO<sub>2</sub>) či s nitroxylovým aniontem (NO<sup>-</sup>) za vzniku oxidu dusného (N<sub>2</sub>O). NO<sub>2</sub>, ONOOH, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nebo HNO<sub>2</sub> mohou způsobovat nitrosaci, nitraci či deaminaci DNA bazí, čímž se narušuje struktura a funkce DNA a stává se nestabilní (Tuteja *et al.*, 2004).

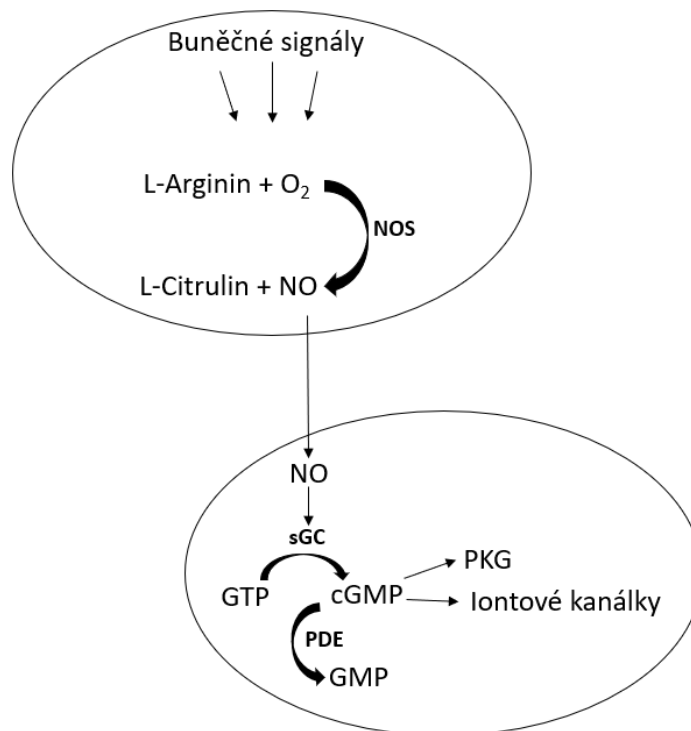
Významná část signálních funkcí NO je zprostředkována interakcí s ionty přechodných kovů v metaloproteinech, zejména tvorbou nitrosokomplexů s Fe ionty v hemoproteinech. Mezi důležité zástupce hemoproteinů regulovaných vazbou NO patří guanylátcyklasa (kap. 2.1.3), akonitasa nebo cytochrom c oxidasa (Tuteja *et al.*, 2004). Patří sem i rodina enzymů CYP, která je zapojena při odbourávání cizorodých látek a účastní se katabolismu mastných kyselin, steroidů, prostanglandinů a leukotrienů. Působením NO na tyto enzymy dochází k jejich inhibici, která může být reverzibilní i ireverzibilní. V případě reverzibilní inhibice je vazbou NO na hemovou skupinu enzymu znemožněna následná vazba O<sub>2</sub>, a tudíž i samotná enzymová reakce (Wink *et al.*, 1993; Dacher a Gauthier, 2008). Ireverzibilní inhibice je zprostředkována prostřednictvím RNS, kdy vazbou NO na hemovou skupinu vzniká koordinační adukt. Cysteinový ligand tohoto aduktu je poté odstraněn z koordinační sféry železa. RNS mohou poté působit nitrosačně či oxidačně na daný cysteinový ligand. Přeměna tohoto ligandu brání opětovnému připojení hemu, což vede k nevratné inhibici enzymové aktivity (Girvan a Munro, 2016). Enzymy rodiny CYP byly u hmyzu charakterizovány např. u octomilky obecné

(Hovemann *et al.*, 1997). Vyskytují se ve všech hmyzích tkáních a podílí se např. na syntéze a degradaci ekdysteroidů a juvenilního hormonu. U včel CYP zastávají také detoxifikační funkci a podílí se tak na ochraně včel před přírodními i syntetickými xenobiotiky včetně pesticidů (Manjon *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Funkce NO

V několika studiích byly popsány důležité role NO, například jeho signální funkce během procesu rozmnožování, při procesu učení a utváření paměti, kde působí jako neurotransmitter, nebo také během procesu obrany organismu proti cizímu hostiteli (Davies, 2000). U živočichů je NO produkován v periferním nervovém systému, kde se podílí na vasodilataci a regulaci určitých gastrointestinálních, respiračních a genitourinárních funkcí. NO je také tvořen při imunitních reakcích, kde se podílí na odstraňování nádorových buněk a ochraně před bakteriemi nebo viry (Nussler a Billiar, 1993). Široké spektrum fyziologických funkcí zprostředkovaných NO signalizací, je řízeno aktivací různých isoform NOS odlišnými stimuly a rychlou difuzí molekul NO přes membrány (Davies, 2000).

Principem signálních účinků NO je jeho interakce s určitými reaktivními partnery, čímž dochází ke změně jejich biologické aktivity. Mezi tyto partnery patří např. ROS, lipidové radikály, přechodné kovy v metaloproteinech a thioly. NO se může vázat na atom železa hemu v aktivním místě enzymu guanylátcyklasy (EC 4.6.1.2), čímž se tento enzym stává aktivním a katalyzuje tvorbu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z GTP (Tuteja *et al.*, 2004). cGMP v závislosti na typu buňky a fyziologickém stavu dále aktivuje nebo inhibuje cílů, včetně cGMP dependentních proteinkinás (PKG) či fosfodiesteras (PDE) nebo iontových kanálků (Vaandrager a de Jonge, 1996; Obr. 3). Vzhledem k tomu, že některé formy NOS jsou aktivované  $\text{Ca}^{2+}$ , signální mechanismy vápenatých iontů jsou také zahrnuty v NO signalizaci.



Obr. 3 Signální dráha NO zprostředkovaná cGMP. Aktivace NOS a následná tvorba NO jako odpověď na řadu buněčných signálů, podle typu buňky a isoformy NOS. NO následně prochází přes membrány a aktivuje rozpustnou guanylátcyklasu (sGC) v cílových buňkách, čímž se zvýší intracelulární hladina cGMP, který následně aktivuje cGMP-závislé iontové kanálky, cGMP-závislé proteinkinasy (PKG). cGMP je následně odbouráván na GMP fosfodiesterasou (PDE; upraveno podle Davies, 2000).

Bylo prokázáno, že NO hraje roli v procesu čichu jak u obratlovců, tak bezobratlých. Chemosenzorický vjem u hmyzu je přijímán přes tykadla, zpracování a integrace signálu probíhá v tykadlovém laloku (Davies, 2000). U některých zástupců řádu motýlů je v tykadlech vysoce exprimována NOS, zatímco guanylátcyklasa je exprimována v oblasti neuronů tykadlového laloku, což znamená, že komunikace mezi čichovými receptory a centry, kde dochází ke zpracování signálu, je modulována NO signalizací. NO tedy funguje jako neurotransmiter v centrálním nervovém systému a tykadlovém laloku u některých druhů hmyzu, jako je octomilka obecná, lišaj tabákový, saranče pustinná (*Schistocerca gregaria*) nebo včela medonosná (*Apis mellifera*; Nighorn *et al.*, 1998). U octomilky a lišaje se NO také podílí na vývoji nervového systému (Gibbs a Truman, 1998).

Některé druhy hmyzu byly také využity ke studiu NO signalizačních procesů v rámci zrakového vjemu. U *S. gregaria* byla NOS lokalizována v sítnici a optickém laloku (Davies, 2000).

Hmyz živící se krví využívá slinné antikoagulační sloučeniny, které inhibují agregaci krevních destiček a vazokonstrikci u svého hostitele. U některých zástupců byly prokázány slinné vazodilatátory nitroforiny, které se skládají z hemového proteinu, který skládá a přenáší NO. Když hmyz kousne svého hostitele, dojde k uvolnění histaminu, což vyvolá imunitní reakci. Komplex nitroforinu s NO interaguje s uvolněným histaminem, čímž dojde k uvolnění NO do rány, kde působí jako vazodilatant a antikoagulátor (Valenzuela *et al.*, 1995).

NO má také signální roli v Malpighických trubicích octomilky (Dow *et al.*, 1994). Jedná se o žlázy s osmoregulační a exkreční funkcí, které jsou určitým prototypem genetického modelu epitelu transportujícího tekutiny. Bylo prokázáno, že sloučeniny uvolňující NO stimulují transport tekutiny přes tyto žlázy a také zvyšují hladiny cGMP uvnitř buňky. V těchto tkáních jsou také exprimovány další cíle signalizační dráhy NO a cGMP, včetně PKG. Konečným bodem signální dráhy NO/cGMP stimulované v Malpighických trubicích působením pomocí neuropeptidů je stimulace ATPasy typu V na apikální straně membrány, čímž dojde ke zvýšení sekrece tekutin (Davies *et al.*, 1995).

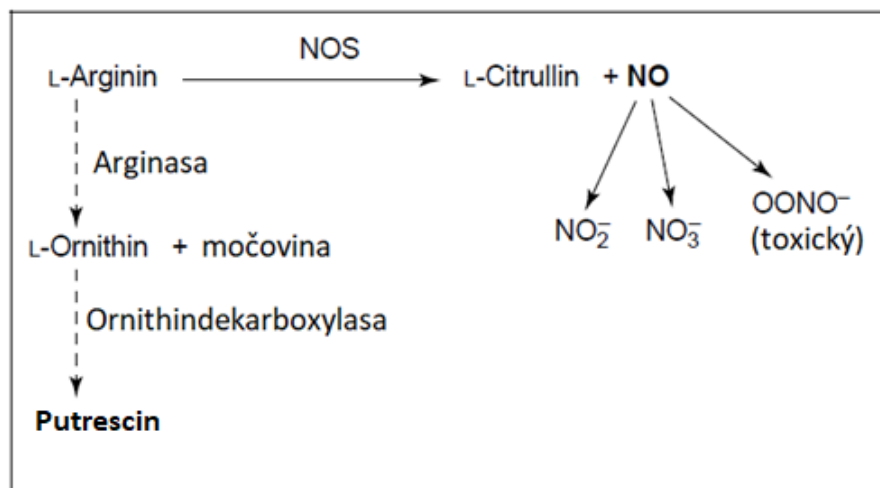
## 2.2 Imunita hmyzu

Hmyz se brání proti cizím organismům dobře vyvinutým vrozeným imunitním systémem. Na základní úroveň obrany řadíme fyzikální bariéry, které brání vstupu patogenu do organismu. Řadíme sem kutikulu, stěny tracheí nebo stěny trávicího traktu (Daníhlík a Petřivalský, 2015). Imunitní systém hmyzu můžeme dále rozdělit na buněčnou (fagocytóza, enkapsulace a nodulace hemocytů) a humorální neboli látkovou (syntéza antimikrobiálních peptidů, fenoloxidasová kaskáda, lysozym) složku. Odstranění organismů, které proniknou do hmyzího hemocoelu vyžaduje buňky hemolymfy – hemocyty, u hmyzu nejběžněji prohemocyty, granulocyty, plazmocyty, sferulocyty a oenocyty (Lavine a Strand, 2002). Jejich funkcí je rozpoznat tyto organismy a zprostředkovat danou odpověď vrozené imunity (Marmaras a Lampropoulou, 2009). Hemocyty na cizí částici reagují rychlou aktivací a následnou adhezí, kdy na cizím povrchu vytváří shluky. Po rozpoznání cizí částice se hemocyty začínají také dělit. Jestliže je částice malá dojde k fagocytóze, v případě větších částic nebo shlukování více menších částic do jedné větší dochází k enkapsulaci nebo nodulaci. Během enkapsulace hemocyty přilnou k povrchu cizí částice, následně se dělí a vytváří vrstvy hemocytů, až dojde k obalení celé částice. Následnou sekrecí cytotoxických sloučenin dojde k jejímu zničení (Eleftherianos *et al.*, 2009). Humorální imunitu hmyzu tvoří specifické molekuly, které se účastní imunitní odpovědi. Patří sem například lektiny, které se váží na glykosylované proteiny bakteriální buněčné stěny a spouští tak fagocytózu. K enzymům s imunitní funkcí patří lysozym a fenoloxidasa. Působením lysozymu je hydrolyzován murein, peptidoglykan grampozitivních ( $G^+$ ) bakterií (Gliński, 2001; Evans *et al.*, 2006). Fenoloxidasa (EC 1.14.18.1) je enzym, který v rámci fenoloxidasové kaskády katalyzuje oxygenaci fenolů na *o*-difenoly. *O*-difenoly jsou následně oxidovány na *o*-chinony, které jsou pak dále polymerovány na barvivo melanin. Tato biochemická dráha je aktivována lipopolysacharidy a peptidoglykany z bakteriální buněčné stěny nebo glukany z hub. Melanin tvoří přirozenou součást kutikuly hmyzu a má také antimikrobiální funkci (Kanost a Gorman, 1993; Daníhlík a Petřivalský, 2015). Významnou součástí humorální imunity jsou antimikrobiální peptidy (AMP), jejichž spektrum účinku je hodně široké a jsou proto účinné proti houbám, bakteriím i virům (Cooper, 2006). U hmyzu bylo popsáno přibližně 200 zástupců těchto peptidů (Li *et al.*, 2012). U včel bylo objeveno několik AMP v různých částech těla, například v hemolymfě (apidaeciny, abaecin, defensin a hymenoptaecin), v mateří kašičce (jelleiny, defensin)

nebo v jedové žláze (apamin, melittin; Danihlík *et al.*, 2015). Tyto peptidy působí tak, že se nejdříve navážou na vnější buněčnou stěnu bakterií, poté proniknou do mezimembránového prostoru a dále do cytosolu, kde interagují s DNA, RNA nebo cílovými proteiny (Hancock a Chapple, 1999). Tímto způsobem mohou inhibovat syntézu či skládání proteinů nebo jejich enzymovou aktivitu (Otvos *et al.*, 2000; Brogden, 2005).

### **2.2.1 NO v rámci imunity**

NO signalizace hraje důležitou roli v obraně při infekcích způsobených viry, bakteriemi, prvoky a dalšími mnohobuněčnými organismy. Navíc NO také působí jako nespecifická cytotoxická molekula (Rivero, 2006). To je způsobeno oxidací velkého množství NO molekul na peroxynitrit a další reaktivní molekuly, které se podílí na poškození DNA, proteinů a lipidů (Hillyer a Estévez-Lao, 2010). Většina patogenů a parazitů si postupně vytvořila obranné mechanismy k ochraně před účinky NO. Jedním z významných mechanismů je manipulace s hladinami enzymu arginasy u hostitele. Zvýšení hladiny tohoto enzymu, jehož funkcí je hydrolyza L-argininu na L-ornithin a močovinu, vyčerpá tímto způsobem substrát dostupný pro aktivitu NOS. Následně dochází k tvorbě polyaminů, které jsou nezbytné pro růst a diferenciaci parazitů (Obr. 4). Tuto strategii využívají například některé bakterie nebo prvoci, jako trypanozoma (*Trypanosoma*), ničivka (*Leishmania*) a krevnička (*Schistosoma*). Dalším mechanismem obrany před účinky NO u živočichů je případ, kdy parazité přednostně napadají tkáň bohaté na molekuly podílející se na odstranění NO z prostředí. Takovými molekulami je například hemoglobin nebo myoglobin (Vincendeau *et al.*, 2003). NO může také přímo působit na funkci proteinů prostřednictvím S-nitrosace, a tak ovlivňovat imunitní odpověď (Foster *et al.*, 2003). Například v plicním epitelu a Jurkat T-buňkách je inhbiční  $\kappa$ B kinasa, enzym zodpovědný za indukci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B, inhibován S-nitrosací (Reynaert *et al.*, 2004).



Obr. 4 Schéma kompetice arginasy a NOS o substrát L-arginin. NO je syntetizován oxidací L-argininu na L-citrulin za katalýzy enzymem NOS. NO je reaktivní radikál, který rychle podléhá dalším reakcím za vzniku stabilních produktů, jako jsou nitrity, nitráty nebo reaktivní peroxynitrit. V reakci katalyzované arginasou vzniká L-ornithin, který může být dekarboxylován za vzniku polyaminu putrescinu (převzato a upraveno podle Rivero, 2006).

Eleftherianos *et al.*, 2014 zkoumali vliv hladiny NO u pěti kmenů *D. melanogaster* v odpovědi na bakteriální infekci. Byly použity dva druhy patogenních (*Photobacterium luminescens* a *Enterococcus faecalis*) a dva druhy nepatogenních (*Escherichia coli* a *Micrococcus luteus*) bakterií. Hladiny dusitanů jako produktu NO oxidace, které odpovídají hladinám NO, byly měřeny spektrofotometricky. Bylo zjištěno, že neinfikovaní i infikovaní jedinci kmene Yellow-White (YW) obsahují značně nižší hladiny dusitanů v porovnání s ostatními kmeny. Další testy s využitím mutantů NOS potvrdily, že nižší hladiny dusitanů u YW kmene odpovídají zhoršené schopnosti přežití při bakteriálních infekcích. Předchozí studie také ukazují, že pozření bakterií vyvolává tvorbu NO ve střevě a hemocytech, což vede k aktivaci produkce AMP v tukovém tělísku (Foley a O'Farrell, 2003). Tento mechanismus je stěžejní pro účinnou imunitní odpověď u larev octomilky proti gramnegativním ( $G^-$ ) bakteriím.

Zvýšená produkce NO u octomilky infikované parazitoidní vosou (*Leptopilina boulardi*) spolu se zvýšenou produkcí  $O_2^- \cdot$  a  $H_2O_2$  dokazují, že ROS a RNS hrají důležitou roli při napadení organismu. Vykazují především cytotoxické vlastnosti, ale slouží také při přenosu signálu. Například u *B. mori* byla exprese pěti genů kódujících AMP ovlivněna inhibitorem NOS L-NAME ( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginin methylester hydrochlorid), z čehož bylo odvozeno, že NO zprostředkovává aktivaci látkové imunity (Ishii *et al.*, 2013).

Carton *et al.*, 2009 zjistili, že aplikace L-NAME do hemocoelu octomilky před vypuknutím infekce vyvolané  $G^-$  bakterií, tedy inhibice NOS a snížení koncentrace NO, vedlo k výraznému snížení přežití octomilek. Nadměrná produkce NO však může schopnost přežití hostitele snížit. Například 1-okten-3-ol, těkavá organická sloučenina vylučovaná některými houbami je škodlivá vzhledem k tomu, že se podílí na procesu zvýšené tvorby NO, který následnými reakcemi s ROS dává vznik toxickému peroxynitritu, což vede ke zkrácení doby života octomilky (Inamdar a Bennett, 2014).

Negri *et al.*, 2014 provedli studii, kde se zabývali produkcí NO v hemocytech včely při odpovědi na poranění a enkapsulaci. Během imunitní reakce je NO tvořen v hemocytech, podílí se na jejich aktivaci a účastní se tak přímo procesu hojení. V tomto experimentu bylo použito páté stádium larvy včely medonosné. Do těchto larev byla implantována nylonová vlákna, která byla odstraněna po 24 hod inkubaci. Po odebrání hemolymfy byla provedena detekce a kvantifikace NO s využitím fluorescenční próby, byl určen počet hemocytů, byla sledována jejich diferenciaci na plasmatocyty a granulocyty a také byla provedena analýza genové exprese s využitím kvantitativní PCR. Bylo potvrzeno, že poranění a enkapsulace vyvolané vložením nylonových implantátů do larev spouští tvorbu NO u granulocytů, které můžeme považovat za klíčové buňky imunitní odpovědi. Zvýšená tvorba NO však nebyla spojena se zvýšenou expresí genu pro včelí NOS (*AmNOS*), mohlo tedy dojít k aktivaci již přítomného enzymu nebo tvorbě NO neenzymovými mechanismy. Také došlo ke zvýšení počtu plasmatocytů, u kterých však nebyla pozorována zvýšená tvorba NO (Negri *et al.*, 2014).

### **2.2.2 Signální dráhy v rámci imunitní odpovědi**

Většina virů, napadajících včely jsou jednořetězcové RNA viry. Tyto viry většinou způsobují asymptomatické infekce, ale mohou zapříčinit také paralýzu, různé deformace či dokonce smrt. Závažnost infekce závisí na stavu imunitního systému včely a je také ovlivněna dalšími biotickými a abiotickými faktory. Mechanismy obrany včel proti virům zahrnují obecné procesy vrozené imunity včel jako je endocytóza či enkapsulace, dále RNA interferenci a imunitní signální dráhy jako je JAK/STAT (JAK; Janusovy kinasy/STAT; převodníky signálu a aktivátory transkripčních proteinů) dráha, JNK (Jun N-terminální kinasa) dráha, MAPK (mitogenem aktivované proteinkinasy) a NF- $\kappa$ B (jaderný faktor kappa B) zprostředkovaná Toll a Imd dráha (McMenamin *et al.*, 2018).

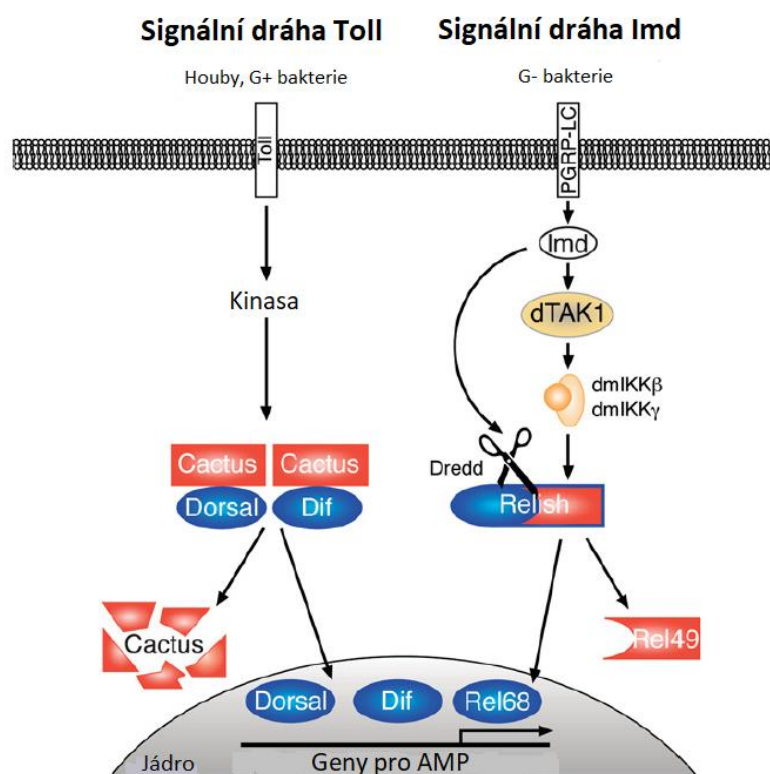


Mezi mediátory imunitní odpovědi řadíme biogenní aminy, cytokiny, eikosanoidy (prostaglandiny, leukotrieny a epoxyeikosatrienové kyseliny) a v poslední řadě také NO (Sadekuzzaman *et al.*, 2017). Prostaglandiny i leukotrieny zprostředkovávají aktivaci šíření hemocytů a tvorbu nodulů. Prostaglandiny také mobilizují přisedlé hemocyty nebo navázáním na specifický membránový receptor spouští lýzi hemocytů a tím dojde k uvolnění profenoloxidasy do plasmy. Inhibice biosyntézy eikosanoidů vyvolaná inhibicí fosfolipasy A2 potlačuje Imd a Toll signální dráhy u octomilky. Eikosanoidová signalizace je indukována cytokiny, eikosanoidy a biogenními aminy prostřednictvím malé proteasy Rac1, která zprostředkovává komunikaci mezi jednotlivými signálními drahami. Komunikace mezi cytokinovými a NO signály naznačuje, že NO by mohl ovlivňovat eikosanoidovou signalizaci u hmyzu. Inhibice aktivity fosfolipasy A2 vede k výrazné imunosupresi jak buněčné, tak látkové imunitní odpovědi, čehož využívají některé rody bakterií, jejichž cílem je právě fosfolipasa A2 (Sadekuzzaman *et al.*, 2017).

Bylo zjištěno, že role signální dráhy Toll u octomilky je v rámci detekce patogenů a vyvolání imunitní odpovědi evolučně zachována (Kopp a Medzhitov, 1999; Tauszig *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2001; Underhill a Ozinsky, 2002). Tato dráha je spuštěna po rozeznání infekce vyvolané  $G^+$  bakteriemi (Obr. 5). Následně jsou aktivovány dva transkripční faktory NF- $\kappa$ B – Dorsal a Dif a aktivována exprese genů kódujících AMP (Lemaitre *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999). Toll dráha u včel je aktivována rodinou receptorů rozpoznávajících patogeny, které vážou tzv. PAMPs (molekulární struktury typické pro povrch patogenů, z angl. pathogen-associated molecular patterns) bakterií a hub. Po navázání ligandu na receptor je spuštěna serinproteasová kaskáda, která vede ke štěpení a aktivaci proteinu Spaetzle, který se váže na membránově vázaný Toll receptor. Následuje dimerizace Toll, degradace NF- $\kappa$ B inhibitorů a uvolnění transkripčních faktorů Dorsal-1A a Dorsal-1B. Jejich translokace do jádra vede ke zvýšené expresi AMP (Evans *et al.*, 2006; McMenamin *et al.*, 2018).

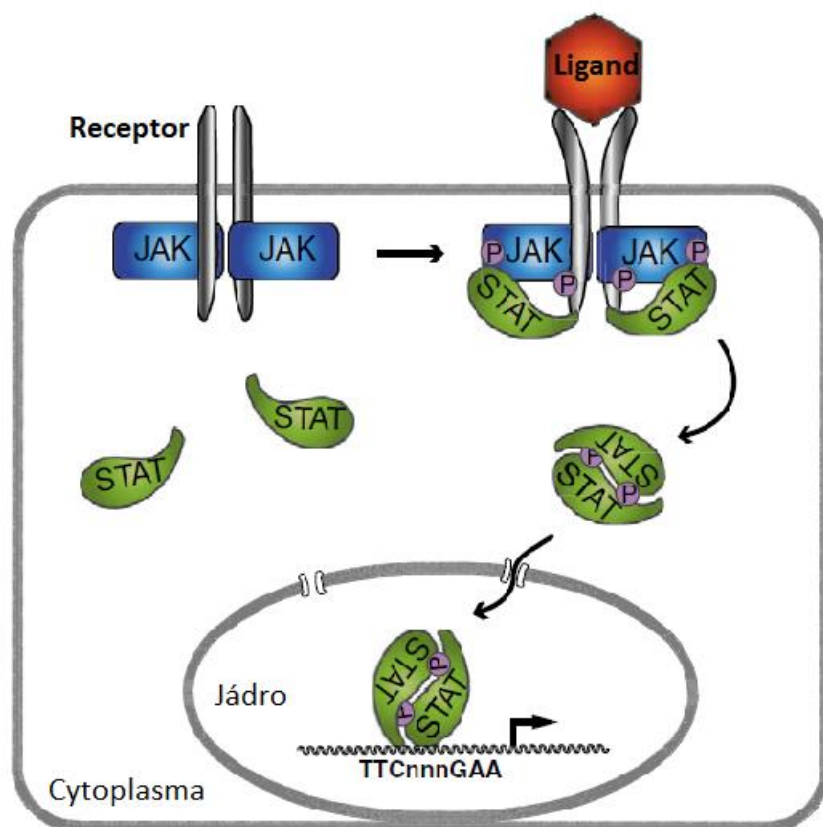
Další signální drahou u octomilky je Imd dráha, která je aktivována při odpovědi na infekci vyvolanou  $G^-$  bakteriemi, a to pravděpodobně prostřednictvím proteinů rozpoznávajících peptidoglykany (PGRP; Choe *et al.*, 2002; Ramet *et al.*, 2002; Obr. 5). Imd signalizace je dále sprostředkována prostřednictvím nejrůznějších kinas. Nakonec dochází k proteolytické aktivaci jednoho z rodiny transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B – Relish, který spouští následnou tvorbu AMP – diptericinu (Stoven *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). Mutanti, u kterých chybí Relish, jsou vysoce citliví na infekci vyvolanou  $G^-$  bakteriemi (Hedengren *et al.*, 1999). Imd dráha u včel je také aktivována navázáním peptidoglykanu

G<sup>-</sup> bakterií obsahujícího diaminopimelovou kyselinu k PGRP. Následuje aktivace Imd proteinu, fosforylace Relish IκB kinasou a štěpení Relish kaspasou Dredd. Relish se dále podílí na transkripční regulaci exprese AMP a dalších genů zahrnutých v antimikrobiální obraně. U octomilky můžeme najít tři transkripční faktory NF-κB (Relish, Dif, Dorsal) aktivující expresi AMP (Lemaitre a Hoffmann, 2007; McMenamin *et al.*, 2018). U včel se nachází pouze dva faktory – Relish a Dorsal, ale Dorsal se vyskytuje ve dvou homologních formách jako Dorsal-1 a Dorsal-2. Dorsal-1 má pak dvě isoformy Dorsal-1A a Dorsal-1B (Lourenco *et al.*, 2018).



Obr. 5 Schéma signálních drah Toll a Imd. Signální dráha Toll je aktivována rozpoznáním infekcí vyvolaných G<sup>+</sup> bakteriemi nebo houbami Toll receptorem. Dochází k fosforylaci inhibitoru Cactus a k jeho degradaci. Tím dojde k uvolnění transkripčních faktorů Dorsal a Dif, které vstupují do jádra a dochází ke zvýšené expresi genů AMP. Signální dráha Imd je aktivována G<sup>-</sup> bakteriemi. Následuje aktivace Imd proteinu, fosforylace Relish IκB kinasou a štěpení Relish kaspasou Dredd. Fragment proteinu Relish poté vstupuje do jádra, kde se podílí na regulaci exprese genů AMP (převzato a upraveno podle Beinke a Ley, 2004).

Signální dráha JAK-STAT byla zkoumána v rámci imunitní odpovědi u octomilky, a to jak její role v procesu tvorby hemolymfy, tak v procesu odpovědi na virální infekce (Morin-Poulard *et al.*, 2013; Obr. 6). JAK/STAT dráha u včel zahrnuje transmembránový receptor Domeless, JAK kinasu Hopscotch, transkripční faktor STAT92E a 2 negativní regulátory SOCS a PIAS. I přes absenci ligandů Upd, Upd2 a Upd3, které byly nalezeny u octomilky, přítomnost receptoru a dalších komponent signální dráhy JAK/STAT značí, že tato signální dráha hraje důležitou roli v rámci aktivace včelího imunitního systému. Vazbou doposud neidentifikovaného ligandu k Domeless receptoru dojde k aktivaci JAK/STAT signalizace. Následně dochází k transfosforylaci Hopscotch JAK kinasy, což vede k fosforylaci a dimerizaci STAT92E a jeho následné aktivaci. Tato aktivace způsobuje transkripční regulaci antimikrobiálních efektorů a také inhibitoru JAK/STAT dráhy (Boutros *et al.*, 2002; Brutscher *et al.*, 2015; McMenamain *et al.*, 2018).



Obr. 6 Schéma signální dráhy JAK/STAT u octomilky. Vazbou ligandu (Upd) k receptoru (Domeless) dojde k fosforylaci receptoru a JAK kinas (Hopscotch). Takto jsou vytvořena vazebná místa pro cytosolické transkripční faktory STAT92E. Následuje fosforylace a dimerizace STAT92E, které poté vstupují do jádra, kde aktivují transkripci cílových genů (převzato a upraveno podle Arbouzova a Ziedler, 2006).

Signalizace prostřednictvím JNK je u savců i u hmyzu spojena s řadou buněčných dějů. Souvisí například s pohybem organel nebo pohyby v rámci buněčného dělení, apoptózou, odpovědí na stres či imunitní odpovědí. Jedná se o vysoce konzervovanou dráhu, která řídí remodelaci cytoskeletu a transkripční regulaci v odpovědi na širokou řadu signálů (Dong *et al.*, 2002). Aktivita JNK může být vyvolána infekcí, působením lipopolysacharidů nebo prozánětlivých cytokinů, jako je tumor nekrotizující faktor (Moreno *et al.*, 2002). V několika studiích bylo zmíněno, že kinasa TAK1 *Drosophily* (dTAK1) může působit jako JNK kinasa kinasa (Igaki *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002). Delaney *et al.*, (2006) ve své studii získali několik důkazů, že dTAK1 působí během vrozené imunitní odpovědi prostřednictvím JNK kaskády. Například exprese fosfatasy Puckered, která vykazuje inhibiční vliv na aktivitu JNK kinasy, potlačila expresi genů AMP. Tato studie tedy ukazuje, že dTAK1 je součástí signální dráhy JNK během imunitní odpovědi octomilky. Dále autoři u octomilky navrhli model, který ukazuje signální dráhy JNK a NF- $\kappa$ B jako potřebné k aktivaci exprese genů AMP v tukovém tělisku. Bylo zjištěno, že dTAK1 je také zahrnuta v aktivaci genů AMP zprostředkované proteiny NF- $\kappa$ B/Relish, kdy dTAK1 není potřeba pro aktivaci Relish, ale je důležitá během JNK signalizace pro expresi AMP (Delaney *et al.*, 2006).

Mechanismy, kterými PAMPs indukují expresi genů AMP, byly zkoumány u octomilky. Rozpoznání patogenů aktivuje intracelulární signální dráhy přes transmembránové receptory na povrchu buněčné membrány hemocytu nebo tukového tělesa. Exprese genů AMP je poté indukována vazbou transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B (Khush *et al.*, 2001). U zástupce řádu motýlů *Hyalophola cecropia* je exprese genu AMP attacinu indukována působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dojde k aktivaci faktoru imunitní odpovědi, který se váže na regulační proteiny nadřazené transkripčním faktorům pro expresi attacinu (Sun a Faye, 1995).

### **2.2.2.1 Funkce NO v signálních drahách imunity hmyzu**

NO je důležitou signální molekulou imunitního systému u různých organismů. Podílí se na aktivaci humorální i buněčné imunity, v jejichž rámci reguluje imunitní odpověď, ovlivňuje náchylnost k patogenům, bakteriím a omezuje šíření parazitů. NO v rámci imunitního systému hmyzu funguje jako signální i cytotoxická molekula. Po vystavení patogenům dochází ke zvýšení hladiny NO díky vyšší aktivitě NOS (Negri *et al.*, 2013; Sadekuzzaman a Kim, 2018).

Sadekuzzaman *et al.*, 2017 se zabývali vzájemným působením mezi NO a eikosanoidovou signalizací u modelového organismu blýskavky červivcové (*Spodoptera exigua*). Zjistili až osmkrát vyšší koncentraci NO v tukovém tělesu, hemocytech a hemolymfě jako odpověď na přítomnost bakterií. Zvýšená koncentrace NO během bakteriální infekce vedla k nodulaci hemocytů, která byla potlačena inhibitorem NOS L-NAME. Snížení exprese genu NOS *S. exigua* RNA interferencí snížilo koncentraci NO a také vedlo k významnému poklesu nodulace a výraznému snížení aktivity fosfolipasy A2 v hemocytech a tukové tkáni v porovnání s kontrolou. Příklad L-NAME inhiboval aktivitu fosfolipasy, zatímco přídavek NO donoru, S-nitroso-N-acetyl-penicilaminu, aktivitu zvýšil. Na druhou stranu eikosanoidy neovlivnily koncentraci NO u larev, u kterých byla vyvolána imunitní odpověď. V závěru studie autoři konstatovali, že signální dráhy NO a eikosanoidů se propojují tak, že při zvýšených koncentracích NO dochází k aktivaci fosfolipasy A2 a následné biosyntéze eikosanoidů, která následně zprostředkovává různé imunitní odpovědi. Závěrem tedy bylo, že NO zprostředkovává odpověď v rámci buněčné imunity u blýskavky a pravděpodobně také u jiných druhů hmyzu.

Foley a O'Farrell (2002) prokázali, že NO hraje důležitou roli v rámci signální dráhy Imd aktivující Relish. Inhibice NOS zvýšila náchylnost k infekci vyvolané  $G^-$  bakterií a také utlumila tvorbu AMP diptericinu u larev i dospělců octomilky. Bylo potvrzeno, že aktivita NOS je důležitá pro adekvátní vrozenou imunitní odpověď. Při infekci dochází ke zvýšení exprese NOS a samotný NO je dostačující ke spuštění imunitní odpovědi a aktivaci tvorby AMP i v nepřítomnosti infekce. Předpokládali, že NO jakožto signální molekula vrozené imunity působí v počátečních stádiích infekce ve složité kaskádě kroků, během kterých tkáně účastníci se imunitní odpovědi rozpoznávají  $G^-$  bakterie.

Exprese genu AMP cecropinu B je v tukovém tělesu larvy *B. mori* indukována NO donory. Jakmile jsou PAMPs jako například lipopolysacharidy rozpoznány v hemolymfě, je v buňkách tukového tělesa indukována exprese genu *BmNOS* a další proteiny imunitního systému. NO produkovaný *BmNOS* je dále difusí přenášen do ostatních buněk tukového tělesa, kde aktivuje geny AMP (Imamura *et al.*, 2002).

### 2.3 Regulace S-nitrosace proteinů

GSNO je S-nitrosovaný derivát nejhodněji zastoupeného buněčného thiolu – glutathionu (GSH). GSNO je považován za zásobárnu NO a je také důležitou součástí NO-dependentní signalizace. Za aerobních podmínek je GSNO tvořen z GSH působením nitrosačních účinků RNS. Kinetické studie ukázaly, že nitrosace je obecně limitována reakcí třetího řádu mezi NO a kyslíkem a závisí na koncentraci NO (Benhar *et al.*, 2009).

Denitrosylace či denitrosace neboli odstranění NO skupiny primárně z Cys thiolu v postranním řetězci proteinů je důležitou součástí NO signalizace. Dříve se předpokládalo, že tento proces probíhá spontánně a není regulován. Později bylo zjištěno, že je katalyzován enzymy a podléhá regulaci (Benhar *et al.*, 2009). Objasnění molekulárních mechanismů denitrosylace je velmi důležité k pochopení, jak S-nitrosylace proteinů reguluje dráhy buněčné signalizace a také schopnost buněk vypořádat se s nitrosačním stresem. Regulovaná denitrosylace může ovlivnit buněčnou signalizaci aktivací enzymů, jako je tomu v případě caspasy 3, eNOS nebo Ikb kinasy- $\beta$ . Dále může ovlivnit protein-proteinové interakce, například u  $\beta$ -arrestinu, proteinu regulujícího přenos signálu u receptorů spojených s G-proteiny. Za podmínek nitrosačního stresu mohou denitrosylační mechanismy chránit buněčné funkce a funkce proteinů (Forrester, 2009).

Proteinové i nízkomolekulární RSNO, vznikající v signálních drahách NO, podléhají degradaci několika způsoby. Mezi neenzymové způsoby řadíme homolytický rozklad S-N vazby, fotolytické štěpení S-N vazby nebo degradaci zprostředkovanou ionty přechodných kovů (např.  $\text{Cu}^+$ ). Alternativní, dobře prostudovaný mechanismus rozkladu RSNO zahrnuje jejich reakci s ostatními thiolu. Proteinové RSNO nebo GSNO mohou předat nitroso skupinu dalšímu thiolu, tato reakce je označována jako transnitrosace (Broniowska *et al.*, 2013).

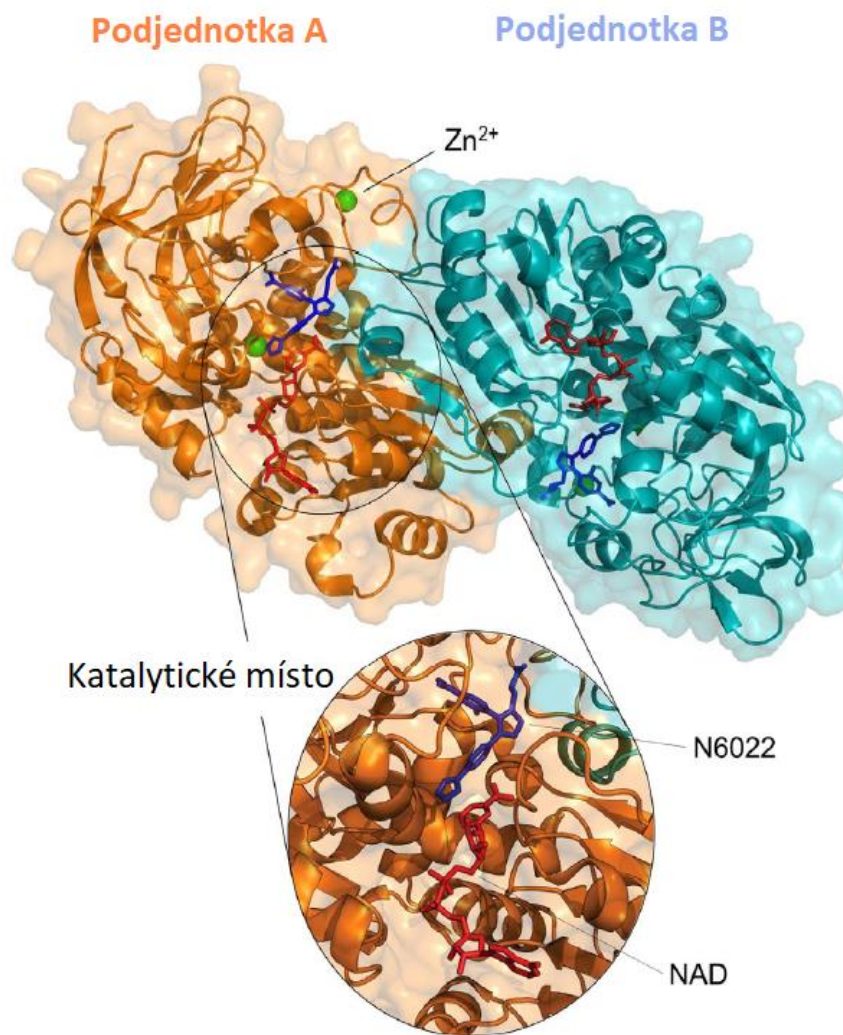
Bylo popsáno několik enzymů, které zprostředkovávají denitrosylaci, z nichž nejvýznamnější jsou dva enzymové systémy: S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) a thioredoxinový systém – thioredoxin (Trx), thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.8.1.9). Tyto oba vysoce konzervované systémy regulují denitrosaci, ovlivňují tak buněčnou signalizaci, odpovědi na stres a také interakce mezi hostitelem a patogenem (Benhar *et al.*, 2009).

### 2.3.1 S-nitrosogluthationreduktasa

GSNOR se řadí do rodiny Zn-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III. Jedná se o vysoce konzervovaný enzym, jehož přítomnost byla prokázána u všech říší (Martinez *et al.* 1996). Ve starší literatuře byla GSNOR označována jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1) díky schopnosti tohoto enzymu katalyzovat glutathion-dependentní oxidaci formaldehydu. Později však byl objasněn přesný mechanismus reakce, který zahrnuje oxidaci hydroxylové skupiny aduktu glutathionu a formaldehydu, S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS) za vzniku S-formylglutathionu s využitím  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu. Tento enzym byl tedy později pojmenován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa, se systematickým názvem S-(hydroxymethyl)glutathion: $\text{NAD}^+$  oxidoreduktasa (Staab *et al.*, 2008a, Kubienová *et al.*, 2013a).

GSNOR vykazuje vysokou substrátovou specifitu vůči GSNO, který je relativně stabilním produktem metabolismu NO a RNS (Liu *et al.*, 2001). Odbouráváním GSNO se tak GSNOR nepřímo podílí na kontrole transnitrosační rovnováhy mezi nízkomolekulárním GSNO a proteinovými RSNO. Tento enzym tak hraje zásadní roli v homeostáze intracelulárních hladin NO a RSNO a v celkovém metabolismu RNS (Feechan *et al.*, 2005). GSNOR je důležitou součástí regulace S-nitrosace jako součásti konzervovaných signálních drah u rostlin i živočichů. U rostlin hraje roli v rámci vývojových procesů, podílí se na kontrole rezistence vůči chorobám, regulaci buněčné smrti a ochraně buněk před nitrosačním stresem (Liu *et al.*, 2001; Kubienová *et al.*, 2014).

Jedná se o dimerní enzym složený ze dvou 40 kDa podjednotek (Obr. 7). Každý z těchto monomerů se skládá z velké katalytické domény, menší domény vázající koenzym a obsahuje dva atomy zinku. Jeden z atomů zinku působí jako Lewisova kyselina a účastní se tak katalýzy, druhý slouží pouze jako strukturální prvek. U lidské GSNOR jako ADH třídy III, i ostatních členů savčí alkoholdehydrogenasové rodiny je atom zinku v aktivním místě vázán Cys 177, Cys 47 a His 69. Vazebné místo pro substrát se nachází na každé podjednotce ve štěrbině mezi katalytickou doménou a doménou vázající koenzym. Oba monomery GSNOR jsou spojeny dvanáctivláknovým pseudokontinuálním  $\beta$ -skládaným listem (Kubienová *et al.*, 2013b).



Obr. 7 Struktura GSNOR. GSNOR je homodimer složený ze dvou identických podjednotek (A a B), z nichž každá obsahuje dva ionty  $Zn^{2+}$ . V katalytickém místě je substrát GSNO vázán do blízkosti molekuly NADH. V této krystalové struktuře pyrrolový derivát N6022 nahrazuje GSNO. Jedná se o specifický a plně reverzibilní inhibitor GSNOR, který se do vazebného místa pro GSNO váže jako kompetitivní inhibitor (převzato a upraveno podle Rizza a Filomeni, 2017).

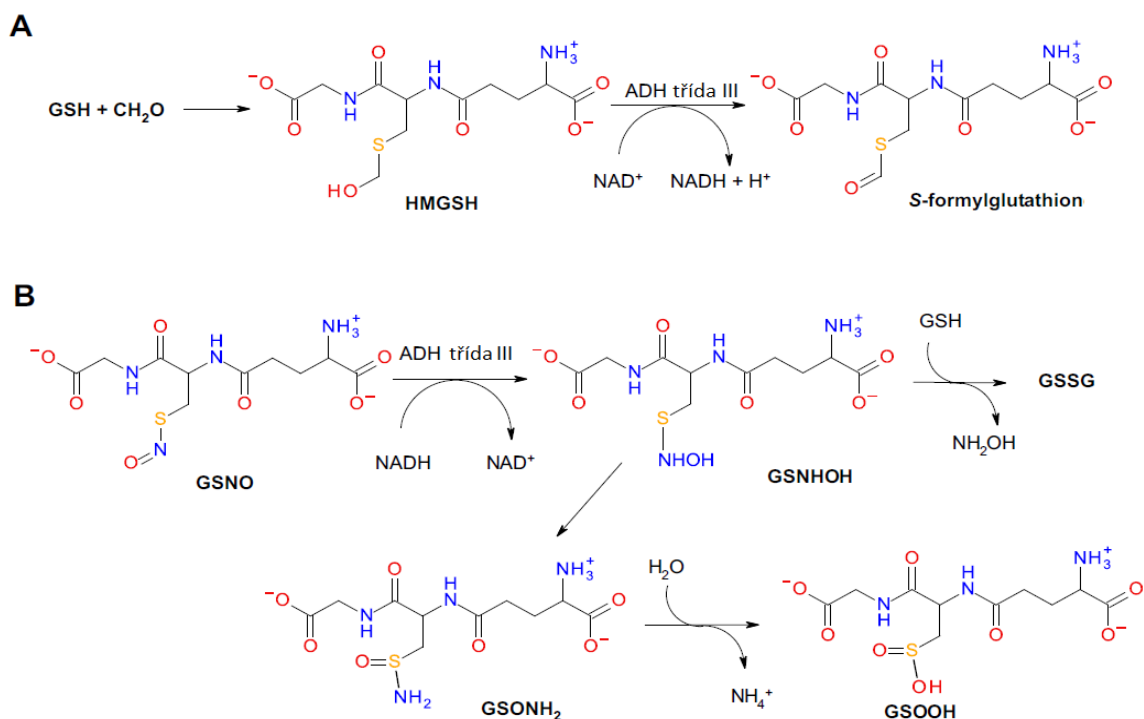


GSNOR je lokalizován převážně v cytosolu, avšak jeho výskyt byl potvrzen také v jádře a peroxisomech. Přítomnost enzymu v jádře naznačuje, že by mohl regulovat hladiny jaderného GSNO a podílet se na ochraně genetického materiálu před poškozením indukovaným vysokými hladinami NO (Reumann *et al.*, 2007). U lidí je enzym kódován genem *ADH5*. Na rozdíl od ostatních enzymů z ADH rodiny, jejichž exprese je většinou tkánově specifická, je GSNOR exprimován ve všech tkáních, především v játrech, mozku a ledvinách (Höög a Ostberg, 2011). Jedná se také o jediný ADH isoenzym přítomný v mozku, placentě a varlatech (Estonius *et al.*, 1996).

GSNOR přednostně katalyzuje redukci GSNO, vůči které GSH a HMGSH působí jako nekompetitivní inhibitory. GSNOR katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO na různé produkty v závislosti na podmínkách v buňce, včetně glutathiondisulfidu (GSSG), glutathionsulfinamidu (GSNOH<sub>2</sub>) a hydroxylaminu (NH<sub>2</sub>OH; Obr. 8 a 9). V dehydrogenační reakci oxiduje tento enzym HMGSH a ostatní alkoholy jako cinnamylalkohol, farnesol a geraniol nebo  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny s využitím NAD<sup>+</sup>. Neobvyklá substrátová specifita a kinetické vlastnosti enzymu jsou v kontrastu s ethanol-oxidujícími enzymy ze třídy ADH I. Enzymy třídy ADH III vykazují slabou katalytickou aktivitu s alifatickými alkoholy s krátkým řetězcem, jako jsou ethanol či propanol. Bylo prokázáno, že úlohou enzymu v buňce je převážně kontrola hladiny GSNO, nikoliv odstranění formaldehydu (Kubienová *et al.*, 2013b).

Dostupnost koenzymu NADH při redukci GSNO je důležitým faktorem regulace aktivity GSNOR. Poměr volné oxidované a redukované formy NAD<sup>+</sup>/NADH je v cytoplazmě za fyziologických podmínek vysoký, což není pro redukční procesy příznivé. Poměr NADP<sup>+</sup>/NADPH je v cytoplazmě mnohem nižší, což umožňuje využití NADPH v biosyntetických redukčních drahách. Jelikož GSNOR nemůže využít pro redukci GSNO koenzym NADPH, je redukce GSNO ovlivněna dostupností NADH. Zvyšující se hladiny NADH v buňce pak spouští redukci GSNO. Samotný enzym se podílí na produkci NADH dehydrogenasovou aktivitou při odbourávání formaldehydu, kdy nejdříve vzniká HMGSH, který je následně oxidován za vzniku S-formylglutathionu (Obr. 5; Staab *et al.*, 2008b; Jahnová *et al.*, 2019). Tichá *et al.*, 2017 potvrdili u GSNOR z rostlin *Lactuca sativa* a *Brassica oleracea* rozdíly mezi disociačními konstantami pro NADH a NAD<sup>+</sup> i přes to, že hodnoty K<sub>M</sub> jsou u těchto dvou ligandů podobné. Tyto výsledky se shodují s dřívějšími daty získanými u lidské GSNOR a GSNOR u *Arabidopsis* (Crotty, 2009). Termodynamická data získaná analýzou purifikovaných

proteinů pomocí izotermální mikrokcalorimetrie jsou v souladu s hypotézou, že ireverzibilní redukce GSNO zprostředkovaná GSNOR v cytoplazmě s vysokým poměrem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  je umožněna vyšší afinitou enzymu k  $\text{NADH}$  a také pevnější vazbou tohoto koenzymu.



Obr. 8 Reakce katalyzované GSNOR. (A) Dehydrogenasová reakce – oxidace HMGSH na S-formylglutathion s využitím  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu. (B) Reduktasová reakce – redukce GSNO s využitím  $\text{NADH}$  jako koenzymu na nestabilní meziprodukt N-hydroxysulfinamid (GSNHOH), který je náchylný k nukleofilnímu ataku GSH, což vede k uvolnění  $\text{NH}_2\text{OH}$  a GSSG. Z GSNHOH může spontánně vznikat  $\text{GSONH}_2$ , který za acidických podmínek může hydrolyzovat na glutahionsulfínovou kyselinu (GSOOH) a  $\text{NH}_3$  (převzato a upraveno podle Kubienová *et al.*, 2013b).

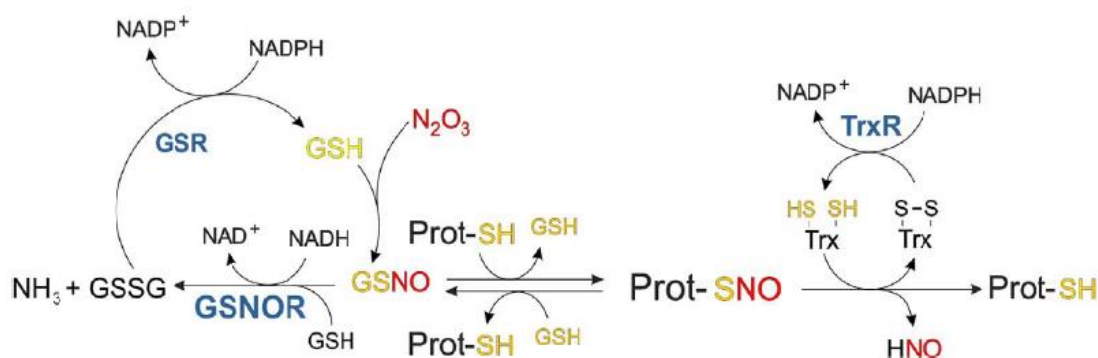
### 2.3.2 Thioredoxinový systém

Thioredoxinový systém se skládá celkem ze tří částí – thioredoxinů (Trx), thioredoxinreduktasy (TrxR, EC 1.8.1.9) a NADPH. Tento disulfidreduktasový systém je přítomný ve všech známých organismech. Má důležitou funkci při kontrole a udržování redoxní homeostázy a také při ochraně buňky před oxidačním stresem (Sengupta a Holmgren, 2012). Trx jsou proteiny o velikosti 12 kDa, které obsahují celkem pět cysteinů: katalytické Cys 32 a Cys 35 v aktivním místě enzymu a Cys 62, Cys 69 a Cys 73, které se nachází mimo aktivní místo enzymu (Mitchell a Marleta, 2005). U člověka byly popsány dvě izoformy Trx, lišící se lokalizací v buňce. Isoforma Trx1 se nachází v cytosolu a jádře, isoforma Trx2 je pak přítomná v mitochondriích. V těchto buněčných oddílech jsou zodpovědné za redukci proteinových disulfidů prostřednictvím cysteinových dithiolů nacházejících se v blízkém okolí aktivního místa. Redukovaný Trx (Trx-(SH)<sub>2</sub>) přímo reaguje s proteinovými disulfidy mechanismem výměny thiolů za vzniku redukovaného dithiolu a oxidovaného Trx (Trx-S<sub>2</sub>). Oxidovaný Trx-S<sub>2</sub> je následně zpětně redukován NADPH v reakci katalyzované TrxR a redoxní cyklus je takto dokončen (Broniowska *et al.*, 2013; Obr. 9).

Ačkoliv byl Trx dlouho považován za cíl S-nitrosace, s postupem času bylo zjištěno, že Trx hrají také důležitou roli při redukci nízkomolekulárních i proteinových RSNO v denitrosačních i transnitrosačních reakcích (Mitchell a Marletta, 2005). Při denitrosaci redukovaný Trx reaguje přímo s RSNO, zatímco při transnitrosací reakci thiolová skupina Cys 32, nacházející se v aktivním místě Trx, podléhá S-nitrosaci za uvolnění nízkomolekulárního či proteinového thiolu. Následně dochází k uvolnění nitroxylové skupiny za vzniku oxidovaného Trx, který je následně redukován (Jedelská *et al.*, 2020). U rostlinných Trx je mechanismus denitrosace proteinových RSNO zřejmě jiný než u savců. V tomto případě nedochází k tvorbě smíšeného disulfidového meziprojektu, ale k transnitrosacímu přenosu NO skupiny z proteinového substrátu do aktivního místa enzymu, jako bylo pozorováno u Trxh5 *Arabidopsis* (Kneeshaw *et al.*, 2014). Prozatím byla denitrosací funkce Trx-TrxR u rostlin studována v rámci vývoje kořene (Correa-Aragunde *et al.*, 2013), regulace translace proteinů, které jsou součástí světlosběrných komplexů (Berger *et al.*, 2016) a imunity rostlin (Tada *et al.*, 2008; Jedelská *et al.*, 2020).

Na základě několika studií byla navržena hypotéza, že Trx systém je primární regulátor S-nitrosoproteinů ve většině tkání, jelikož je exprimován v mnohem vyšší míře než GSNOR a další reduktasové systémy. Tato hypotéza je také podpořena faktem, že téměř

všechny malé S-nitrosované proteiny (23-30 kDa) v HepG2 buňkách (buňky jaterního karcinomu) jsou denitrosovány thioredoxinovým systémem (Sengupta *et al.*, 2007). Trx proteinům je přisuzována řada funkcí včetně tlumení aktivity transkripčních faktorů. Během imunitní odpovědi u rostlin Trx systém rozkládá proteinové RSNO. Je také schopný rozlišit různé substráty proteinových RSNO a podílí se tak na vzniku rezistence vůči chorobám (Kneeshaw *et al.*, 2014). Trx1, jakožto důležitý antioxidační protein, byl charakterizován jako antiapoptický protein díky jeho schopnosti potlačovat aktivitu proapoptických proteinů (Fu *et al.*, 2009). Mezi tyto proteiny patří například kinasa 1 regulující apoptózu, jejíž aktivita je potlačena redukcí disulfidů působením Trx nebo kaspasa 3, která je inhibována transnitrosací Cys 163 s využitím Trx nitrosylovaného na Cys 73 jako donoru nitrososkupiny (Mitchell a Marleta, 2005). Trx1 může kaspasu 3 v místě Cys 163 také denitrosovat, což má opačný účinek vedoucí k její aktivaci (Benhar *et al.*, 2008).



Obr. 9 Srovnání denitrosace katalyzované GSNOR- a Trx/TrxR. Proteinové S-nitrosothioly (Prot-SNO) jsou v rámci transnitrosylace v rovnováze s GSNO, substrátem pro GSNOR. Redukcí GSNO na GSSG a  $\text{NH}_3$  posouvá GSNOR rovnováhu ve prospěch přenosu nitrososkupiny z proteinů na GSH a nepřímou tak podporuje denitrosaci Prot-SNO. GSSG je dále redukován zpět na GSH působením NADPH-dependentní glutathionreduktasy (GR). Redukovaný Trx [Trx(SH)<sub>2</sub>] zprostředkovává přímou denitrosaci cílových proteinů (Prot-SNO) za uvolnění NO v podobě nitroxylu. TrxR redukuje oxidovanou formu Trx (Trx-S<sub>2</sub>) s využitím NADPH. (převzato z Rizza a Filomeni, 2017).

### 2.3.2.1 Thioredoxinový systém u hmyzu

V rámci regulace redoxní rovnováhy a metabolismu GSH je oxidovaná forma GSSG recyklována na formu redukovanou NADPH-dependentním flavoenzymem glutathionreduktasou (GR, EC 1.8.1.7; Arscott *et al.*, 1997). GR se nachází u mnoha eukaryotních i prokaryotních organismů, ale chybí u zástupců dvoukřídlého hmyzu jako je octomilka obecná nebo komár rodu *Anopheles* (*Anopheles gambiae*). Redoxní metabolismus těchto, a i dalších druhů hmyzu se tudíž výrazně liší od ostatních forem života (Kanzok *et al.*, 2001). Jelikož GSH je u octomilky klíčovou složkou redoxní homeostázy uvnitř buňky, vysoké hladiny GSH musí být udržovány alternativní dráhou, kterou je thioredoxinový systém. TrxR je svou strukturou i mechanismem účinku příbuzný s GR. Hlavní rozdíl mezi těmito enzymy je dodatečné redoxní centrum na C-konci TrxR s vysokou molekulovou hmotností (Williams *et al.*, 2000). Byly identifikovány dvě formy TrxR: TrxR s nízkou Mr (monomer o velikosti přibližně 35 kDa) a TrxR s vysokou Mr (monomer o velikosti 55 kDa; Williams *et al.*, 2000). Nízkomolekulární TrxR se nachází u prokaryot, rostlin a nižších eukaryot, zatímco druhá TrxR byla nalezena u vyšších eukaryot. Obě formy enzymu jsou homodimerní flavoenzymy. Aktivní místo menší TrxR obsahuje vazebná místa pro NADPH, FAD a jeden disulfid účastnící se redoxní reakce (Luthman a Holmgren, 1982; Huang *et al.*, 2008). Vysokomolekulární TrxR mají navíc další disulfid nebo selenylsulfid vytvořený z párů Cys-Cys nebo Cys-Sec v sousední podjednotce (Zhong a Holmgren, 2002). Bylo také prokázáno, že obě formy enzymu mají jiný katalytický mechanismus. U TrxR s nižší Mr je na rozdíl od druhé formy vyžadována velká konformační změna (Lennon *et al.*, 2000).

TrxR popsané u *Drosophily*, DmTrxR-1 a DmTrxR-2, jsou prototypy třetí třídy vysokomolekulárních TrxR, mají dva sousední C-koncové cysteinové zbytky, které jsou nezbytné pro redukci Trx. DmTrxR-1 se skládá z 491 aminokyselin a má vysokou podobnost s lidskou TrxR (56 %) nebo s lidskou GR (33 %; Kanzok *et al.*, 2001). Každý z monomerů homodimerní TrxR se skládá ze tří domén: vazebné domény pro flavin, vazebné domény pro pyridinnukleotid a domény, která zprostředkovává propojení mezi dvěma monomery. Aktivní místo vysokomolekulární DmTrxR obsahuje tři redoxní centra: FAD, s flavinem sousedící N-koncový disulfid Cys 57-Cys 62 z téže podjednotky a C-koncový disulfid Cys 489'-Cys 490' pocházející z druhého polypeptidového řetězce (Eckenroth *et al.*, 2007). C-koncový polypeptidový řetězec obsahující Cys 489' a Cys

490' je flexibilní, předpokládá se, že zaujímá různé pozice. První pozici zaujímá vedle His 464' působícího jako acidobazický katalyzátor, k vytvoření disulfidové vazby mezi Cys 57 a Cys 490', a poté druhou pozici na povrchu proteinu, kde reaguje s Trx (Bauer *et al.*, 2003). TrxR u savců má v aktivním místě redoxní pár cystein-selenocystein (Sandalova *et al.*, 2001), zatímco u TrxR původce malárie *Plasmodium falciparum* je toto redoxní centrum tvořeno dvěma Cys oddělenými sekvencí čtyř dalších aminokyselin (Wang *et al.*, 1999). U *D. melanogaster* můžeme najít 11 Trx nebo Trx podobných proteinů, ale pouze čtyři z nich mají zcela konzervovanou sekvenci v aktivním místě o aminokyselinovém složení WCGPCK. U *D. melanogaster* byly popsány tři pravé Trx: deadhead, ThioredoxinT a Thioredoxin-2 (Svensson a Larsson, 2007). Prvním charakterizovaným Trx byl protein deadhead, který se nachází pouze u samic a účastní se procesu meiózy (Pellicena-Palle *et al.*, 1997). Naopak ThioredoxinT se nachází pouze u samců a je exprimován ve spermatocytech (Svensson *et al.*, 2003). Trx mají důležitou roli při syntéze DNA jako elektronové donory pro ribonukleotidreduktasy a jsou také zahrnuty v buněčné odpovědi na oxidační stres (Nishinaka *et al.*, 2001). Několik disulfidových vazeb účastnících se skládání proteinů nebo redoxní kontroly transkripce je efektivně a selektivně redukováno pomocí Trx (Arnér a Holmgren, 2000). Trx jsou také schopny dithioldisulfidové výměnné reakce s GSSG za vzniku GSH. Trx vykonávají antioxidační funkci jako elektronové donory thioredoxinperoxidasy (TrxP), ochranných enzymů, které redukují H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a organické peroxidy. Bauer *et al.*, (2002) se ve své studii zaměřili na DmTrx-2 a také příbuzný Trx *A. gambiae* (AgTrx-1). K bližšímu určení funkce DmTrx-2 studovali jeho reakci s DmTrxR-1 a také důležitou dithioldisulfidovou výměnu s GSSG a jeho roli v detoxifikaci peroxidu. Z toho důvodu exprimovali a charakterizovali rekombinantní TrxP z *D. melanogaster* (DmTrxP-1). Bylo zjištěno, že substrátem pro tento enzym byl pouze DmTrx-2, který je také hlavním Trx. Tyto výsledky naznačovaly rozdílné funkce v rámci buňky u Trx vyskytujících se u jednoho organismu. Bylo zjištěno, že AgTrx-1 je blízce spojen s DmTrx-2 a to jak svou strukturou, tak funkcí. Slouží jako substrát pro DmTrxR-1 i DmTrxP-1 a redukuje GSSG. Tento redoxní metabolismus založený na Trx a TrxR nabízí nový cíl, jak bojovat proti hmyzu a hmyzem vyvolaným nemocím jako je například malárie (Becker *et al.*, 2000). Původce malárie *P. falciparum* je obzvláště citlivý na oxidační stres. Nejenom u lidského hostitele, ale také u hmyzího přenašeče jsou oxidační sloučeniny jako peroxynitrit tvořeny při odpovědi na přítomnost parazita (Savvides *et al.*, 2002). TrxR inhibitory by tedy mohly být použity jako ochrana proti hmyzím parazitům a také jako insekticidy. To je podpořeno

faktem, že mezi TrxR u parazitů, hmyzu a savců jsou obrovské strukturní i funkční rozdíly (Kanzok *et al.*, 2001). Jelikož pouze savčí enzymy obsahují selenocystein jakožto funkční skupinu, ideálně by pak takové inhibitory inaktivovaly TrxR pouze u parazitů a u hmyzu (Bauer *et al.*, 2002).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie

**AcrosOrganics, USA:** glutathion, octan hořečnatý

**AppliChem, Německo:** 4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluorid hydrochlorid (AEBSF)

**Bio-Rad, USA:** markery molekulových hmotností (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Xtra Standards)

**Cayman, USA:** 7-nitroindazol, aminoguanidin, S-ethylisothiomočovina

**Fluka, Česká republika:** 2,3-diaminonaftalen (DAN), EDTA

**Koch-Light Laboratories, Anglie:** norvalin

**Lachema, Česká republika:** bromfenolová modř, chlorid hořečnatý hexahydrát, síran zinečnatý heptahydrát

**Lachner, Česká republika:** 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), butan-1-ol, chlorid sodný, diethylether, dihydrogenfosforečnan draselný, dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, hydroxid sodný, kyselina octová, methanol

**Lihovar Kojetín, Česká republika:** ethanol

**Penta, Česká republika:** chlorid vápenatý, kyselina chlorovodíková

**Roth, Německo:** aceton, aprotinin, 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát p-toluidin (BCIP), dithiothreitol (DTT), tetramethylendiamin (TEMED), Tween-20

**Serva, Německo:** markery molekulových hmotností (SERVA Triple Color Protein Standard III), NADPH, persíran amonný (APS), polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A, SERVALight EOS Peroxide Solution Reagent B

**Sigma-Aldrich, Německo:** 4-chlor-1-naftol, akrylamid (AA), Anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase, Anti-rabbit IgG-peroxidase, BSA, D-arginin, dimethylformamid (DMF), dusitan sodný, FAD, FMN, glycin, HEPES (Kyselina [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová), hydrogenfosforečnan draselný, jodid sodný, jodoacetamid kalmodulin, kyselina fosforečná, L-arginin, L-NAME, merkaptoethanol, methylviologen, NADH, nitrotetrazolium blue chloride (NBT), N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin, N,N'-metylenbisakrylamid (BIS), polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), sušené mléko odtučněné, tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Tris, Triton X-100

**Thermo-Fisher, USA:** univerzální primární anti-NOS protilátka



## 3.2 Přístroje a vybavení

analytické váhy (Sartorius, Německo); analyzátor NO CLD 88 (Eco Physics, Švýcarsko); automatické pipety (Eppendorf, Německo); C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor, USA); centrifuga chlazená (Eppendorf, Německo); digitální předvážky (Kern, Německo); elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko); mikrodestičkový reader (Bio-Tek, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitroceluloseová membrána 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, USA); pH metr (XS Instruments, Itálie); polyvinylidendifluoridová membrána 0,2  $\mu\text{m}$  (PVDF; Bio-Rad, USA); termostat lážňový (Huber, Německo); Trans-Blot semi-dry Transfer Cell (Bio Rad, USA); třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva); vakuová vývěva (Edwards, ČR); vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko); zdroj pro elektroforézu PowerPac™ 300 (Bio-Rad, USA)

## 3.3 Biologický materiál

Vzorky zamražených dospělých včel (*Apis mellifera*) pocházely z včelnice Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. Včely pocházely z klinicky zdravých včelstev a byly odebrány v období jaro/léto 2018 a následně zamraženy.

Zamražené vzorky včelích hlav (H1-H12) pocházely ze včel odebraných v období července 2018 na pracovišti Honey Bee Breeding, Genetics and Physiology Laboratory (Agricultural Research Service, Baton Rouge, USA). Rámek s plodem byl zaklíčkován a vložen do inkubátoru (34,5 °C). Čerstvě vylíhnuté včely byly odebrány z rámku, zachlazeny na ledu (přibližně 2 min) a poté injektovány viry (počet virových částic  $10^5$ ; DWV – virus deformovaných křídel, CBPV – virus chronické paralýzy včel) nebo fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS – 0,1 mol.l<sup>-1</sup>). Včelám byla injektována dávka o objemu 1  $\mu\text{l}$ . Poté byly včely vloženy do klíček a umístěny do inkubátoru. Vzorky byly odebrány po 24 hod od aplikace injekce a ihned zamraženy. Kontrolní včely bez vpichu – tyto včely pocházejí ze stejných včelstev a mají stejné stáří (1 den). Byly zachlazeny na ledu bez žádného dalšího ošetření. Poté byly umístěny do klíček a do inkubátoru. Po 24 hod byly zamraženy.

Celkem byly tedy odebrány 4 různé typy vzorku – kontrola (H1-H3), včely infikované DWV (H4-H6), CBPV (H7-H9) a PBS (H10-H12).

Dále byly použity vzorky octomilek (genotyp *D. melanogaster* w<sup>1118</sup>). Octomilky byly kultivovány za standardních podmínek při laboratorní teplotě na agarovém médiu s bramborovou kaší. Vzorky 10-14denních dospělců octomilek byly odebrány do eterové pasti a zamraženy do dalšího použití.

Králičí polyklonální anti-GSNOR protilátka byla připravena na zakázku komerční firmou (Moravian Biotechnology, Brno, ČR). Nejdříve byla vytipována aminokyselinová sekvence pro přípravu imunizačního antigenu. Bylo provedeno srovnání sekvencí GSNOR *A. mellifera* a *D. melanogaster* – proteiny z databáze NCBI. Nalezeny tři potenciální imunogenní peptidové sekvence vykazující 100% shodu a po konzultaci s firmou byl vybrán peptid o aminokyselinové sekvenci IEVAPPKAHEVRIKI. Následně proběhla příprava antigenu – syntéza peptidu CIEVAPPKAHEVRIKI (sekvence z GSNOR s přidaným Cys), který byl navázán na antigenní nosič, keyhole limpet protein. Imunizace antigenem byla provedena celkem 3x a to u dvou králíků. Nakonec byla provedena afinitní purifikace finálního séra.

### 3.4 Experimentální metody

#### 3.4.1 Příprava vzorků pro stanovení aktivity GSNOR

Vzorky zamražených těl dospělých včel byly vždy nejprve rozděleny na jednotlivé tělní části – hlavu, hrud' a zadeček. U octomilek byla použita celá těla. Tyto vzorky byly homogenizovány v tekutém dusíku s extrakčním pufrém (50 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mmol.l<sup>-1</sup> DTT; 1 mmol.l<sup>-1</sup> AEBSF) v poměru 1 g biologického materiálu na 2 ml extrakčního pufru. Homogenizované extrakty byly za občasného vortexování ponechány 10-20 min na ledu. Poté proběhla centrifugace 20 min při 16 000 g a 4 °C. Jednotlivé supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkušavek. V takto získaných čerstvých extraktech byla nejdříve změřena celková koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové a případně upravena ředěním v extrakčním pufru na koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Vhodně ředěné extrakty byly následně přečištěny na kolonkách PD MiniTrap G-25. Kolonka byla vždy nejprve promyta (3 x 5 ml) ekvilibračním pufrém (20 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 8,0). Na kolonku bylo poté nanášeno 500 µl extraktu, po vsáknutí extraktu do matrice kolonky bylo nanášeno 1000 µl elučního pufru (20 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 8,0) a eluát byl jímán do mikrozkušavky (1. frakce). Poté byla znovu provedena eluce stejným způsobem (2. frakce). Na závěr byla kolonka promyta několikrát destilovanou vodou. V takto přečištěných extraktech byla opět změřena celková koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.

#### 3.4.2 Příprava vzorků pro stanovení aktivity NOS

Nejprve byl připraven zásobní pufr rozpouštěním 476 mg HEPES, 58 mg EDTA, 0,5 g PVPP a 10 g glycerolu v deionizované vodě a následně doplněn na objem 100 ml. Vždy těsně před extrakcí bylo k 10 ml zásobního pufru přidáno 4,8 mg AEBSF, 7,7 mg DTT a 10 µl zásobního roztoku aprotininu, který byl připraven rozpouštěním 1 mg aprotininu v 1 ml zásobního pufru. Výsledná koncentrace jednotlivých složek extrakčního pufru byla: 20 mmol.l<sup>-1</sup> HEPES, 2 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 0,5% PVPP, 10% glycerol, 5 mmol.l<sup>-1</sup> DTT, 2 mmol.l<sup>-1</sup> AEBSF a 0,153 mmol.l<sup>-1</sup> aprotinin. Vzorky zamražených dospělých včel byly vždy rozděleny na jednotlivé tělní části – hlavu, hrud' a zadeček. Tyto vzorky byly za stálého chlazení za přidavku mořského písku homogenizovány s extrakčním pufrém v poměru 1 g biologického materiálu na 2 ml extrakčního pufru. Homogenizované vzorky

byly poté centrifugovány 10 min při 16 000 g a 4 °C. Supernatanty byly poté převedeny do mikrozkuavek a zamraženy při teplotě -20 °C.

### **3.4.3 Příprava vzorků pro stanovení aktivity TrxR**

Zamražená těla dospělých včel byla vždy rozdělena na jednotlivé tělní části – hlavu, hrud' a zadeček. Vzorky byly za stálého chlazení homogenizovány s extrakčním pufrém (100 mmol.l<sup>-1</sup> KPi, pH 7,0; 10 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA) za přídavku mořského písku v poměru 1 g biologického materiálu na 2 ml extrakčního pufru. Homogenizované extrakty byly centrifugovány 10 min při 16 000 g a 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkuavek a zamraženy při teplotě -20 °C.

### **3.4.4 Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

Zamražená těla dospělých včel byla vždy rozdělena na jednotlivé tělní části – hlavu, hrud' a zadeček. U octomilek byla použita celá těla. Vzorky byly za stálého chlazení homogenizovány s extrakčním pufrém (Tris-HCl, pH 7,5) za přídavku mořského písku v poměru 1 g biologického materiálu na 2 ml extrakčního pufru. Homogenizované extrakty byly centrifugovány 10 min při 16 000 g a 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkuavek a zamraženy při teplotě -20 °C.

### **3.4.5 Příprava S-nitrosoglutathionu**

GSNO byl připraven reakcí redukovaného glutathionu s dusitany v kyselém prostředí podle Moore a Mani (2002). Navážka 614 mg GSH byla rozpuštěna v 3 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> HCl. Za stálého míchání v ledové lázni byla k roztoku GSH přidána navážka 138 mg NaNO<sub>2</sub>. Reakční směs byla poté ponechána 40 minut na ledové lázni za vzniku červené sraženiny, která byla následně odsáta na filtračním papíře na Büchnerově nálevce. Sraženina byla poté promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H<sub>2</sub>O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Takto odsátá a promytá sraženina byla z filtračního papíru přenesena na alobal a ponechána asi 30 minut sušit v exsikátoru. Vysušený produkt byl přenesen do několika mikrozkuavek a ihned zamražen při teplotě -20 °C.

### 3.4.6 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

Metoda je založena na interakci proteinů s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Při navázání barviva na protein dojde ke změně barvy roztoku z červeno-hnědé na modrou a dochází tak k posunu absorpčního maxima CBB z 465 nm na 610 nm (Bradford, 1976; Zor a Selinger, 1996). Měření bylo prováděno v 96-jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo nejdříve nanášeno 45  $\mu\text{l}$  deionizované vody, poté 5  $\mu\text{l}$  extraktu nebo standardu BSA, následně 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku činidla Bradfordové. Po jemném protřepání byla destička ponechána 5 min inkubovat při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při 450 nm a 595 nm. Jako standard byl použit BSA (hovězí sérový albumin) v rozmezí koncentrací 0–1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Zásobní roztok CBB byl připraven rozpuštěním 50 mg CBB v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Pracovní roztok činidla byl vždy připraven zředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou v poměru 1:4.

### 3.4.7 Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

Enzym GSNOR katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO na GSSG a  $\text{NH}_3$ . Princip reakce je založen na spotřebování NADH při redukcí substrátu GSNO, kdy dochází k poklesu absorbance při 340 nm. Aktivitu GSNOR lze určit jako množství při 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Barroso, 2006).

Měření bylo prováděno v 96-jamkových mikrodestičkách. Nejdříve bylo do každé jamky pipetováno 232  $\mu\text{l}$  reakčního pufru (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH = 8,0), poté 8  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného přečištěného extraktu a 30  $\mu\text{l}$  2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADH (navážka 1,418 mg rozpuštěna v 2 ml 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru, pH = 8,0). Reakce byla zahájena přidávkem 30  $\mu\text{l}$  4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO (navážka 1,345 mg GSNO rozpuštěna v 1 ml 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl). Roztoky NADH i GSNO byly vždy připraveny čerstvé těsně před měřením. V případě blanku byl GSNO nahrazen deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$ . Směs byla promíchána a poté byla sledována po dobu 6 min změna absorbance při 340 nm při 30 °C. Pro výpočet aktivity byl vyhodnocen úsek v intervalu 1-6 min od počátku měření.

### 3.4.8 Spektrofotometrické stanovení aktivity TrxR

Aktivita TrxR byla stanovena metodou podle Kanzok *et al.*, 2001, upraveno podle návodu ke komerčnímu kitu pro měření aktivity TrxR (Sigma-Aldrich CS0171). Tato metoda je založena na principu, kdy TrxR *in vitro* katalyzuje reakci:



Při této reakci dochází k redukci DTNB a současné oxidaci kofaktoru NADPH, vzniká žlutý produkt 5-thionitrobenzoová kyselina (TNB), který je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm (Holmgren a Björnstedt, 1995).

Měření probíhalo v 96-jamkových mikroleštičkách. Do každé jamky bylo nejdříve pipetováno 10  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol.l}^{-1}$  roztoku DTNB. Poté bylo pipetováno 200  $\mu\text{l}$  (v případě negativní kontroly), 230  $\mu\text{l}$  (v případě vzorku) a 280  $\mu\text{l}$  (v případě blanku) pracovního pufru 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  KPi, pH 7,0; 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  EDTA. Poté bylo v případě vzorku a negativní kontroly pipetováno 50  $\mu\text{l}$  extraktu, v případě blanku pouze 50  $\mu\text{l}$  pufru. V případě negativní kontroly bylo navíc ještě pipetováno 30  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol.l}^{-1}$  inhibitoru TrxR methylviologenu. Po tomto kroku byla směs v jamkách inkubována 5 min, pro efektivnější inhibici enzymu. Start reakce byl proveden přidávkem 10  $\mu\text{l}$  6  $\text{mmol.l}^{-1}$  NADPH (Tab. 1). Poté byla sledována změna absorbance při 412 nm během 10 min při 30 °C. Roztoky DNTB a inhibitoru methylviologenu uchovávány při -20 °C, roztok NADPH připraven vždy čerstvý těsně před měřením.

Tab. 1 Množství jednotlivých roztoků pipetovaných do jedné jamky 96-jamkové destičky pro stanovení aktivity TrxR (uvedeno v  $\mu\text{l}$ ).

	DTNB	Pufr	Extrakt	Inhibitor	Start-NADPH
<b>Blank</b>	10	280	0	0	10
<b>Vzorek</b>	10	230	50	0	10
<b>Kontrola</b>	10	200	50	30	10

### 3.4.9 Stanovení aktivity NOS pomocí NO analyzátoru

Metoda je založena na stanovení množství dusitanů vzniklých oxidací NO produkovaného z L-argininu v reakci katalyzované NOS. Reakční směs se všemi kofaktory NOS je po přidání vzorku inkubována při 37 °C po dobu 30 min a poté dojde k deproteinaci vzorku, zatímco pro kontrolní měření výchozí koncentrace dusitanů se provede deproteinace vzorku ihned. Nakonec se porovnáním množství  $\text{NO}_2^-$  v obou mikrozkušavkách zjistí množství  $\text{NO}_2^-$  vzniklé během 30min inkubace při enzymové reakci.

Nejprve byl připraven zásobní roztok obsahující 2,38 g HEPES a 21 mg octanu hořečnatého na 100 ml zásobního pufru. pH bylo upraveno NaOH na hodnotu 7,5. Dále byl připraven roztok chloridu vápenatého rozpuštěním 147 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  v 10 ml zásobního pufru. Oba tyto roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Dále byly připraveny následující roztoky: L-arginin a D-arginin 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 1,05 g na 100 ml zásobního pufru), L-norvalin 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 0,6 g na 100 ml zásobního pufru), FAD 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 4,2 mg na 500  $\mu\text{l}$  deionizované vody), FMN 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 2,4 mg na 500  $\mu\text{l}$  deionizované vody), kalmodulin 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 200  $\mu\text{g}$  na 1,2 ml zásobního pufru),  $\text{BH}_4$  8  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (navážka 2,5 mg na 1 ml zásobního pufru) s přídavkem 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT. Tyto roztoky byly zamrazeny po vhodných aliquotech při teplotě -20 °C. Těsně před měřením aktivity NOS byl připraven reakční pufr. K 10 ml zásobního pufru bylo po rozmražení a promíchání na vortexu přidáno: 100  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{l}$  L-argininu, 200  $\mu\text{l}$  L-norvalinu, 10  $\mu\text{l}$  FAD, 10  $\mu\text{l}$  FMN a 10  $\mu\text{l}$  kalmodulinu. Následně byl čerstvě připraven roztok 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADPH (navážka 0,55 mg na 1 ml zásobního pufru), ke kterému bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$   $\text{BH}_4$  v DTT.

Pro samotnou reakci bylo do 1,5 ml mikrozkušavky napipetováno nejdříve 120  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného reakčního pufru (HEPES,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Arg, Nor-Val, FAD, FMN, kalmodulin) a 30  $\mu\text{l}$  1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADPH obsahujícího 8  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{BH}_4$ . V rámci měření inhibice bylo do 1,5 mikrozkušavky napipetováno 108  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného reakčního roztoku, 30  $\mu\text{l}$  1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADPH obsahujícího 8  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{BH}_4$  a 12  $\mu\text{l}$  inhibitoru o koncentraci 25  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , obdobně také pro výsledné koncentrace inhibitorů 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jako inhibitory byly použity: L-NAME,  $\text{N}^{\text{o}}$ -nitro-L-arginin, aminoguanidin, 7-nitroindazol, S-ethylisothiomočovina.

K tomuto roztoku bylo poté přidáno 150  $\mu\text{l}$  extraktu a roztok byl promíchán. Následně bylo odebráno 150  $\mu\text{l}$  vzorku do druhé 1,5 ml mikrokumavky. Ke 150  $\mu\text{l}$  v první mikrokumavce bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,8 mol $\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a 100  $\mu\text{l}$  16% ZnSO<sub>4</sub>. První vzorek byl následně centrifugován při 16 000 g a laboratorní teplotě po dobu 10 min a po centrifugaci byl vzorek uchován při teplotě -20 °C. Zbýlých 150  $\mu\text{l}$  vzorku ve druhé mikrokumavce bylo inkubováno 30 min při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,8 mol $\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a 100  $\mu\text{l}$  16% ZnSO<sub>4</sub>. Vzorek byl následně intenzivně promíchán na vortexu a poté centrifugován při 16 000 g a laboratorní teplotě po dobu 10 min. Supernatanty byly poté převedeny do mikrokumavek a zamraženy při teplotě -20 °C.

Stanovení NO<sub>2</sub><sup>-</sup> probíhalo na chemiluminiscenčním NO analyzátoru CLD88 podle Laver *et al.*, 2008. Nejdříve byl připraven čerstvý zásobní roztok NaI rozpuštěním 150 mg NaI v 1,5 ml deionizované vody. Těsně před měřením bylo k 500  $\mu\text{m}$  zásobního roztoku NaI přidáno 4,5 ml ledové kyseliny octové. Takto vzniklý reakční roztok byl poté přenesen do reakční nádoby NO analyzátoru. Po zahájení měření bylo vždy do reakční nádoby napipetováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku obsahujícího NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Byla připravena kalibrační řada standardů NaNO<sub>2</sub> o koncentracích 1, 10, 100, 1000 a 10 000 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$  a to postupným ředěním počáteční koncentrace 10 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$  NaNO<sub>2</sub> v deionizované vodě.

#### **3.4.10 Stanovení aktivity NOS metodou s 2,3-diaminonafthalenem**

Metoda je založena na reakci dusitanů vzniklých oxidací vzniklého NO s 2,3-diaminonafthalenem (DAN) v kyselém prostředí. Reakcí vzniká stabilní, vysoce fluoreskující sloučenina 2,3-naftotriazol, jejíž intenzita a stabilita fluorescence je silně zvýšena v alkalickém prostředí (Misko *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 1996).

Byla připravena kalibrační řada standardů NaNO<sub>2</sub> v deionizované vodě o koncentracích 10, 50, 100, 500, 1000, 2500 a 5 000 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro tuto metodu byl použit stejný postup přípravy vzorků jako pro chemiluminiscenční stanovení aktivity NOS (kapitola 3.4.8), tj. inkubace reakční směsi 30 min při teplotě 37 °C následovaná deproteinizací. Reakce byla provedena v 1,5 ml mikrokumavkách.

Před měřením byl připraven čerstvý roztok DAN o koncentraci 1 mg DAN na 1 ml DMF. Takto připravený roztok byl poté 20x ředěn 0,6 mol $\cdot\text{l}^{-1}$  HCl na výslednou koncentraci 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . K 500  $\mu\text{l}$  standardu či vzorku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  acidického roztoku DAN a směs byla promíchána na vortexu. Následně proběhla inkubace 10 min



při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  roztoku NaOH o koncentraci 3  $\text{mol.l}^{-1}$  a směs byla opět promíchána. Samotné měření probíhalo v 96-jamkových mikrodestičkách pro měření fluorescence. Ihned po přidavku NaOH byla reakční směs rozpipetována do tří jamek (115  $\mu\text{l}$ /jamka). Měření fluorescence probíhalo při excitační vlnové délce 375 nm a emisní vlnové délce 415 nm.

### **3.4.11 Separace proteinů metodou SDS-PAGE**

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) se používá pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Separace proteinů byla provedena v 10% dělicím gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím gelu pH 6,8 (jednotlivé složky a jejich objemy v Tab. 2). Přídavkem vždy čerstvě připraveného roztoku persíranu amonného do kádinky s jednotlivými komponenty gelů byla zahájena polymerace gelu. Nejdříve byl mezi skla (cca 1 cm pod hřebínek) pomocí Pasteurovy pipety nanesen dělicí gel. Gel byl poté převrstven tenkou vrstvou n-butanolu. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn n-butanol a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou a vysušen pomocí filtračního papíru. Po zahájení polymerace zaostřovacího gelu byla směs přenesena pomocí pipety na ztuhlý dělicí gel. Do gelů byly opatrně vloženy hřebínky. Po ztuhnutí byla skla s připraveným gelem vložena do elektroforetické komůrky, do které bylo nalito dostatečné množství elektrodového pufru tak, aby přetekl do jamek gelu. Do jamek byly poté automatickou pipetou nanесeny vzorky (10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ ) nebo proteinové markery (2-3  $\mu\text{l}$ ). Zaostřování proteinů nejprve probíhalo při napětí 100 V a po doputování bromfenolové modři k rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 200 V. Po vymytí bromfenolové modři z gelu byla elektroforéza ukončena. Gely byly následně použity k blotování nebo barveny CBB R-250 a poté odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku.

#### Příprava vzorků pro SDS-PAGE:

K vhodně naředěnému vzorku byl přidán stejný objem 2x vzorkovacího pufru podle Laemmliho (0,125  $\text{mol.l}^{-1}$  Tris HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,2  $\text{mol.l}^{-1}$  DTT, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol; pH 6,8). Směs byla promíchána na vortexu a 5 min zahřívána na termobloku při 95 °C. Po ochlazení v ledové lázni byly vzorky centrifugovány 5 min při 15 000 g.

#### Redukce a alkylace vzorků pro SDS-PAGE:

Byly připraveny 3 různé varianty jednoho vzorku: vzorek 1 (redukováný vzorkovacím pufrem s  $\beta$ -merkapt ethanolom), vzorek 2 (redukováný vzorkovacím pufrem a redukováný DTT), vzorek 3 (redukováný vzorkovacím pufrem, DTT a alkylovaný jodoacetamidem). K vhodně ředěnému vzorku byl nejdříve přidán stejný objem 2x vzorkovacího pufru podle Laemmliho a směs byla 5 min zahřívána na termobloku při 95 °C. Po ochlazení byl ke vzorkům přidán 500 mmol.l<sup>-1</sup> DTT v poměru 1: 50 nebo stejný objem Tris-HCl pufru a vzorky byly zahřívány 15 min při teplotě 60 °C. Po ochlazení byl přidán 400 mmol.l<sup>-1</sup> jodoacetamid nebo stejný objem Tris-HCl pufru a vzorky byly inkubovány 60 min při laboratorní teplotě. Po každém kroku přidavku roztoků byla směs řádně promíchána na vortexu. Jednotlivé kroky postupu podrobněji uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Jednotlivé kroky postupu pro každou z variant přípravy vzorků.

Krok	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
1	Extrakt	Extrakt	Extrakt
2	Vzorkovací pufr	Vzorkovací pufr	Vzorkovací pufr
3	Zahřát (5 min, 95 °C), ochladit	Zahřát (5 min, 95 °C), ochladit	Zahřát (5 min, 95 °C), ochladit
4	Tris-HCl, pH 7,5	500 mmol <sup>-1</sup> DTT	500 mmol <sup>-1</sup> DTT
5	Zahřát (15 min, 60 °C), ochladit	Zahřát (15 min, 60 °C), ochladit	Zahřát (15 min, 60 °C), ochladit
6	Tris-HCl, pH 7,5	Tris-HCl, pH 7,5	400 mmol.l <sup>-1</sup> jodoacetamid
7	60 min lab. teplota	60 min lab. teplota	60 min lab. teplota

Roztoky:

APS 10% (w/v) (0,1 g persíranu amonného rozpustit v 1 ml deionizované vody)

Elektrodový pufr (0,025 mol.l<sup>-1</sup> Tris, 0,192 mol.l<sup>-1</sup> glycin, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3)

Barvicí roztok CBB R-250 (0,1% (w/v) CBB R-250 v 15% (v/v) kyselině octové a 45% (v/v) methanolu)

Odbarvovací roztok po barvení CBB R-250 (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová)

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu, množství pro přípravu dvou gelů (uvedeno v ml).

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 mol.l <sup>-1</sup> , pH 8,8	Tris HCl 0,5 mol.l <sup>-1</sup> , pH 6,8	H <sub>2</sub> O	SDS	TEMED	APS
D - 10%	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
Z - 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

### 3.4.12 Semi-dry Western blotting

Nejdříve byla připravena nitrocelulosevá (NC) nebo PVDF blotovací membrána a 2 ks silných filtračních papírů o stejné velikosti, jako jsou rozměry gelu. Gel po ukončení elektroforézy byl inkubován 15 min v blotovacím pufru, nitrocelulosevá membrána a filtrační papíry 10 min. PVDF membrána byla nejprve inkubována 5 min v čistém methanolu. Do blotovací komůrky byly postupně skládány jednotlivé vrstvy: na anodu (spodní elektrodu) – filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír. Pomocí válečku byly odstraněny bubliny mezi gelem a membránou. Poté byla přiložena katoda (horní elektroda), blotovací zařízení bylo uzavřeno víkem a připojeno ke zdroji napětí. Byl nastaven proud 190 mA, doba blotování byla zvolena na základě optimalizace (viz. kap. 4.2). PVDF membrána byla po ukončení blotování na cca 15 s opláchnuta v methanolu. Membrány byly poté po dobu 5 min barveny v barvicím roztoku s Ponceau S a následně opláchnuty destilovanou vodou a dále použity pro imunochemickou detekci proteinů.

#### Roztoky:

Blotovací pufr: 39 mmol.l<sup>-1</sup> glycin, 48 mmol.l<sup>-1</sup> Tris, 0,0375% (w/v) SDS, 20% (v/v) methanol

Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kyselině octové

### 3.4.13 Imunochemická detekce proteinů

Membrána byla po barvení v Ponceau S a promytí v destilované vodě nejdříve 2 hod inkubována v blokovacím roztoku, roztok sušeného mléka v TBS pufru obsahujícím Tween (TBS-T). Po zablokování nespecifických míst byla membrána promyta roztokem TBS-T. Poté byla membrána přenesena na 2 hod do roztoku mléka v TBS-T obsahujícího vhodně ředěnou primární protilátku. Po inkubaci byla membrána opět promyta roztokem TBS-T a inkubována 2 hod v roztoku mléka v TBS-T obsahujícího vhodně ředěnou sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatase (AP) nebo křenovou peroxidase (HRP). Následně byla membrána opět promyta roztokem TBS-T a dále byla provedena detekce. V případě sekundární protilátky značené AP byla membrána barvena pomocí roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP. Po vyvinutí tmavě fialových bandů byla membrána promyta destilovanou vodou, usušena a vyfocena. U sekundární protilátky značené HRP byl použit barvicí roztok s 4-Cl-1-naftolem nebo byla membrána inkubována s reagenty SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A a SERVALight

EOS Peroxide Solution Reagent B, které byly smíchány v poměru 1:1. Chemiluminiscenční signál byl poté detekován na přístroji C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor) a výsledky vyhodnoceny pomocí programu Image Studio.

Jednotlivé kroky imunochemické detekce proteinů, včetně časových intervalů a přesných objemů používaných roztoků jsou uvedeny v Tab. 4. Všechny kroky probíhaly za stálého třepání při teplotě 4 °C. Ředění primárních (anti-NOS, anti-GSNOR) a sekundárních protilátek bylo optimalizováno a je uvedeno ve výsledkové části této práce.

#### Roztoky:

TBS pufr: 20 mmol.l<sup>-1</sup> Tris, 500 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, pH 7,5

TBS-T: 0,15 ml Tween-20 do 300 ml TBS

Barvicí roztok pro AP: 10 ml AP pufru, 33 µl NBT (10% (w/v) NBT v 70% (v/v) DMF), 33 µl BCIP (5% (w/v) BCIP v 100% (v/v) DMF)

AP pufr: 100 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9,5), 50 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl

Barvicí roztok pro HRP: 15 mg 4-Cl-1-naftolu rozpustit v 5 ml methanolu, poté přidat 20 ml TBS pufru a 30 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tab. 4 Jednotlivé kroky postupu imunochemické detekce proteinů.

Postup	Objem (ml)	Čas (min)
Inkubace s 1% nebo 5% mlékem v TBS-T	25	120
Promytí roztokem TBS-T	30	10
Inkubace s primární protilátkou v 1% nebo 5% mléce v TBS-T	25	120
Promytí roztokem TBS-T	30	10
Promytí roztokem TBS-T	30	10
Inkubace se sekundární protilátkou v 1% nebo 5% mléce v TBS-T	25	120
Promytí roztokem TBS-T	30	10
Promytí roztokem TBS-T	30	10
Detekce barvicím roztokem pro HRP/AP	25/10	10
Promytí destilovanou vodou	30	2 x 10

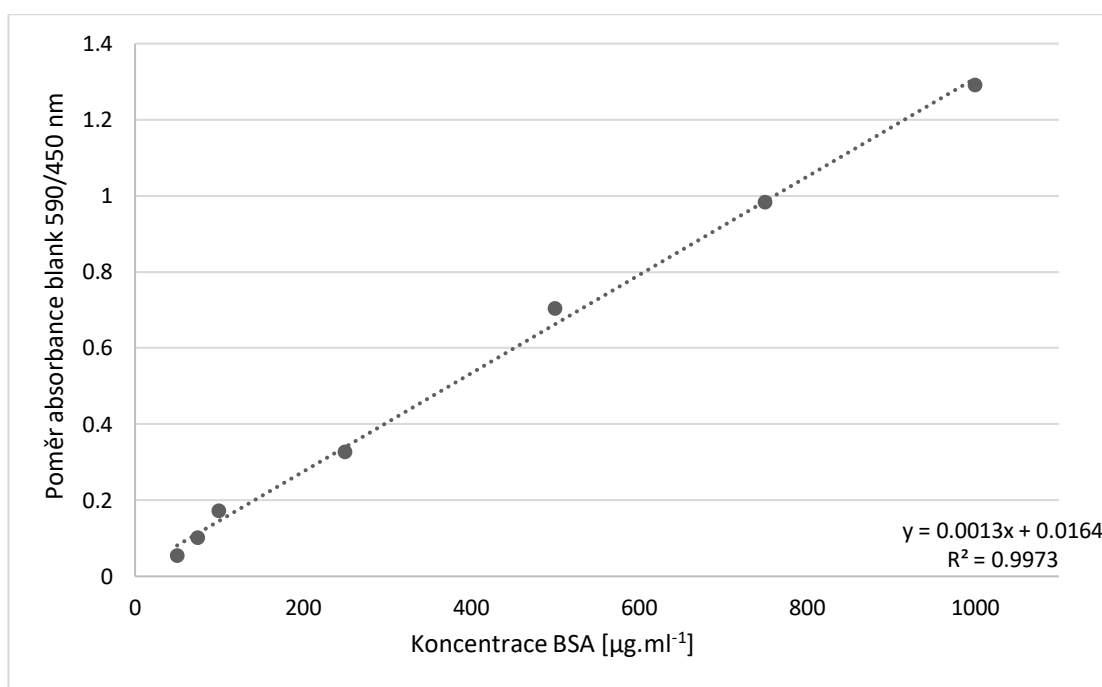
Aby byly objemy použitých protilátek co nejmenší, byla vyzkoušena alternativní metoda imunochemické detekce proteinů s využitím parafilmu. Tato metoda je prováděna v plastové krabičce s víkem, ve které jsou umístěny vodou nasáklé filtrační papíry a na nich je položeno sklíčko pokryté parafilmem. Na hydrofobní povrch parafilmu jsou umístěny membrány. Na každou membránu je nanášen pouze takový objem roztoku protilátky v mléce, aby pokryl celý povrch membrány, tj. 0,5 ml v případě jednotlivých proužků membrány. Takto sestavená komůrka musí být vždy dostatečně zvlhčená a uzavřená, aby nedocházelo k odpařování vody a vysušování membrány. Inkubace probíhá bez třepání při teplotě 4 °C. Následující kroky po inkubaci jsou prováděny stejně jako u původní metody.

## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích byly připraveny standardy BSA o koncentraci 1-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a následně byla měřena absorbance při 590 a 450 nm proti blanku v technických triplikátech metodou Bradfordové (Obr. 10).

Ze získané rovnice kalibrační přímky byla poté vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích. Tyto hodnoty byly dále využity u SDS-PAGE, kdy byly extrakty naředěny na vhodnou koncentraci a dále v rámci stanovení specifické aktivity enzymů, kdy byla výsledná aktivita vztažena na množství proteinů ve vzorku.



Obr. 10 Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci BSA. Rovnice přímky  $y = 0,0013x - 0,0164$  s hodnotou spolehlivosti  $R^2 = 0,9973$ .

## 4.2 Zavedení metody stanovení aktivity TrxR

V tělních částech včely medonosné bylo testováno stanovení aktivity TrxR metodou popsanou v literatuře pro enzym z *Drosophily*, včetně využití methylviologenu jako možného specifického inhibitoru aktivity hmyzí TrxR. Aktivita byla měřena u neinhibované reakce a u reakce inhibované methylviologenum (Tab. 5). Nejvyšší specifická aktivita TrxR byla naměřena v hlavové části včely. Po přidavku inhibitoru methylviologenu o celkové koncentraci 1 mmol.l<sup>-1</sup> došlo u všech vzorků pouze k mírnému poklesu aktivity. Měření bylo provedeno u každého vzorku v technickém triplicátu pouze jednou. Jedná se tedy pouze o orientační měření, kdy byla na vzorcích klinicky zdravých včel testována daná metoda.

Tab. 5 Stanovení specifické aktivity TrxR v tělních částech včely. Každý vzorek byl měřen v sérii tří opakování v technickém triplicátu.

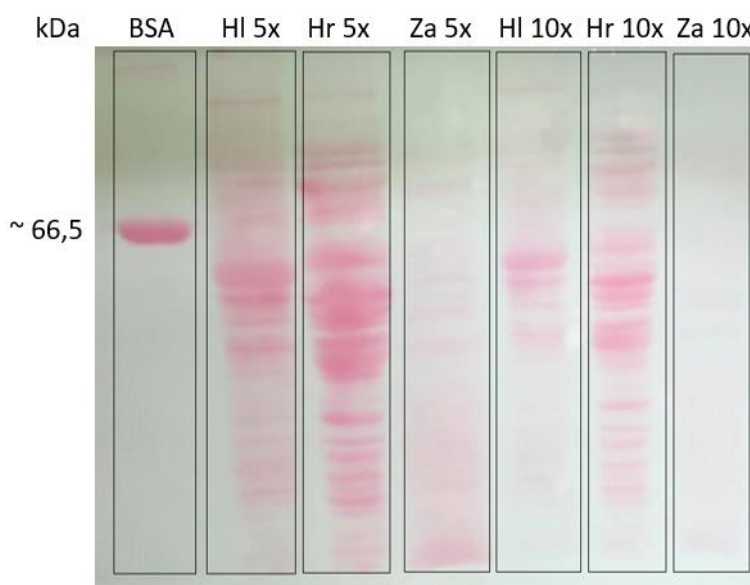
Tělní část včely	Specifická aktivita TrxR (pkat.mg <sup>-1</sup> proteinu)	Specifická aktivita TrxR po přidavku inhibitoru (pkat.mg <sup>-1</sup> proteinu)
Hlava	5,00 ± 1,55	4,57 ± 1,40
Hrud'	3,21 ± 0,47	2,92 ± 0,36
Zadeček	3,46 ± 0,34	2,60 ± 0,55



### 4.3 Optimalizace metody semi-dry Western blotting

Ve výchozích experimentech byl optimalizován čas potřebný k přenosu proteinů z gelu na membránu metodou semi-dry blottingu. Proteiny přenesené na membránu byla následně detekována pomocí Ponceau S, zatímco proteiny nepřenesené z gelu byly detekovány pomocí CBB R-250. Byly vyzkoušeny časy blotování 60, 90 a 120 min a 16 hod. Při nastavení proudu 190 mA a blotování po dobu 120 min byl přenos proteinů na membránu úplný, v použitém gelu nebyly viditelné žádné bandy. V případě, kdy byla doba blotování zkrácena na polovinu, tedy 60 min, byly bandy na membráně mnohem méně výrazné a byly viditelné i na gelu, přenos tedy nebyl úplný. Jako čas potřebný k úplnému přeblokování proteinů byla následně zvolena varianta 90 min.

Dále bylo optimalizováno ředění vzorků použitých pro separaci v SDS-PAGE gelech. Na gel byla nanášena koncentrační řada standardů BSA, a dále neředěné a ředěné extrakty tělních částí (hlava, hrud', zadeček) včely. V jednotlivých extraktech bylo nejdříve metodou Bradfordové stanoveno množství celkových proteinů. Nejvhodnější rozmezí koncentrace proteinů ve vzorku bylo 500-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kdy byly jednotlivé proteiny vhodně separovány (Obr. 11; odpovídá ředění 10x). V rámci optimalizace metody byly také testovány blokační roztoky s dvěma různými koncentracemi sušeného mléka v TBS pufru (1% a 5%), kdy jako vhodnější byl zvolen blokační roztok s 5% koncentrací mléka.



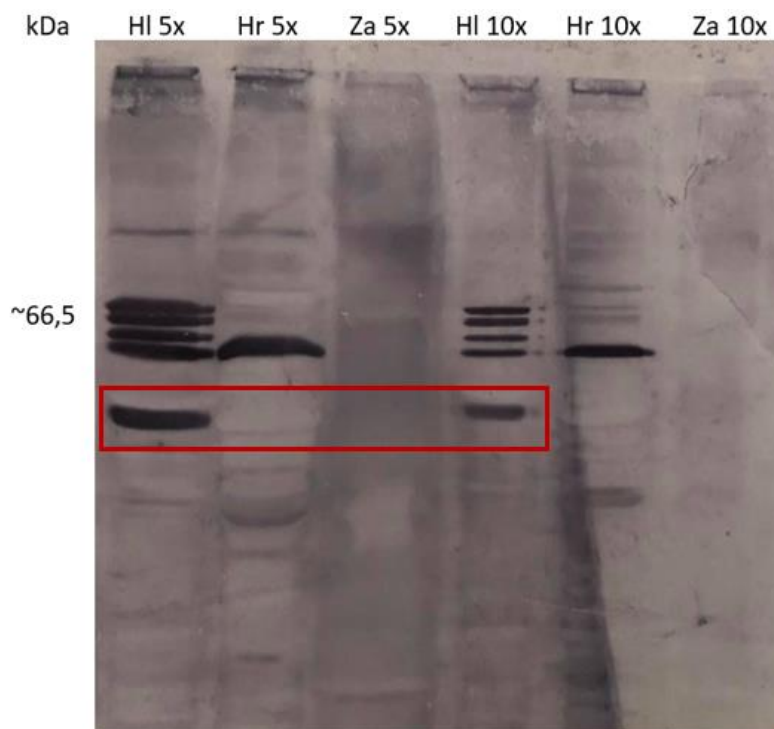
Obr. 11 Optimalizace ředění extraktů – detekce proteinů na NC membráně (zleva: BSA 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 5x ředěné extrakty: hlava, hrud', zadeček; 10x ředěné extrakty: hlava, hrud', zadeček).

## 4.4 Imunochemická detekce proteinů

### 4.4.1 Testování králičí polyklonální protilátky anti-GSNOR

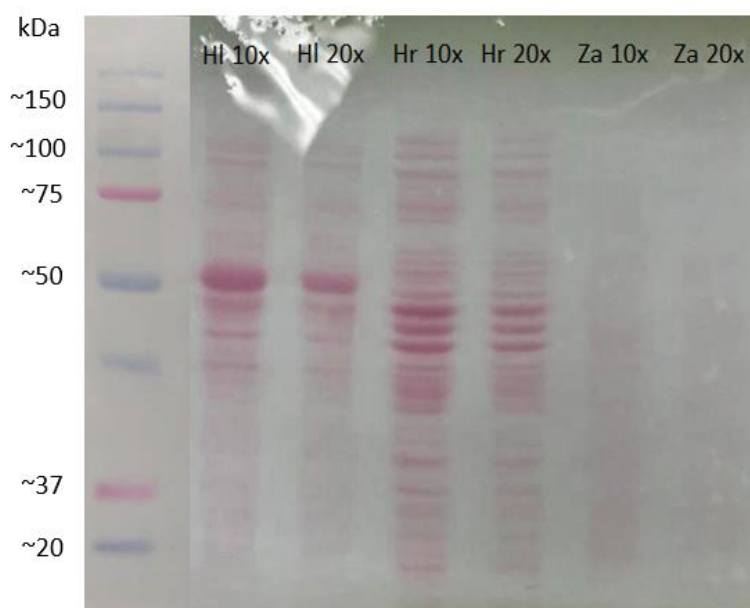
Byla testována králičí polyklonální anti-GSNOR protilátka připravená imunizací králíků (označení jako králík č. 45 a č. 46). Testováno bylo finální nepurifikované sérum získané z obou králíků i frakce imunoglobulinů získaná afinitní purifikací výchozího séra, provedená komerční firmou.

Nejdříve byla testována nepurifikovaná séra z obou králíků. Byla použita ředění séra 1:1000 a sekundární anti-králičí kozí protilátky značené AP 1:1500. Po barvení roztokem NBT-BCIP můžeme na membráně v případě extraktů z včelích hlav pozorovat pět výrazných bandů a u extraktů hrudi jeden výrazný band, zatímco v extraktech zadečků nebyly detekovány žádné bandy (Obr. 12). Enzymu GSNOR by měl dle předpokládané hmotnosti odpovídat vyznačený band u extraktů z hlavy, avšak na membráně byly další nespecifické bandy, které byly zbarveny s podobnou intenzitou.

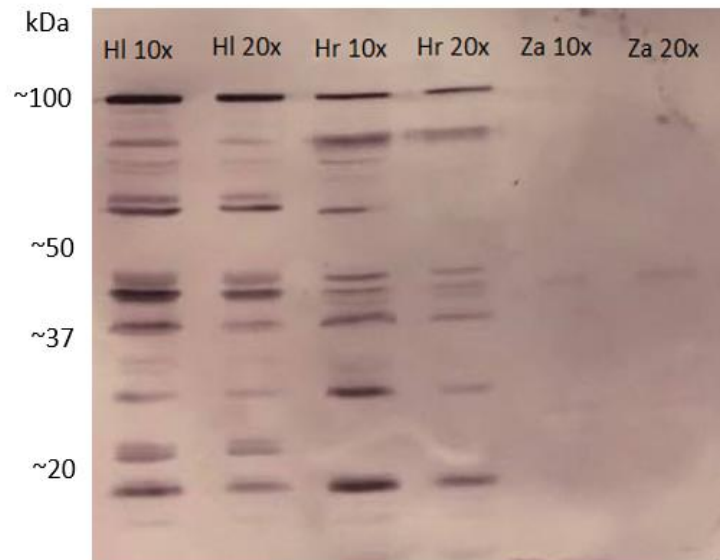


Obr. 12 Testování detekce GSNOR v extraktech tělních částí včel s použitím nepurifikovaného séra z králíka č. 46 na NC membráně, zleva: 5x ředěné extrakty – hlava, hrud', zadeček; 10x ředěné extrakty – hlava, hrud', zadeček; ředění séra 1:1000, ředění sekundární anti-králičí protilátky značené AP 1:1500.

Dále byly pro detekci včelí GSNOR testovány purifikované protilátky z obou králíků. Ředění purifikované primární anti-GSNOR protilátky bylo 1:1000 a sekundární anti-králičí kozí protilátky značené AP 1:2500. U extraktů z hlav a hrudníků můžeme pozorovat množství slabě zbarvených bandů (Obr.14). Intenzita zbarvení pozadí použité NC membrány byla v tomto případě stále velmi výrazná. V případě extraktu ze zadeček nebyly bandy opět viditelné ani na membráně po blotování a barvení v Ponceau S (Obr. 13), ani po imunodetekci (Obr. 14, stejná membrána).



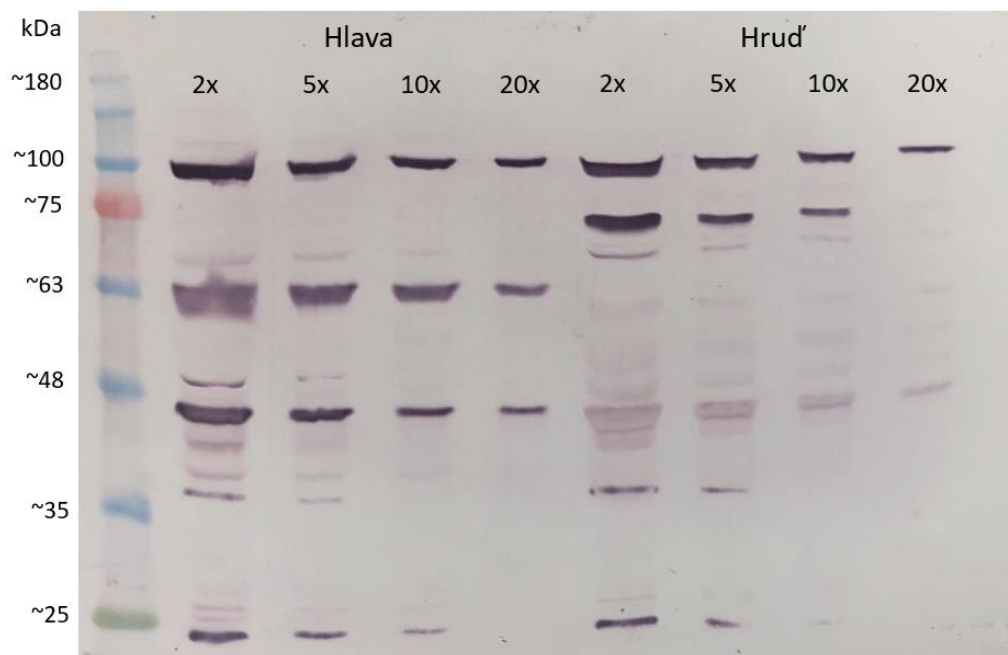
Obr. 13 Testování detekce GSNOR v extraktech tělních částí včel na NC membráně, zleva: markery molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Xtra, hlava – 10x a 20x ředěný extrakt; hrud' – 10x a 20x ředěný extrakt; zadeček – 10x a 20x ředěný extrakt.



Obr. 14 Testování detekce GSNOR v extraktech tělních částí včel s použitím purifikované protilátky z králíka č. 46 na NC membráně; zleva: hlava – 10x a 20x ředěný extrakt; hrud' – 10x a 20x ředěný extrakt; zadeček – 10x a 20x ředěný extrakt; purifikovaná primární anti-GSNOR protilátka 1:1000, sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

Jelikož bandy u zadečku nebyly viditelné, dále se pokračovalo s testováním použití protilátek pro detekci GSNOR pouze u extraktů z hlaviček a hrudníků z klinicky zdravých včel (pro následující experimenty byly použity nové extrakty, ředění se tedy liší a muselo být dále upraveno).

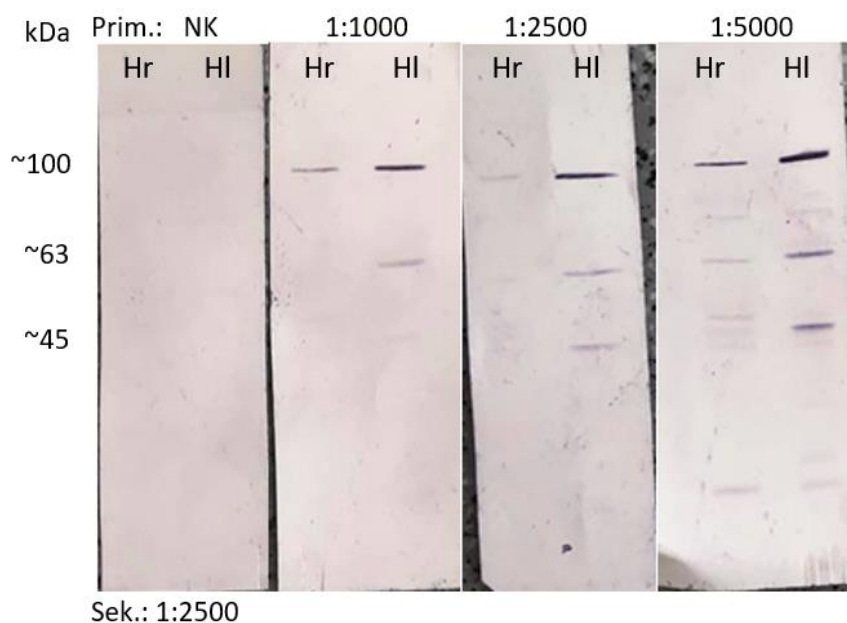
Na gel byla nanesena kalibrační řada ředěných extraktů z hlav a hrudníků (ředění 2x, 5x, 10x a 20x). Místo NC membrány byla v tomto experimentu testována PVDF membrána, která byla po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a pro následnou imunodetekci byla primární purifikovaná anti-GSNOR protilátka z králíka č. 46 ředěna 1:5000 a sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:10 000 (Obr. 15). Výsledky experimentů s použitím protilátky z králíka č. 45 i č. 46 byly téměř shodné, z toho důvodu byla ve všech dalších experimentech testována pouze protilátka č. 46 (dále neuváděno). V tomto případě již nebylo na PVDF membráně viditelné tak rušivé pozadí jako při použití nitrocelulosové membrány a jako nejvhodnější bylo zvoleno ředění extraktů 20x (odpovídá koncentraci proteinů  $\sim 700 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).



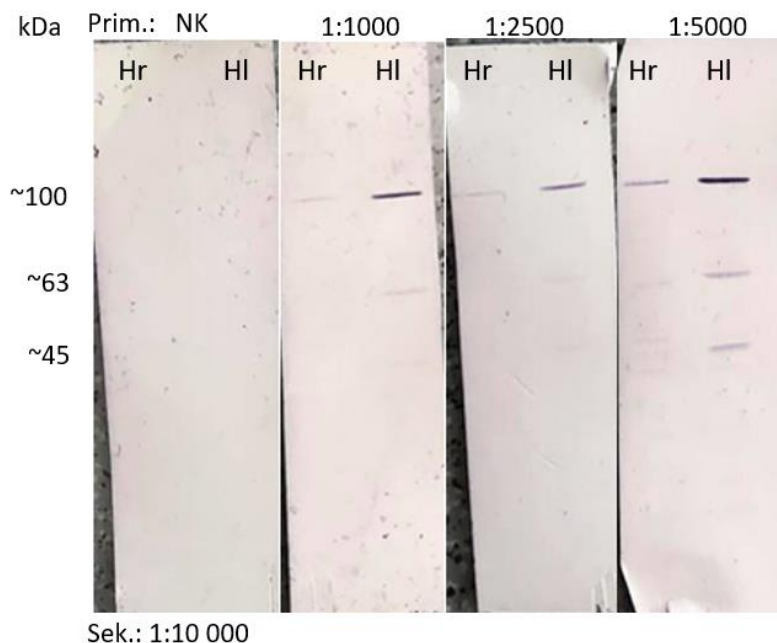
Obr. 15 Testování detekce GSNOR na PVDF membráně, zleva: markery molekulových hmotností SERVA Triple Color Protein Standard III, kalibrační řada vzorků hlava, hrud' (ředění 2 – 20x); purifikovaná primární protilátka anti-GSNOR 1:5000, sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:10 000.

Dále byly pro imunodetekci GSNOR testovány různé kombinace ředění primární a sekundární protilátky. Na gel byly za sebou nanoseny vždy dvojice 20x ředěných extraktů z hlavy a hrudi. NC nebo PVDF membrána byla po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a nastříhána na jednotlivé části, kdy vždy na jednom kusu membrány byla dvojice hlava-hrud'. Poté byla vyzkoušena tři ředění purifikované primární anti-GSNOR protilátky z králíka č. 46 (1:1000; 1:2500; 1:5000), negativní kontrola bez přídavku primární protilátky a dvě ředění sekundární anti-králičí protilátky značené AP (1:2500 a 1:10 000).

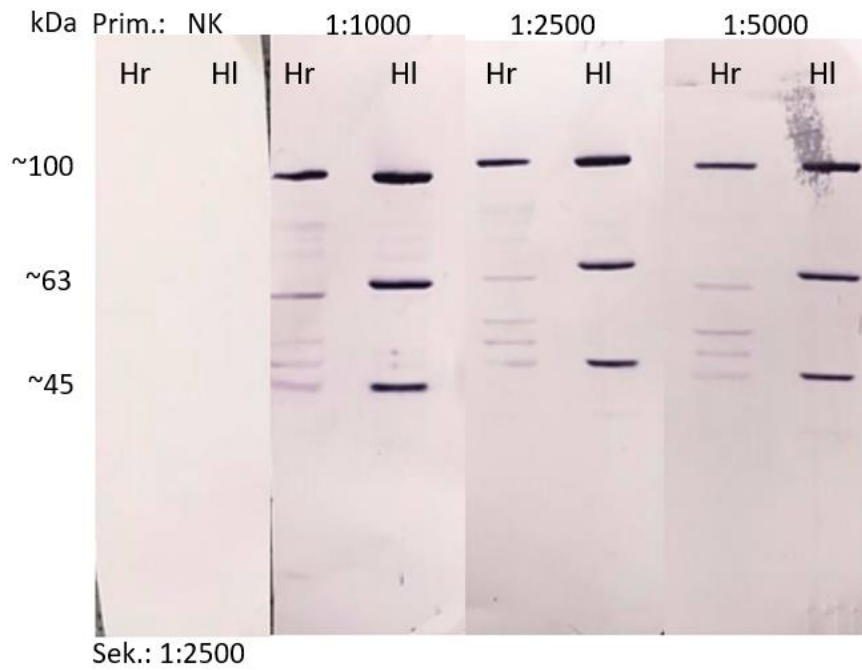
Nejlepších výsledků bylo dosaženo s ředěním primární protilátky 1:5000, kdy je vidět, že má protilátka dobrou afinitu k cílovému proteinu. Co se týče ředění sekundární protilátky, tak byly bandy více viditelné při ředění 1:2500 u obou typů membrán (Obr. 17 a Obr. 19). V porovnání s NC membránou (Obr. 16 a Obr. 17) byly při použití PVDF membrány (Obr. 18 a Obr. 19) bandy ostřejší a výrazněji zbarvené.



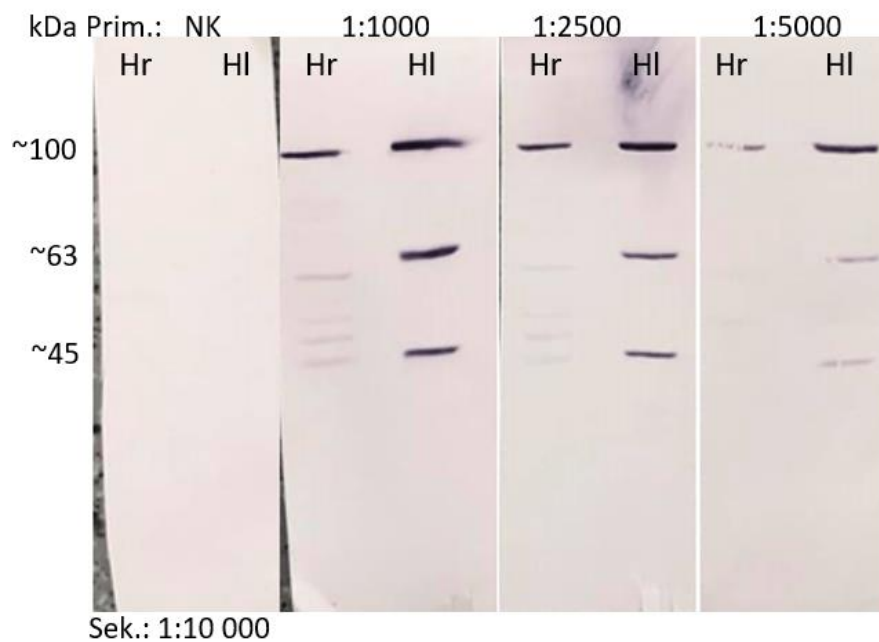
Obr. 16 Testování detekce GSNOR s různým ředěním primární a sekundární protilátky na NC membráně, dvojice extraktů hrudí (Hr), hlava (HI); purifikovaná primární anti-GSNOR protilátka (zleva: negativní kontrola – NK; 1:1000; 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.



Obr. 17 Testování detekce GSNOR s různým ředěním primární a sekundární protilátky na NC membráně, dvojice extraktů hrudí (Hr), hlava (HI); purifikovaná primární protilátka anti-GSNOR (zleva: negativní kontrola – NK, 1:1000; 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:10 000.



Obr. 18 Testování detekce GSNOR s různým ředěním primární a sekundární protilátky na PVDF membráně, dvojice extraktů hrud' (Hr), hlava (HI); purifikovaná primární anti-GSNOR protilátka (zleva: negativní kontrola – NK; 1:1000; 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

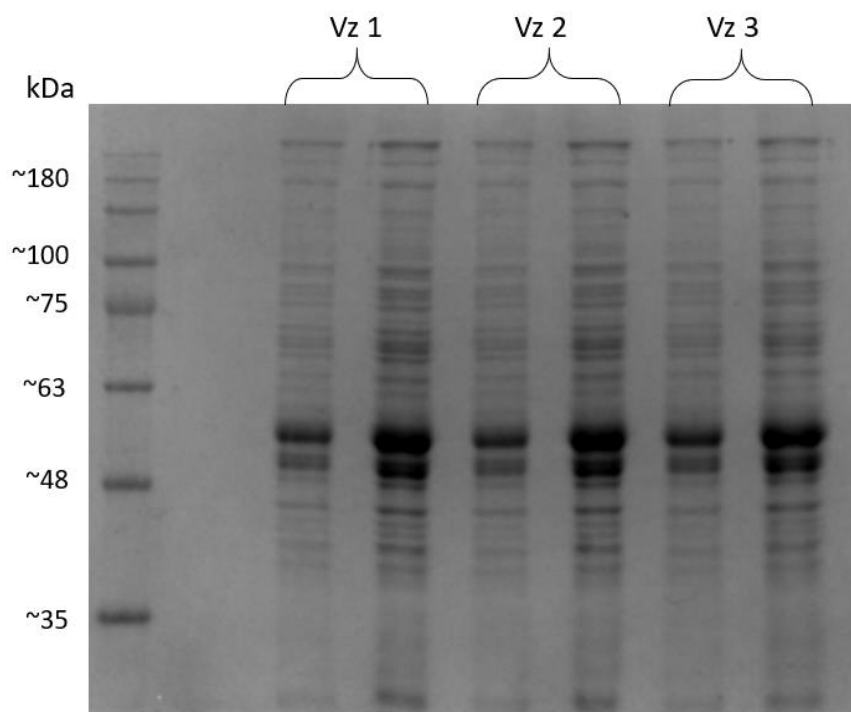


Obr. 19 Testování detekce GSNOR s různým ředěním primární a sekundární protilátky na NC membráně, dvojice extraktů hrud' (Hr), hlava (HI); purifikovaná primární protilátka anti-GSNOR (zleva: negativní kontrola – NK, 1:1000; 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:10 000.



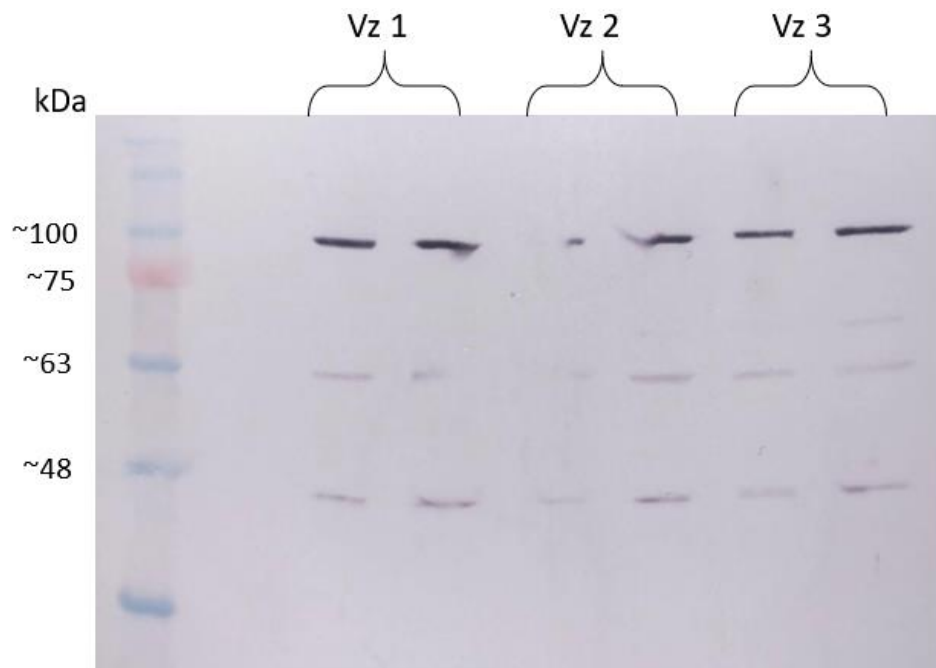
Jako další byl proveden experiment, kdy bylo testováno, jestli během elektroforetické separace v SDS-gelech nedochází ke spojování proteinů v dimery či vyšší oligomery. Band odpovídající molekulové hmotnosti ~100 kDa by v tomto případě mohl odpovídat proteinu, který by vznikl spojením dvou podjednotek GSNOR o velikosti ~40 kDa v dimer. Pro tento experiment byl použit 20x ředěný extrakt hlavy. Celkem byly připraveny tři různé varianty jednoho vzorku: vzorek 1 (redukovaný vzorkovacím puforem s  $\beta$ -merkaptoethanolem), vzorek 2 (redukovaný vzorkovacím puforem a dodatečně redukovaný vyšší koncentrací DTT), vzorek 3 (redukovaný vzorkovacím puforem, DTT a následně alkylovaný jodoacetamidem). PVDF membrána po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a pro následnou imunodetekci byla purifikovaná primární anti-GSNOR ředěna 1:5000 a sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

Podle obrázku gelu (Obr. 20) a membrány po detekci GSNOR (Obr. 21) je patrné, že separace proteinů na gelu proběhla u všech tří typů způsobů přípravy vzorku stejně, tedy proteiny netvoří oligomery či vyšší adukty proteinů. Lze tedy konstatovat, že anti-GSNOR protilátka není úplně specifická.



Obr. 20 Analýza proteinů metodou SDS-PAGE v extraktech včel po dodatečné redukcii a alkylaci proteinů, zleva: markery molekulových hmotností SERVA Triple Color Protein Standard III, vzorek 1-3 (u každého naneseno do jamky 10 a 20  $\mu$ l).

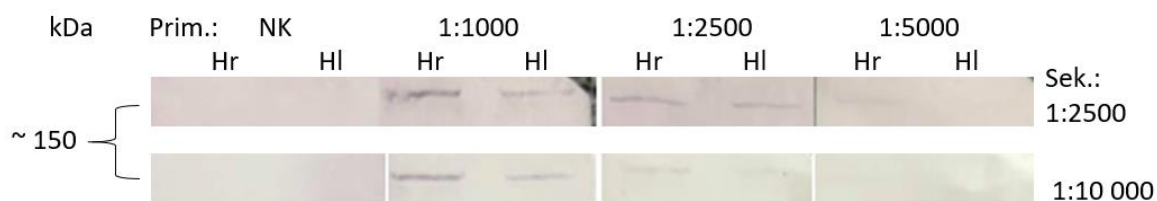




Obr. 20 Detekce GSNOR v extraktech včel po dodatečné redukcii a alkylaci proteinů, zleva: markery molekulových hmotností SERVA Triple Color Protein Standard III, vzorek 1-3; purifikovaná primární anti-GSNOR protilátka 1:5000, sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

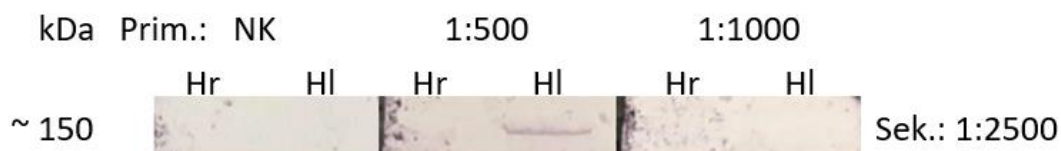
#### 4.4.2 Testování univerzální protilátky anti-NOS

Pro imunochemickou detekci NOS v extraktech tělních částí včel byla testována komerční univerzální anti-NOS protilátka. Nejdříve byl proveden experiment, kdy byly na gel za sebou naneseny vždy dvojice vhodně ředěných extraktů hlavy a hrudi. Membrána byla po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a nastříhána na jednotlivé části, kdy vždy na jednom kusu membrány byla dvojice extraktů z hlavy a hrudi. Poté byla vyzkoušena tři ředění primární anti-NOS protilátky (1:1000; 1:2500; 1:5000), negativní kontrola bez přídavku primární protilátky a dvě ředění sekundární protilátky značené AP (1:2500 a 1:10 000). Po barvení membrány byly viditelné slabě zbarvené bandy odpovídající velikosti přibližně 150 kDa (Obr. 22). V případě ředění primární protilátky 1:1000 byly bandy viditelné u obou kombinací sekundární protilátky. Při ředění primární protilátky 1:2500 v kombinaci s ředěním sekundární protilátky 1:10 000 byly bandy viditelné pouze slabě.

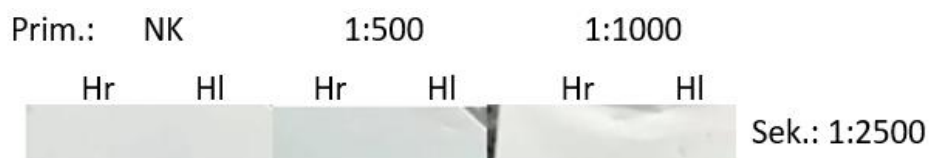


Obr. 22 Detekce NOS v extraktech tělních částí včel s využitím komerční anti-NOS protilátky, na každém kusu NC membrány dvojice extraktů hrud' (Hr), hlava (Hl); primární protilátka anti-NOS (zleva: negativní kontrola; 1:1000; 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značena AP (1:2500, 1:10 000).

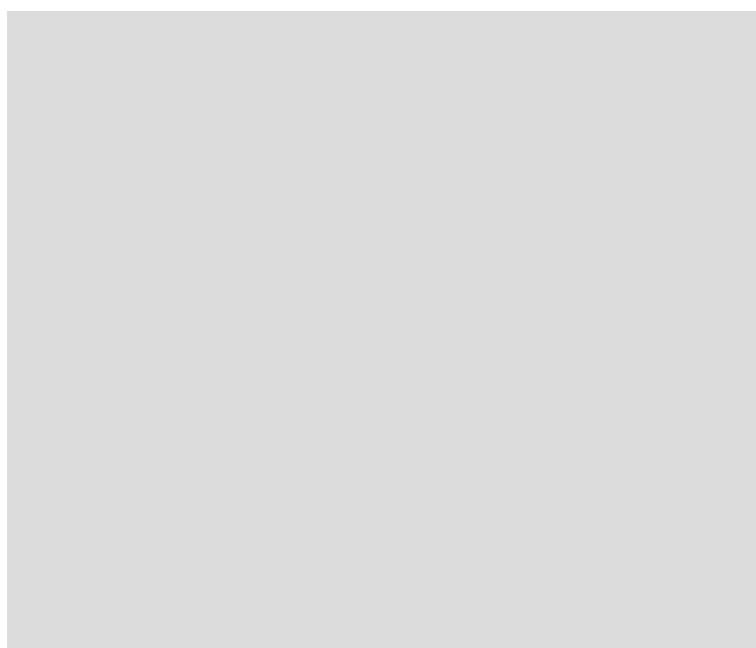
Pro testování protilátky anti-NOS byla vyzkoušena alternativní metoda imunochemické detekce proteinů s využitím parafilmu. Do jamek gelu byly za sebou nanášeny vždy dvojice vhodně ředěných extraktů hlava-hrud'. Membrána byla po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a nastříhána na jednotlivé části, kdy vždy na jednom kusu membrány byla dvojice extraktů hlava-hrud'. Na sklíčko pokryté parafilmem byly umístěny jednotlivé kusy membrány. Na každý kus membrány bylo poté nanášeno 0,5 ml roztoku protilátky v mléce. Byla použita dvě ředění anti-NOS primární protilátky (1:500, 1:1000), negativní kontrola bez přídavku primární protilátky a dvě různé sekundární protilátky-značené AP a HRP, obě ředěny 1:2500. Po barvení membrány roztokem NBT-BCIP bylo možné vidět pouze jeden slabě zbarvený band u extraktu z hlavové části při ředění primární protilátky 1:500, odpovídající velikosti přibližně 150 kDa (Obr. 23). Pro sekundární protilátku značenou HRP byly vyzkoušeny dva způsoby detekce – barvení roztokem s 4-Cl-1-naftolem (Obr. 24) a chemiluminiscenční detekce (Obr. 25). Ani v jednom případě nebyly detekovány na membráně žádné bandy.



Obr. 23 Detekce NOS v extraktech tělních částí včel s využitím komerční anti-NOS protilátky, na každém kusu NC membrány dvojice extraktů hrud' (Hr), hlava (Hl); primární protilátka anti-NOS (zleva: negativní kontrola, 1:500 a 1:1000), sekundární anti-králičí protilátka značena AP 1:2500 – detekce NBT-BCIP.



Obr. 24 Detekce NOS v extraktech tělních částí včel s využitím komerční anti-NOS protilátky, na každém kusu NC membrány dvojice extraktů hrud' (Hr), hlava (Hl); primární protilátka anti-NOS (zleva: negativní kontrola, 1:500 a 1:1000), sekundární anti-králičí protilátka značena HRP 1:2500 – detekce 4-Cl-1-naftolem.

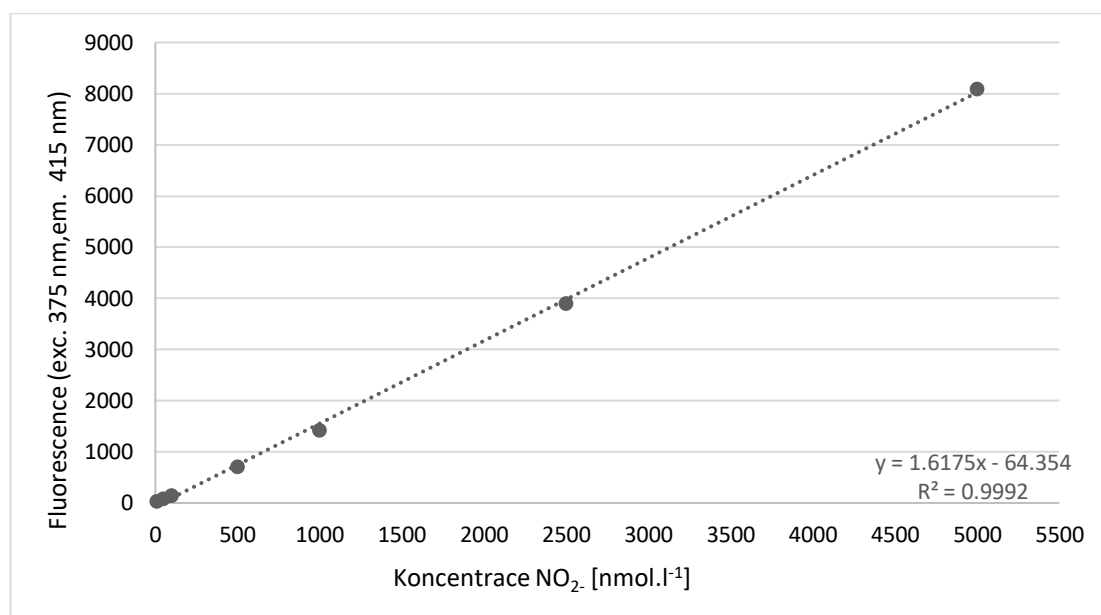


Obr. 25 Detekce NOS v extraktech tělních částí včel s využitím komerční anti-NOS protilátky, primární protilátka anti-NOS (negativní kontrola, 1:500 a 1:1000), sekundární anti-králičí protilátka značena HRP 1:2500 – chemiluminiscenční detekce. Chemiluminiscenční signál byl detekován na přístroji C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor) a výsledky vyhodnoceny pomocí programu Image Studio.

## 4.5 Aktivita NOS u klinicky zdravých včel

### 4.5.1 Stanovení aktivity NOS metodou s 2,3-diaminonafthalenem

Pro fluorimetrické stanovení koncentrace dusitanů, vznikajících oxidací NO produkovaného v reakci katalyzované NOS, byla sestrojena kalibrační přímka, která vykazuje linearitu v daném koncentračním rozmezí ( $R^2 = 0,9992$ , Obr. 26).



Obr. 26 Kalibrační přímka stanovení NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fluorescenční metodou s DAN. Rovnice přímky  $y = 1,6175x - 64,354$  s hodnotou spolehlivosti  $R^2 = 0,9992$ .

V tělních částech včely medonosné poté byla metodou s DAN stanovena specifická aktivita NOS (Tab.6). Měření bylo provedeno u každého vzorku v technickém triplikátu pouze jednou. Jedná se tedy pouze o orientační měření, kdy byla na vzorcích klinicky zdravých včel testována daná metoda. Specifická aktivita NOS byla ve všech tělních částech včely velmi nízká, ale nejvyšší aktivitu enzymu můžeme pozorovat v zadečkové části.

Tab. 6 Stanovení specifické aktivity NOS u tělních částí včely. Každý vzorek byl měřen pouze jednou v technickém triplikátu.

Tělní část včely	Specifická aktivita NOS (pkat.mg <sup>-1</sup> proteinu)
Hlava	0,12
Hrud'	0,11
Zadeček	0,29

#### 4.5.2 Testování inhibice NOS

Metodou s DAN byla stanovena specifická aktivita NOS v reakci, v níž byl substrát NOS (L-arginin) nahrazen jeho isomerem D-argininem (Tab. 7). Specifická aktivita enzymu při použití D-arginin jako substrátu, byla  $0,08 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ , což představuje 22% aktivitu vůči specifické aktivitě s L-argininem.

Dále bylo opět metodou s DAN testováno 5 známých inhibitorů živočišných forem NOS – aminoguanidin, 7-nitroindazol, S-ethylisothiomočovina, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin a

L-NAME s výslednou koncentrací v reakční směsi 1 a 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 8). Měření bylo provedeno pro každou koncentraci inhibitorů pouze jednou, jedná se tedy pouze o orientační výsledky. Na základě těchto získaných výsledků lze konstatovat, že všechny testované inhibitory kromě L-NAME vykazují inhibiční účinky na včelí NOS.

Tab. 7 Specifické aktivity NOS při použití substrátů L-argininu a D-argininu. Každý vzorek byl měřen pouze jednou v technickém triplikátu.

Substrát o koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Specifická aktivita NOS ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)	Relativní aktivita vztažená k hodnotě pro L-Arg (%)
L-arginin	0,35	100
D-arginin	0,08	22

Tab. 8 Testování vlivu inhibitorů o celkové koncentraci 1 a 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  na specifickou aktivitu NOS v hlavové části metodou s DAN. Každý vzorek byl měřen pouze jednou v technickém triplikátu.

Inhibitor	Aktivita vztažená ke kontrole (%)	
	1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
N <sup>o</sup> -nitro-L-arginin	64,8	34,0
Aminoguanidin	67,1	30,7
7-nitroindazol	43,0	38,9
S-ethylisothiomočovina	55,2	9,3
L-NAME	131,3	112,9

#### 4.6 Stanovení aktivity GSNOR u klinicky zdravých včel a octomilky

U octomilek a v tělních částech klinicky zdravých včel byla stanovena specifická aktivita GSNOR (Tab. 9). Měření bylo provedeno u každého vzorku třikrát, vždy v technickém triplikátu. Nejvyšší specifická aktivita GSNOR byla naměřena u octomilky. U včel byla nejvyšší aktivita naměřena v hlavové části.

Tab. 9 Stanovení specifické aktivity GSNOR u octomilky (*D. melanogaster*) a tělních částí včely (*A. mellifera*). Každý vzorek byl měřen v sérii tří opakování v technickém triplikátu.

Vzorek	Specifická aktivita GSNOR (pkat.mg <sup>-1</sup> proteinu)
<i>Apis mellifera</i> – Hlava	6,19 ± 0,39
<i>Apis mellifera</i> – Hrud'	4,07 ± 0,35
<i>Apis mellifera</i> – Zadeček	5,84 ± 0,31
<i>Drosophila</i>	7,13 ± 0,23

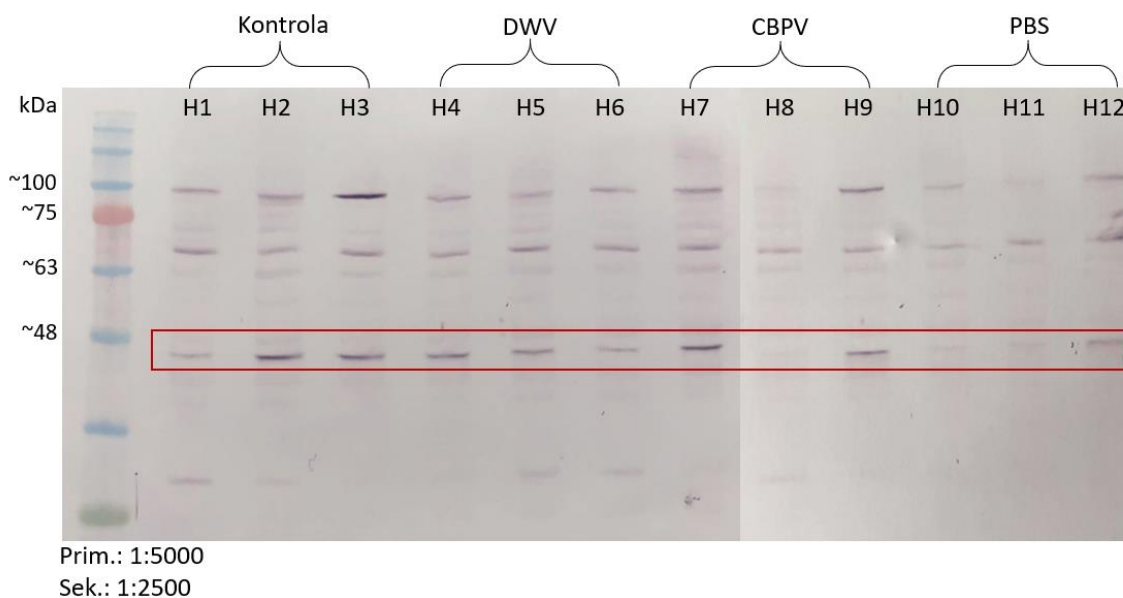
## 4.7 Analýza GSNOR u včel infikovaných viry

### 4.7.1 Detekce GSNOR

Purifikovaná protilátka byla využita pro detekci GSNOR ve 12 vzorcích včelích hlaviček z USA – kontrola bez vpichu (H1-H3), včely infikované DWV (H4-H6), včely infikované CBPV (H7-H9) a včely injektované PBS (H10-H12) (Obr. 27).

PVDF membrána po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a pro následnou imunodetekci byla purifikovaná primární anti-GSNOR ředěna 1:5000 a sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

Podobně jakou u extraktů hlav klinicky zdravých včel, použitých pro optimalizaci metody imunochemické detekce GSNOR, byly u všech vzorků pozorovány tři výrazné bandy, které odpovídají proteinům o molekulových hmotnostech ~100, 70 a 40 kDa. Jelikož se molekulové hmotnosti těchto proteiny poměrně výrazně liší, potvrzuje se tím značná nespecifita této protilátky. Enzymu GSNOR by mohl odpovídat spodní band, tedy protein o velikosti ~40 kDa.



Obr. 27 Detekce GSNOR ve vzorcích včel vystavených virové infekci; zleva: markery molekulových hmotností SERVA Triple Color Protein Standard III, kontrola bez vpichu (H1-H3), včely infikované DWV (H4-H6), včely infikované CBPV (H7-H9) a včely injektované PBS (H10-H12); purifikovaná primární protilátka anti-GSNOR 1:5000, sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:2500.

### 4.7.2 Stanovení aktivity GSNOR

Specifická aktivita GSNOR byla stanovena ve vzorcích hlav včel vystavených virovým infekcím (kontrola, včely infikované DWV, včely infikované CBPV a včely injektované PBS; Tab. 10). Pro každou experimentální skupinu byly analyzovány vzorky ze dvou různých včelstev. Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena ve vzorcích včel infikovaných viry. Z důvodu nedostatku biologického materiálu bylo měření provedeno v technickém triplikátu u každého vzorku pouze jednou. Jedná se tedy pouze o orientační výsledky, pro jejichž potvrzení by bylo potřeba měření zopakovat na více vzorcích.

Tab. 10 Stanovení specifické aktivity GSNOR v hlavové části včel – kontrolní včely bez vpichu, včely infikované viry DWV a CBPV, včely injektované PBS. Každý vzorek byl měřen pouze jednou v technickém triplikátu.

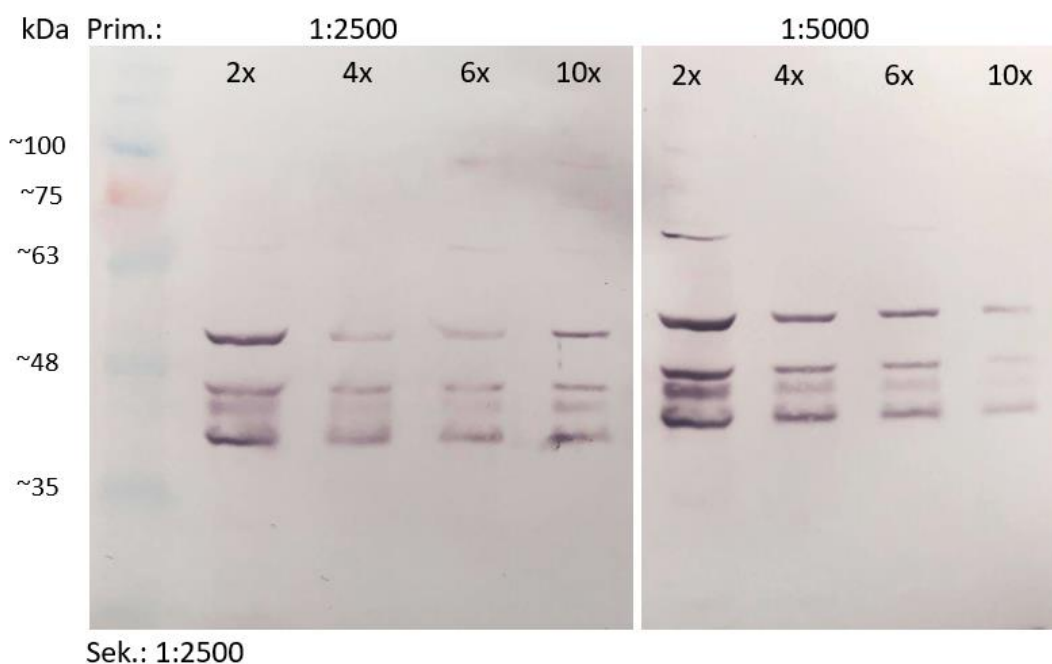
Ošetření	Vzorek	Specifická aktivita GSNOR (pkat.mg <sup>-1</sup> proteinu)
Kontrola	H2	4,33
	H3	3,51
DWV	H4	9,23
	H5	7,91
CBPV	H8	6,21
	H9	7,87
PBS	H10	3,41
	H11	4,07



## 4.8 Detekce GSNOR u octomilky

Purifikovaná protilátka anti-GSNOR byla použita pro detekci GSNOR u vzorků celých těl dospělců octomilky. Na gel byl nanesen 2x, 4x, 6x a 10x ředěný extrakt. PVDF membrána byla po blotování barvena v Ponceau S, promyta destilovanou vodou a pro následnou imunodetekci byla anti-GSNOR ředěna 1:2500 a 1:5000 v kombinaci se sekundární anti-králičí protilátkou značenou AP ředěnou 1:2500.

Po barvení roztokem NBT-BCIP na membráně pozorovány 4 bandy, odpovídajícím molekulovým hmotnostem ~40-55 kDa (Obr. 28). Tyto výsledky opět pravděpodobně ukazují na nižší specifitu testované protilátky. Lepších výsledků bylo dosaženo v případě ředění primární protilátky 1:5000, což koreluje i s výsledky z experimentů provedených na vzorcích extraktů tělních částí včel.



Obr. 28 Testování detekce GSNOR v extraktech celých těl dospělců octomilky, zleva: markery molekulových hmotností SERVA Triple Color Protein Standard III, 2x, 4x, 6x a 10x ředěný extrakt; purifikovaná primární protilátka anti-GSNOR (ředění 1:2500 a 1:5000), sekundární anti-králičí protilátka značená AP 1:10 000.

## 5 Diskuze

### 5.1 Zavedení metody stanovení aktivity TrxR

Trx/TrxR systém se společně s GSNOR podílí na regulaci nitrosace proteinů. V současnosti dostupná literatura poskytuje pouze málo informací ohledně tohoto systému u hmyzu. Tato diplomová práce poskytuje vůbec první informace týkající se měření aktivity enzymu TrxR u včely medonosné. V tělních částech včely byla testována metoda stanovení aktivity TrxR popsaná v práci Kanzok *et al.*, 2001. V této studii 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  koncentrace inhibitoru methylviologenu v reakci inhibovala enzymovou aktivitu DmTrxR a lidské TrxR a GR, kdy aktivita reakce klesla přibližně na 30 %. Při použití 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  koncentrace inhibitoru, tedy stejné koncentrace, která byla použita v rámci experimentů této diplomové práce, nebyla detekována žádná aktivita enzymu z octomilky. Methylviologen, známý také pod komerčním názvem parakvat, je herbicid, u kterého byl potvrzen inhibiční účinek na lidskou GR (Krauth-Siegel *et al.*, 1996). U organické sloučeniny zlata auranofinu, která je známým inhibitorem lidské TrxR, byly pozorovány pouze slabé inhibiční účinky na DmTrxR (Gromer *et al.*, 1998; Kanzok *et al.*, 2001).

V této práci byla měřena nejvyšší specifická aktivita TrxR v hlavové části včely. Jelikož bylo měření provedeno u každého vzorku v technickém triplikátu pouze jednou, jedná se pouze o orientační výsledky. Po přidavku inhibitoru methylviologenu aktivita enzymu poklesla o 10-25 %. Lze tedy konstatovat, že methylviologen nefunguje jako inhibitor u včely medonosné, jak bylo předpokládáno na základě výsledků získaných u *D. melanogaster* ve studii podle Kanzok *et al.*, 2001. Z tohoto důvodu by bylo potřeba otestovat stanovení TrxR jinými metodami a ověřit specifitu známých inhibitorů.

### 5.2 Testování králičí polyklonální anti-GSNOR protilátky

V rámci diplomové práce byla testována králičí polyklonální anti-GSNOR protilátka připravená na zakázku firmou Moravian Biotechnology. Testování této protilátky probíhalo několik měsíců a bylo provedeno velké množství různých experimentů, v rámci výsledkové části této práce je uvedena pouze část experimentů, které měly zásadní význam v procesu optimalizace použití této protilátky. Jelikož tato protilátka nebyla u hmyzu prozatím testována, není možné porovnat získané výsledky s literaturou, proto byly pro diskuzi použity studie prováděné u rostlin.

Nejprve byl optimalizován přenos proteinů na membránu metodou semi-dry Western blotting. Byl optimalizován čas potřebný k přebílení proteinů na membránu, tak aby byl co nejkratší a dále bylo optimalizováno ředění extraktů, kdy jako nejvhodnější koncentrace proteinů ve vzorku bylo zvoleno rozmezí 500–1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . V rámci optimalizace metody byly také testovány dva blokační roztoky (1% a 5% roztok mléka v TBS pufru), kdy jako vhodnější byl zvolen roztok 5%. Stejný blokovací roztok byl použit pro imunodetekci GSNOR v rostlinných vzorcích v postupu podle Tichá *et al.*, 2018. Tento blokovací roztok byl dále používán u všech experimentů.

V rámci testování protilátky anti-GSNOR byly testovány protilátky připravené imunizací dvou králíků (králík č. 45 a č. 46) v jejich purifikované i nepurifikované podobě. Nejdříve bylo testováno nepurifikované sérum z obou králíků (ředění 1:1000) v kombinaci s použitím sekundární anti-králičí protilátky značené AP (1:1500). Na NC membráně (Obr. 12) po barvení roztokem NBT-BCIP můžeme v případě extraktů hlavy pozorovat pět výrazně zbarvených bandů, v případě hrudi jeden výrazně zbarvený band a u extraktů zadečku nebyly detekovány žádné bandy. GSNOR je dimerní protein, který se skládá ze dvou podjednotek o velikosti přibližně 40 kDa (Kubienová *et al.*, 2013b). Této velikosti by mohl odpovídat u extraktů z hlavy band s nejmenší molekulovou hmotností, odpovídající očekávané hodnotě pro AmGSNOR, avšak na membráně byly detekovány další nespecifické bandy, které byly zbarveny s podobnou intenzitou. Pravděpodobně tedy došlo k nespecifickým vazbám, které mohly být způsobeny například nedostatečným zablokováním membrány nebo tím, že použitá protilátka má nízkou specifitu k cílovému proteinu. Také došlo k přílišnému zbarvení pozadí membrány, což může být způsobeno tím, že membrána byla příliš dlouho inkubována s barvicím roztokem nebo byly protilátky použity v příliš vysoké koncentraci. V dalších experimentech s purifikovanou protilátkou byly membrány barveny kratší dobu a bylo postupně vyzkoušeno větší ředění použitých protilátek.

Při prvním testování purifikované protilátky z králíka č. 46 byla testována detekce GSNOR v extraktech z tělních částí včely na NC membráně. U primární protilátky bylo zvoleno počáteční ředění 1:1000 v kombinaci se sekundární anti-králičí protilátkou ředění 1:2500 (Obr. 14). U extraktů z hlav a hrudníků můžeme pozorovat velký počet slabě zbarvených bandů, u extraktů ze zadečků opět nebyly viditelné žádné bandy. Pozadí membrány bylo v porovnání s použitím nepurifikované protilátky (Obr. 12) slabší, ale stále velmi výrazné. Problémem mohla být vysoká koncentrace antigenu či použitých

protilátek. Ředění extraktů a primární i sekundární protilátky bylo proto dál optimalizováno.

I přesto, že bylo metodou Bradfordové stanoveno množství celkových proteinů ve všech extraktech a ředění bylo upraveno tak, aby byl obsah proteinů ve všech vzorcích nanášených na gely stejný, tak u extraktů zadečků byl u všech provedených experimentů problém, kdy po imunodetekci nebyly detekovány žádné bandy (Obr. 12 a 14) a proteiny nebyly na blotovací membráně detekovány barvením v Ponceau S (Obr. 11 a 13). Problém s extrakty ze zadečků byl pravděpodobně způsoben tím, že mohlo dojít k nepřesnému měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové, skutečná koncentrace proteinů ve vzorku tedy mohla mít mnohem nižší. Zároveň také mohou být hladiny tohoto enzymu v zadečkové části nízké.

V dalším experimentu bylo optimalizováno ředění extraktů hlav a hrudníků, bylo vyzkoušeno vyšší ředění použitých protilátek: primární purifikované protilátky 1:5000 a sekundární anti-králičí protilátky 1:10 000 a také bylo testováno blotování proteinů na PVDF membránu (Obr. 15). V tomto případě již není na membráně viditelné tak rušivé pozadí, což by mohlo souviset s použitím PVDF membrány či nižší koncentrací použitých protilátek. Jako nejvhodnější ředění extraktů bylo zvoleno ředění 20x (odpovídá koncentraci proteinů  $\sim 700 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

V rámci jednoho experimentu bylo testováno ředění purifikované primární (1:1000, 1:2500 a 1:5000) a sekundární (1:2500, 1:10 000) protilátky u obou typů membrán – NC i PVDF (Obr. 16-19). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s ředěním primární protilátky 1:5000, kdy je vidět, že má protilátka dobrou afinitu k cílovému proteinu. Co se týče ředění sekundární protilátky, tak byly bandy více viditelné při ředění 1:2500 u obou typů membrán. Při použití PVDF membrány v porovnání s NC membránou byly bandy ostřejší a výrazněji zbarvené. Důvodem může být rozdíl v hydrofobicitě povrchu membrány vůči cílovému proteinu. Uvádí se, že u PVDF membrán je výhodou vysoká vazebná kapacita proteinů a chemická stabilita (Kurien a Scofield, 2006).

Podle provedených experimentů bylo tedy jako nejvhodnější zvoleno ředění primární purifikované anti-GSNOR protilátky 1:5000, sekundární anti-králičí protilátky značené AP 1:2500 v kombinaci s použitím PVDF membrány a koncentrací proteinů ve vzorku  $\sim 700 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Podle studie Tichá *et al.*, 2018, ve které byla testována protilátka anti-GSNOR u rajčete (*Solanum lycopersicum*) byla použita primární králičí polyklonální anti-GSNOR protilátka v ředění 1:1000 a sekundární anti-králičí protilátka značená AP v ředění 1:5000.

Jako další byl proveden experiment, kdy bylo sledováno, jestli nedochází po redukci k zpětnému spojování proteinů v dimery či vyšší oligomery. Pro tento pokus byly připraveny tři různé varianty vzorku: vzorek redukovaný vzorkovacím pufrům s  $\beta$ -merkptoethanolem, vzorek redukovaný vzorkovacím pufrům a dodatečně redukovaný DTT a vzorek redukovaný vzorkovacím pufrům, DTT a následně alkylovaný jodoacetamidem. Po barvení gelu (Obr. 20) i po barvení membrány po imunodetekci (Obr. 21) je patrné, že separace proteinů na gelu proběhla u všech tří typů způsobů přípravy vzorku, což potvrdilo, že proteiny netvoří oligomery či vyšší adukty proteinů. Z toho důvodu lze konstatovat, že anti-GSNOR protilátka není úplně specifická.

### 5.3 Testování univerzální anti-NOS protilátky

Druhou testovanou protilátkou byla komerční univerzální protilátka anti-NOS od firmy Thermo-Fisher. Rozsah provedených experimentů byl omezen množstvím dostupné protilátky

V genomu včely medonosné byl identifikován jediný gen NOS, který byl charakterizován jako *AmNOS*. Zároveň byla u včel identifikována pouze jediná isoforma tohoto enzymu, která zastává indukovatelnou (toxickou), nebo konstitutivní (signální) funkci. Enzym je homodimerní a obsahuje čtyři vazebná místa pro kofaktory NADPH, FAD, FMN a  $BH_4$ . NOS je u včel lokalizovaný v imunitním a nervovém systému (Negri *et al.*, 2013). V rámci nervového systému je až 90 % veškeré aktivity NOS lokalizováno v mozku, především v neuronech, neurofilech a gliových buňkách (Bicker a Hähnlein, 1995).

V rámci testování protilátky bylo nejprve vyzkoušeno, jak bude daná protilátka reagovat s extrakty z hlaviček a hrudníků včel na NC membráně. Tyto extrakty byly ředěny stejným způsobem, jako extrakty u testování protilátky anti-GSNOR. V rámci jednoho experimentu bylo testováno ředění primární anti-NOS (1:1000, 1:2500 a 1:5000) a sekundární (1:2500, 1:10 000) protilátky značené AP. Po barvení membrány byly viditelné slabě zbarvené bandy odpovídající velikosti přibližně 150 kDa (Obr. 22). Stern *et al.*, 2010 ve své studii prováděné na embryích kobylek použili danou protilátku v ředění 1:1000. Následně byly detekovány bandy, které odpovídaly velikosti 132 kDa. Tato velikost odpovídala výsledkům získaným v předešlém experimentu prováděném na kobylkách (Knipp a Bicker, 2009). Podobných výsledků bylo dosaženo také u saranče pustinné (*S. gregaria*; 135 kDa; Elphick *et al.*, 1995) a lišaje tabákového

(*M. sexta*; 138 kDa; Nighorn *et al.*, 1998). U včel nebyla tato protilátka zatím testována, diplomová práce tedy poskytuje první informace o použití této protilátky proti NOS u včely medonosné.

Jako další byla testována metoda imunodetekce s využitím parafilmu, u které je výhodou menší spotřeba protilátky, mohlo být tedy testováno i menší ředění protilátky. V tomto experimentu bylo testováno ředění primární anti-NOS (1:500 a 1:1000) a sekundární (1:2500) protilátky značené AP i HRP. Pro sekundární protilátku značenou HRP byly vyzkoušeny dva způsoby detekce – barvení roztokem s 4-Cl-1-naftolem (Obr. 24) a chemiluminiscenční detekce (Obr. 25). Po barvení membrány roztokem NBT-BCIP (Obr. 23) bylo možné vidět pouze jeden slabě zbarvený band u ředění primární protilátky 1:500, odpovídající velikosti přibližně 150 kDa.

V případě sekundární protilátky značené HRP (Obr. 24 a 25) nebyly detekovány žádné bandy ani jedním ze dvou testovaných způsobů detekce. Podle Ni *et al.*, 2017 inhibuje Tween-20 reakci při použití barvicího roztoku s 4-Cl-1-naftolem. Způsob detekce pomocí tohoto barvicího roztoku je tedy mnohem méně citlivý v porovnání s chemiluminiscenční detekcí s využitím luminolu a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ni *et al.*, 2017). Důvodů, proč tyto způsoby detekce nefungovaly, může být několik. Problém mohl být například v nevhodném ředění sekundární protilátky značené HRP. Při provedení chemiluminiscenční detekce mohlo také dojít k použití substrátu s nesprávnou úrovní citlivosti.

Dalším problémem mohl být samotný přenos proteinů na membránu. Ni *et al.*, 2017 u metody semi-dry Western blotting uvádějí, že při použití 8-10% koncentrace dělicího gelu dochází k ~100% účinnosti přenosu proteinů o velikosti 14-66 kDa. Pro efektivní přenos proteinů o vyšší molekulové hmotnosti (až 150 kDa) je doporučována 5-7% koncentrace dělicího gelu. Z tohoto důvodu mohl být přenos neúplný, což by vysvětlovalo slabé zbarvení daného bandu.

Výrobce Thermo-Fisher udává, že pro Western blotting je vhodné použít tuto protilátku v ředění 1:500. Z výsledků dosažených v předchozích studiích (Calegari-Silva *et al.*, 2009; Stern *et al.*, 2010) i v této práci však vyplývá, že tato protilátka může být použita i v nižší koncentraci – ředění 1:1000, případně i 1:2500 v kombinaci se sekundární protilátkou značenou AP – ředění 1:2500.

## 5.4 Stanovení aktivity NOS a testování inhibitorů

V tělních částech včely medonosné byla metodou s DAN stanovena specifická aktivita NOS, měření bylo provedeno u každého vzorku v technickém triplicátu pouze jednou. Jedná se tedy pouze o orientační měření, kdy byla na vzorcích klinicky zdravých včel testována daná metoda. Podle získaných výsledků byla nejvyšší specifická aktivita NOS naměřena v zadečku. Tyto výsledky korelují s daty získanými v práci Kubný (2019), kdy byla v zadečkové části naměřena asi 10x vyšší aktivita NOS než v hlavové a hrudní části. Jelikož jsou střeva v neustálém kontaktu s nejrůznějšími mikroby z prostředí, tak by tato zvýšená aktivita NOS v zadečkové části mohla souviset s produkcí NO při imunitní odpovědi ve střevním epitelu (Imamura *et al.*, 2002).

Kubný ve své práci naměřil aktivitu NOS v zadečku včel  $\sim 58 \text{ pkat.mg}^{-1}$ . Zde je vidět velký rozdíl s výsledky získanými v této diplomové práci, kdy byla naměřena specifická aktivita pouze  $0,29 \text{ pkat.mg}^{-1}$ . Specifická aktivita NOS byla obecně ve všech tělních částech včely velmi nízká, což může být způsobeno přítomností DTT nebo jiných interferentů. Podle Cook *et al.* (1996) způsobují u fluorimetrické metody interferenci kromě DTT také kyselina askorbová a GSH, kdy přítomnost těchto látek v koncentracích vyšších než  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vedla až k 50% poklesu fluorescence. Měření by bylo vhodné zopakovat s využitím jiné metody.

Dále byly na vzorcích včelích hlav testovány inhibitory NOS – aminoguanidin, 7-nitroindazol, S-ethylisothiomočovina, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin a L-NAME o celkové koncentraci v reakci 1 a 2  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Aktivita inhibované reakce NOS byla měřena dvěma metodami – fluorimetrickou metodou s DAN a chemiluminiscenční metodou s využitím NO analyzátoru. Měření bylo provedeno u každé metody pro každou koncentraci inhibitoru pouze jednou, jedná se tedy pouze o orientační výsledky. Pro fluorimetrickou metodu s DAN je zapotřebí poměrně velký objem vzorku (pro každý vzorek v triplicátu 300  $\mu\text{l}$ ), což je v případě vzorků hmyzu – především včelích hlaviček problém. U chemiluminiscenční metody je výhodou menší spotřeba vzorku (30  $\mu\text{l}$  pro triplicát), avšak hladiny dusitanů se při měření blížily limitu detekce  $0,06 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , který uvádějí ve své práci Mito *et al.*, 2017. U chemiluminiscenční metody je také nevýhodou časová náročnost a pracnost. Ve výsledkové části jsou z tohoto důvodu uvedeny pouze výsledky z měření fluorimetrickou metodou. U této metody je uváděn detekční limit  $0,14 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Pro exaktní porovnání inhibičních účinků by bylo potřeba změřit hodnoty inhibiční konstanty ( $\text{IC}_{50}$ ) pro dané inhibitory s purifikovaným enzymem.

L-NAME byl již dříve popsán jako účinný inhibitor včelí NOS ve včelím mozku, kde byla stanovena 30-50% inhibice NOS při použití tohoto inhibitoru o koncentraci  $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$  (Müller, 1996). Jedná se o kompetitivní inhibitor, který soutěží o vazbu do aktivního místa s přirozeným substrátem L-argininem (Pokk a Väli, 2002). V rámci této práce byla aktivita NOS při použití obou koncentrací tohoto inhibitoru vyšší než aktivita kontrolní reakce. Pro vysvětlení tohoto pozorování by bylo potřeba provést další experimenty, nejlépe s purifikovaným enzymem.

U čtyř dalších inhibitorů testovaných v této práci byla pozorována inhibice včelí NOS. Müller (1996) popsal ve své studii 80-90% inhibici NOS ve včelím mozku při použití kompetitivního inhibitoru  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-argininu. S-ethylisothiomočovina byla potvrzena jako kompetitivní inhibitor lidské NOS, který se váže na hemovou doménu enzymu (Raman *et al.*, 2001). Aminoguanidin jako nespecifický inhibitor flavoproteinů byl popsán jako nekompetitivní inhibitor savčí iNOS, kde se váže na FAD skupinu enzymu (Farhad *et al.*, 2011). Také byla potvrzena inhibice savčí nNOS inhibitorem 7-nitroindazolem, který interaguje s vazebným místem pro L-arginin a  $\text{BH}_4$  (Schulz *et al.*, 1995; Wegener a Volke, 2010).

Je známo, že isoformy NOS u obratlovců vykazují substrátovou stereospecifitu vůči isomeru L-argininu (Xu *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1998). Předpokládá se, že NOS bezobratlých má stejné vlastnosti (Bredt a Snyder, 1990). V rámci měření této diplomové práce došlo při nahrazení substrátu L-argininu jeho isomerem D-argininem k poklesu aktivity včelí NOS na 22 % v porovnání s reakcí s L-argininem. Podle předpokladu by aktivita měla být nulová, to však pozorováno nebylo. Těchto 22 % však nemusí odpovídat aktivitě enzymu NOS. Může se jednat o nespecifický signál nebo NO může například vznikat neenzymovou reakcí D-argininu s ROS, jako je  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chambers a Ayres, 2001). K dalšímu testování by například bylo vhodné otestovat měření aktivity NOS stanovením vznikajícího L-citrulinu metodou LC-MS.

## 5.5 Detekce GSNOR u octomilky a včel infikovaných viry

Purifikovaná protilátka anti-GSNOR byla využita pro detekci GSNOR ve vzorcích včelích hlav infikovaných viry z USA – kontrola bez vpichu, včely infikované DWV a CBPV a včely injektované PBS a také pro detekci GSNOR u vzorků celých těl dospělců octomilky.



U vzorků včelích hlaviček došlo opět ke zbarvení tří bandů o podobné intenzitě zbarvení, stejně jako u předchozích experimentů provedených na extraktech z hlav u klinicky zdravých včel. Tyto výsledky nejsou v souladu s výsledky získanými měřením aktivity GSNOR, kdy byla pozorována zvýšená specifická aktivita GSNOR u infikovaných včelstev. Na základě toho by měl být band odpovídající GSNOR výrazněji zbarvený u vzorků infikovaných viry, tedy H4-H9, což zde pozorováno není (obsah proteinů byl u všech vzorků stejný). Mezi jednotlivými skupinami podle typu ošetření vzorků jsou určité rozdíly, ale tyto rozdíly jsou také u jednotlivých včelstev v rámci jedné skupiny.

Při testování protilátky na extraktech z octomilek došlo ke zbarvení 4 bandů, odpovídajícím molekulovým hmotnostem ~40-55 kDa. Tyto výsledky tedy opět potvrzují značnou nespecifitu dané protilátky, která není takovým problémem u metody Western blotting v rozsahu experimentů pro diplomovou práci, ale například pro kvantifikaci metodou ELISA nebo imunohistochemickou detekci proteinů tato protilátka nebude vhodná bez další purifikace.

## 5.6 Stanovení aktivity GSNOR

Byla stanovena specifická aktivita GSNOR u octomilek, v tělních částech klinicky zdravých včel a ve vzorcích včelích hlaviček z USA (kontrola, včely infikované DWV, včely infikované CBPV a včely injektované PBS). Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena ve vzorcích včel infikovaných viry. Na základě těchto orientačních výsledků lze konstatovat, že aktivita GSNOR se zvyšuje v odpovědi na přítomnost patogenů. V literatuře bylo prozatím popsáno zapojení tohoto enzymu v odpovědi na přítomnost patogenů pouze u savců, člověka nebo rostlin (Salgado *et al.*, 2013). Podle této dostupné literatury by se exprese i aktivita GSNOR měla v odpovědi na přítomnost patogenů zvyšovat, což by z důvodu zachování vysoké konzervace enzymu od bakterií až po člověka mělo platit také u hmyzu (Liu *et al.*, 2001). Homem (2015) ve své disertační práci popsal úlohu GSNOR v imunitní odpovědi octomilky obecné a uvádí, že v odpovědi na přítomnost patogenů dochází ke zvýšení aktivity GSNOR. Aktivita byla v této práci měřena u kmene *Drosophila* divokého typu Oregon a pak u jedinců, u kterých byl gen *GSNOR* vyřazen metodou CRISPR (*gsnor*<sup>-/-</sup>).

U jedinců bez GSNOR pak byly pozorovány vyšší hladiny RSNO než u divokého typu. Po infekci vyvolané bakteriálním patogenem došlo ke zvýšení S-nitrosylace

proteinů pouze u jedinců divokého typu, což naznačuje souvislost tohoto procesu v imunitní odpovědi na infekci. To by mohlo souviset s regulací aktivity dNOS. V dostupné literatuře se uvádí, že S-nitrosylace může vyvolávat monomerizaci lidské eNOS, což vede k inhibici její aktivity (Ravi *et al.*, 2004). Je proto možné, že vyšší hladiny RSNO u *gsnor*<sup>-/-</sup> octomilek inhibují další tvorbu NO pomocí dNOS v odpovědi na infekci a zabraňují tak další S-nitrosylaci proteinů. U těchto jedinců pak byla pozorována zvýšená náchylnost k infekci a také menší odolnost k nitrosačnímu stresu vyvolanému donorem NO – nitroprusidem sodným. NO uvolněný z tohoto donoru je zachycen GSH za vzniku GSNO. Vzhledem k nedostatku GSNOR aktivity pak dochází k akumulaci GSNO a zvýšení hladiny celkových RSNO, což zvyšuje škodlivé účinky nitroprusidu sodného u *gsnor*<sup>-/-</sup> jedinců (Homem, 2015).

Kubný (2019) ve své práci uvádí výsledky, kdy při injekci PBS došlo k nárůstu aktivity NOS a GSNOR o 30-40 % oproti kontrole a u včel vystavených bakteriím byl pozorován 60-70% nárůst specifické aktivity.

## 6 Závěr

Byla zpracována diplomová práce na téma funkce oxidu dusnatého v signálních drahách vrozené imunity hmyzu. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše znalostí o funkci NO v imunitě hmyzu se zaměřením na úlohu NO v interakcích hmyzu s patogeny. V experimentální části byly na vzorcích včely medonosné a octomilky obecné testovány metody stanovení aktivity enzymů, byly studovány změny metabolismu NO při vystavení včel modelovým patogenům. Hlavní metodou experimentální části této práce byla metoda Western blotting s následnou imunochemickou detekcí proteinů, kdy byly testovány dvě protilátky – králičí polyklonální anti-GSNOR protilátka připravená na zakázku a komerční univerzální anti-NOS protilátka.

Z dosažených výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Byly optimalizovány podmínky pro imunochemickou detekci proteinů s využitím purifikované anti-GSNOR protilátky, kdy nejlepší výsledky byly dosaženy při ředění této protilátky 1:5000, sekundární anti-králičí protilátky značené AP 1:2500 v kombinaci s použitím PVDF membrány a koncentrací proteinů ve vzorku  $\sim 700 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .
- Při testování této protilátky na vzorcích hmyzu bylo zjištěno, že protilátka není úplně specifická – může být použita pro metodu Western blotting, ale nebude vhodná pro kvantitativní stanovení proteinů metodou ELISA nebo imunohistochemickou detekci proteinů.
- Dále byla testována komerční univerzální anti-NOS protilátka na vzorcích hmyzu. Na základě výsledků tohoto testování lze konstatovat, že daná protilátka může být použita v ředění 1:1000, případně i 1:2500 v kombinaci se sekundární protilátkou značenou AP ředěnou 1:2500.
- Bylo provedeno výchozí orientační testování metody stanovení aktivity TrxR v extraktech těl včel
- Byl potvrzen inhibiční účinek inhibitorů živočišných NOS aminoguanidinu, 7-nitroindazolu, S-ethylisothiomočoviny a  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-argininu pravděpodobně na aktivitu včelí NOS.

- Při nahrazení substrátu L-argininu jeho isomerem D-argininem došlo k poklesu aktivity včelí NOS na 22 % v porovnání s reakcí s L-argininem, tento naměřený signál nemusí odpovídat aktivitě enzymu NOS, NO může například vznikat neenzymovou reakcí D-argininu s ROS.
- Specifická aktivita GSNOR v extraktech hlav včel se zvyšuje v odpovědi na infekci virovými patogeny, změny na úrovni aktivity enzymu však nebyly potvrzeny imunochemickou detekcí na úrovni proteinu GSNOR.

Tyto získané výsledky mohou být dále využity k dalšímu zkoumání zapojení NO v imunitním systému hmyzu.

## Seznam citované literatury

- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593-615.
- Arbouzova N.I., Ziedler M.P. (2006): JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *The Company of Biologists* **133**, 2605-2616.
- Arnér E.S., Holmgren A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* **267**, 6102-6109.
- Arscott L.D., Gromer S., Schirmer R.H., Becker K., Williams C.H. (1997): The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**, 3621-3626.
- Barroso J.B. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**(8), 1785-1793.
- Bauer H., Kanzok S.M., Schirmer R.H. (2002): Thioredoxin-2 but not Thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 17457-17463.
- Bauer H., Gromer S., Urbani A., Schnolzer M., Schirmer R.H., Müller H.M. (2003): Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *European Journal of Biochemistry* **270**, 4272-4281.
- Becker K., Gromer S., Schirmer R.H., Müller S. (2000): Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *European Journal of Biochemistry* **267**, 6118-6125.
- Beinke S., Ley S.C. (2004): Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal* **382**(2), 393-409.
- Benhar M., Forrester M.T., Hess D.T., Stamler J.S. (2008): Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050-1054.
- Benhar M., Forrester M.T., Stamler J.S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 721-732.
- Berger H., De Mia M., Morisse S., Marchand C.H., Lemaire S.D., Wobbe L., Kruse O. (2016): A Light Switch Based on Protein S-Nitrosylation Fine-Tunes Photosynthetic Light Harvesting in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* **171**, 821-832.
- Bicker G., Hähnlein I. (1995): NADPH-diaphorase expression in neurones and glial cells of the locust. *Neuroreport* **6**, 325-328.
- Bogdan C. (2015): Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology* **36**, 161-178.
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N. (2002): Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental Cell* **3**, 711-722.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bredt D.S., Snyder S.H. (1990): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 682-685.
- Brogden K.A. (2005): Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**(3), 238-250.
- Broniowska K., Diers A.R., Hogg N. (2013): S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173-3181.
- Brutscher L.M., Daughenbaugh K.F., Flenniken M.L. (2015): Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 71-82.
- Calegari-Silva T.C., Pereira R.M.S., De-Melo L.D.B., Saraiva E.M., Soares D.C., Bellio M., Lopes U.G. (2009): NF- $\kappa$ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunology Letters* **127**(1), 19-26.
- Carton Y., Frey F., Nappi A.J. (2009): Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila paramelanica*. *International Journal for Parasitology* **95** 1134-1141.

- Chambers D.C., Ayres J.G. (2001): Effect of nebulised L- and D-arginine on exhaled nitric oxide in steroid naive asthma. *Thorax* **56**(8), 602-606.
- Choe K.M., Werner T., Stoven S., Hultmark D., Anderson K.V. (2002): Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* **296**, 359-362.
- Choi S.K., Choi H.K., Kadono-Okuda K., Taniai K., Kato Y., Yamamoto M., Chowdhury S., Xu J., Miyanoshita A., Debnath N.C., Asaoka A., Yamakawa M. (1995): Occurrence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**, 452-459.
- Cook J.A., Kim S.Y., Teague D. (1996): Convenient Colorimetric and Fluorometric Assays for S-Nitrosothiols. *Analytical Biochemistry* **238**, 150-158.
- Cooper E.L. (2006): Comparative immunology. *Integrative zoology* **1**, 32-43.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., LaMattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3339-3349.
- Crotty J. (2009): Crystal Structures and Kinetics of S-Nitrosoglutathione Reductase From *Arabidopsis thaliana* and Human. Ph.D. thesis, The University of Arizona, Tuscon, AZ.
- Dacher M., Gauthier M. (2008): Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. *Physiology and Behavior* **95**, 200-207.
- Danihlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, **54**(2), 123-136.
- Danihlík J., Petřivalský M. (2015): Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* **65**, 434-431.
- Davies S.A., Huesmann G.R., Maddrell S.H.P., O'Donnell M.J., Skaer N.J.V., Dow J.A.T., Tublitz N.J. (1995): CAP2b, a cardioacceleratory peptide, is present in *Drosophila* and stimulates tubule fluid secretion via cGMP. *American Journal of Physiology* **269**, 1321-1326.
- Davies S.A. (2000): Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**(12), 1123-1138.
- del Río L.A. (2015): ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2827-2837.
- Delaney J.R., Stöven S., Uvell H., Anderson K.V., Engström Y., Mlodzik M. (2006): Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *The EMBO Journal* **25**, 3068-3077.
- Dong C., Davis R.J., Flavell R.A. (2002): MAP kinases in the immune response. *Annual Review in Immunology* **20**, 55-72.
- Dow J.A.T., Maddrell S.H.P., Davie, S.A., Skaer N.J.V., Kaiser K. (1994): A novel role for the nitric oxide/cyclic GMP signalling pathway: the control of fluid secretion in *Drosophila*. *American Journal of Physiology* **266**, 1716-1719.
- Eckenroth B.E., Rould M.A., Hondal R.J., Everse S.J. (2007): Structural and biochemical studies reveal differences in the catalytic mechanisms of mammalian and *Drosophila melanogaster* thioredoxin reductases. *Biochemistry* **46**, 4694-4705.
- Eleftherianos I., Xu M., Yadi H., Ffrench-Constan R.H., Reynolds S.E. (2009): Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defences against bacterial infection. *Journal of Experimental Biology* **212**, 1840-1848.
- Eleftherianos I., More K., Spivack S., Paulin E., Khojandi A., Shukla S. (2014): Nitric Oxide Levels Regulate the Immune Response of *Drosophila melanogaster* Reference Laboratory Strains to Bacterial Infections. *Infection and Immunity* **82**, 4169-418.
- Elphick M.R., Rayne R.C., Riveros-Moreno V., Moncada S., O'Shea M. (1995): Nitric oxide synthesis in locust olfactory interneurons. *Journal of Experimental Biology* **198**, 821-829.
- Estonius M., Svensson S., Höög J.O. (1996): Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Letters* **397**, 338-342.
- Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.

- Farhad A.R., Razavi S.M., Nejad P.A. (2011): The use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide on periapical healing. *Dental Research Journal* **8**, 197-202.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 8054-8059.
- Foley E., O'Farrell P.H. (2003): Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development* **17**, 115-125.
- Forrester M.T. (2009): Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nature Biotechnology* **27**, 555-557.
- Forstermann U., Boissel J.P., Kleinert H. (1998): Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB journal* **12**, 773-790.
- Foster M.W., McMahon T.J., Stamler J.S. (2003): S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 160-168.
- Fu C., Wu C., Liu T., Ago T., Zhai P., Sadoshima J., Li H. (2009): Elucidation of thioredoxin target protein networks in mouse. *Molecular and Cellular Proteomics* **8**, 1674-1687.
- Gibbs S.M., Truman J.W. (1998): Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe in *Drosophila*. *Neuron* **20**, 83-93.
- Girvan H.M., Munro A.W. (2016): Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology* **31**, 136-145.
- Gliński Z. (2001): Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta* **36**(1), 12-24.
- Goldstein S., Merenyi G. (2008): The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity. *Methods in Enzymology* **436**, 49-61.
- Gromer S., Arscott L.D., Williams C.H., Schirmer R.H., Becker K. (1998): Human Placenta Thioredoxin Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **273**(32), 20096-20101.
- Hall A.V., Antoniou H., Wang Y., Cheung A.H., Arbus A.M., Olson S.L., Lu W.C., Kau C.L., Marsden P.A. (1994): Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (*NOS1*). *Journal of Biological Chemistry* **269**, 33082-33090.
- Hancock R.E.W., Chapple D.S. (1999): Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(6), 1317-1323.
- Hedengren M., Asling B., Dushay M.S., Ando I., Ekengren S., Wihlborg M., Hultmark D. (1999): Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Molecular Cell* **4**, 827-837.
- Hillyer J., Estévez-Lao T. (2010): Nitric oxide is an essential component of the hemocyte-mediated mosquito immune response against bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* **34**, 141-149.
- Holmgren A., Bjornstedt M. (1995): Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* **252**, 199-208.
- Homem R.A. (2015): Redox signalling and innate immunity: a role for protein S-nitrosylation in the immune response of *Drosophila melanogaster*. Ph.D. thesis, University of Edinburgh, Edinburgh, Skotsko.
- Höög J.O., Ostberg L.J. (2011): Mammalian alcohol dehydrogenases: a comparative investigation at gene and protein levels. *Chemico-Biological Interactions* **191**, 2-7.
- Hovemann B.T., Sehlmeier F., Malz J. (1997): *Drosophila melanogaster* NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: pronounced expression in antennae may be related to odorant clearance. *Gene* **189**, 213-219.
- Huang H.H., Arscott L.D., Ballou D.P., Williams C.H. (2008): Acid-Base catalysis in the mechanism of thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **47**, 1721-1731.
- Igaki T., Kanda H., Yamamoto-Goto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., Miura M. (2002): Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *The EMBO Journal* **21**, 3009-3018.
- Imamura M., Yang J., Yamakawa M. (2002): cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology* **11**, 257-265.

- Inamdar A.A., Bennett J.W. (2014): A common fungal volatile organic compound induces a nitric oxide mediated inflammatory response in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports* **4**, 3833.
- Ishii K., Adachi T., Hamamoto H., Oonishi T., Kamimura M., Imamura K., Sekimizu K. (2013): Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Developmental and Comparative Immunology* **39**, 147-153.
- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biological functions and importance of protein S-nitrosation. *Chemické listy* **107**, 350-355.
- Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2019): S-Nitrosogluthione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants* **8**(2), 48.
- Jedelská T., Luhová L., Petřivalský M. (2020): Thioredoxins: Emerging Players in the Regulation of Protein S-Nitrosation in Plants. *Plants* **9**(11), 1426.
- Kanost M.R., Gorman M.J. (1993): Insect immunology. In: Phenoloxidases in insect immunity, San Diego Academic Press 69-96.
- Kanzok S.M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J.K., Muller H.M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R.H., Becker K. (2001): Substitution of the Thioredoxin System for Glutathione Reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **291**, 643-646.
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implication in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* **15**, 280-294.
- Khush R.S., Leulier F., Lemaitre B. (2001): *Drosophila* immunity: two paths to NF- $\kappa$ B. *Trends in Immunology* **22**, 260-264.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G.J., Spoel S.H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153-162.
- Knipp S., Bicker G. (2009): Regulation of enteric neuron migration by the gaseous messenger molecules CO and NO. *Development* **136**, 85-93.
- Kolbert Zs, Barroso J.B., Brouquisse R., Corpas F.J., Gupta K.J., Lindermayr C., Loake G.J., Palma J.M., Petřivalský M., Wendehenne D., Hancock J.T. (2019): A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide* **93**, 53-70.
- Komarov D.A., Slepneva I.A., Dubovskiy I.M., Grizanova E.A., Khramtsov V.V., Glupov V.V. (2006): Generation of superoxide radical and hydrogen peroxide in insect hemolymph in the course of immune response. *Doklady Biological Sciences* **41**, 482-485.
- Kopp E.B., Medzhitov R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **11**, 13-18.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013a): S-Nitrosogluthione Reductase: The Key Enzyme Regulator of S-nitrosylation. *Chemické Listy* **107**, 202-208.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche Roselyne., Luhová Lenka., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013b): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthione reductase in plants. *Planta* **239**, 139-146.
- Kubný J. (2019): Enzymy biosyntézy a metabolismu reaktivních forem dusíku v imunitních odpovědích včel. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Kurien B., Scofield R. (2006): Western blotting. *Methods* **38**(4), 283-293.
- Krauth-Siegel R.L., Muller J.G., Lottspeich F., Schirmer R.H. (1996). Glutathione Reductase and Glutamate Dehydrogenase of *Plasmodium Falciparum*, The Causative Agent of Tropical Malaria. *European Journal of Biochemistry* **235**, 345-350.
- Laver J.R., Stevanin T.M., Read R.C. (2008): Chemiluminescence quantification of NO and its derivatives in liquid samples. *Methods in Enzymology* **436**, 113-127.
- Lavine M.D., Strand M.R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**(10), 1295-1309.
- Lemaitre B., Meister M., Govind S., Georgel P., Steward R., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1995): Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **14**, 536-545.



- Lemaitre B., Hoffmann J. (2007): The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**, 697-743.
- Lennon B.W., Williams C.H., Jr., Ludwig M.L. (2000): Twists in catalysis: Alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* **289**, 1190-1194.
- Li Y., Xi Ang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**(2), 207-215.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Lourenco A.P., Florecki M.M., Simões Z.L.P., Evans J.D. (2018): Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. *Insect Molecular Biology* **27**, 577-589.
- Luckhart S., Vodovotz Y., Cui L., Rosenberg R. (1998): The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 5700-5705.
- Luckhart S., Rosenberg R. (1999): Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* **232**, 25-34.
- Luthman M., Holmgren A. (1982): Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: Purification and characterization. *Biochemistry* **21**, 6628-6633.
- Manjon C., Troczka B.J., Zaworra M., Beadle K., Randall E., Hertlein G., Singh K.S., Zimmer C.T., Homem R.A., Lueke B., Reid R., Kor L., Kohler M., Benting J., Williamson M.S., Davies T.G.E., Field L.M., Bass C., Nauen R. (2018): Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology* **28**, 1137-1143.
- Marmaras V.J., Lampropoulou M. (2009): Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signaling* **21**, 186-195.
- Martinez M.C., Achkor H., Persson B., Fernandez M.R., Shafqat J., Farres J., Jornvall H., Pares X. (1996): Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase-Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849-857.
- McMenamin A.J., Daughenbaugh K.F., Parekh F., Pizzorno M.C., Flenniken M.L. (2018): Honey bee and bumble bee antiviral defense. *Viruses* **10**, 395-416.
- Meng X., Khanuja B.S., Ip Y.T. (1999) Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- $\kappa$ B factor. *Genes & Development* **13**, 792-797.
- Michel T., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., Royet J. (2001) *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**, 756-759.
- Miles A.M., Wink D.A., Cook J.C., Grisham M.B. (1996): Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology* **268**, 105-120.
- Mioto P.T., Rodriguez-Ruiz M., Mot A.C., Zuccarelli R., Corpas J.F., Freschi L., Mercier H. (2017): Alternative fluorimetric-based method to detect and compare total S-nitrosothiols in plants. *Nitric Oxide* **68**, 7-13.
- Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D., Moore W.M., Currie M.G. (1993): A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples. *Analytical Biochemistry* **214**, 11-16.
- Mitchell D.A., Marletta M.A. (2005): Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nature Chemical Biology* **1**, 154-158.
- Moore K.P., Mani A.R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods in Enzymology* **359**, 256-268.
- Moreno E., Yan M., Basler K. (2002): Evolution of TNF signaling mechanisms. JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Current Biology* **12**, 1263-1271.
- Morin-Poulard I., Vincent A., Crozatier M. (2013): The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. *JAK-STAT* **2**, e25700.
- Müller U. (1994): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Nitric Oxide Synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience* **6**, 1362-1370.

- Müller U. (1996): Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron* **16**, 541-549.
- Mur L.A., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K.H., Gupta K.J. (2013): Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* **5**, 52-56.
- Negri P., Maggi M.D., Corea-Aragunde N., Brascosco C., Eguaras M.J., Lamattina L. (2013): Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self-recognition. *Apidologie* **44**, 575-585.
- Negri P., Quintana S., Maggi M., Szawarski N., Lamattina L., Eguaras M. (2014): *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. *Apidologie*, **45**, 610-617.
- Negri P., Ramirez L., Quintana S., Szawarski N., Maggi M.D., Conte L.Y., Lamattina L., Eguaras M.J. (2017): Dietary supplementation of honey bee larvae with arginine and abscisic acid enhances nitric oxide and granulocyte immune responses after trauma. *Insects* **8**, 1-8.
- Ni D., Xu P., Gallagher S. (2017): Immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology* **114**, 1-37.
- Nighorn A., Gibson N.J., Rivers D.M., Hildebrand J.C., Morton D.B. (1998): The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *The Journal of Neuroscience* **18**, 7244-7255.
- Nishinaka Y., Masutani H., Nakamura H., Yodoi J. (2001): Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Report* **6**, 289-295.
- Nussler A.K, Billiar T.R. (1993): Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology* **54**, 171-178.
- Otvos L., Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P. (2000): Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**(46), 14150-14159.
- Pellicena-Palle A., Stitzinger S.M., Salz H.K. (1997): The function of the *Drosophila* thioredoxin homologue encoded by the deadhead gene is redox-dependent and blocks the initiation of development but not DNA synthesis. *Mechanisms of Development* **62**, 61-65.
- Pokk P., Väli M. (2002): Effects of nitric oxide synthase inhibitors 7-NI, L-NAME, and L-NOARG in staircase test. *Archives of medical research* **33**, 265-268.
- Raman C. S., Li H., Martásek P., Babu B. R., Griffith O. W., Masters B. S. S., Poulos T. L. (2001): Implications for isoform-selective inhibitor design derived from the binding mode of bulky isothioureas to the heme domain of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26486-26491.
- Ramet M., Manfruelli P., Pearson A., Mathey-Prevot B., Ezekowitz R.A. (2002): Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**, 644-648.
- Ravi K., Brennan L.A., Levic S., Ross P.A., Black S.M. (2004): S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(8), 2619-2624.
- Regulski M., Tully T. (1995): Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 9072-9076.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G.E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant Cell* **19**, 3170-3193.
- Reynaert N.L., Ckless K., Korn S.H., Vos N., Guala A.S., Wouters E.F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y.M. (2004): Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 8945-8950.
- Rivero A. (2006): Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology* **22**, 219-225.

- Rizza S., Filomeni G. (2017): Chronicles of a reductase: Biochemistry, genetics and physiopathological role of GSNOR. *Free Radical Biology and Medicine* **110**, 19-30.
- Sadekuzzaman M.D., Stanley D., Yonggyun K. (2017): Nitric Oxide Mediates Insect Cellular Immunity via Phospholipase A2 Activation. *Journal of Innate Immunity* **10**, 70-81.
- Sadekuzzaman M., Kim Y. (2018): Nitric oxide mediates antimicrobial peptide gene expression by activating eicosanoid signalling. *PLoS ONE* **13**.
- Salgado I., Carmen Martínez M., Oliveira H.C., Frungillo L. (2013): Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Brazilian Journal of Botany* **36**(2), 89-98.
- Sandalova T., Zhong L., Lindqvist Y., Holmgren A., Schneider G. (2001): Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 9533-9538.
- Savvides S.N., Scheiwein M., Bohme C.C., Arteel G.E., Karplus P.A., Becker K., Schirmer R.H. (2002): Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2779-2784.
- Schmidt H.H., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z.S., Cunningham D.D., Feelisch M. (1996): No NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **25**, 14492-14497.
- Schulz J.B., Matthews R.T., Muqit M.M., Browne S.E., Beal M.F. (1995): Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Journal of Neurochemistry* **64**, 936-939.
- Semenova A.D., Glazachev Y.I., Slepneva I.A., Glupov V.V. (2014): Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: Nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Nitric Oxide* **37**, 46-52.
- Sengupta R., Ryter S.W., Zuckerbraun B.S., Tzeng E., Billiar T.R., Stoyanovsky D.A. (2007): Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-Nitrosothiols. *Biochemistry* **46**, 8472-8483.
- Sengupta R., Holmgren A. (2012): The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1820**, 689-700.
- Staab C.A., Hellgren M., Höög J.O. (2008a): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950-3960.
- Staab C.A., Ålander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R.C., Höög J. (2008b): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal* **413**, 493-504.
- Stern M., Böger N., Eickhoff R., Lorbeer C., Kerksen U., Ziegler M., Bicker G. (2010): Development of nitrenergic neurons in the nervous system of the locust embryo. *The Journal of Comparative Neurology* **518**, 1157-1175.
- Stoven S., Ando I., Kadalayil L., Engstrom Y., Hultmark D. (2000): Activation of the *Drosophila* NF- $\kappa$ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *The EMBO Reports* **1**, 347-352.
- Sun S.C., Faye I. (1995): Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diminished by thiol reagents. *European Journal of Biochemistry* **231**, 93-98.
- Svensson M.J., Chen J.D., Pirrotta V. (2003): The ThioredoxinT and deadhead gene pair encode testis- and ovary-specific thioredoxins in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **112**, 133-143.
- Svensson M.J., Larsson J. (2007): Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila*. *Hereditas* **144**, 25-32.
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.
- Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2000): Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 10520-10525.

- Tichá T., Činčalová L., Kopečný D., Sedlářová M., Kopečná M., Luhová L., Petřivalský M. (2017): Characterization of S-nitrosogluthathione reductase from *Brassica* and *Lactuca* spp. and its modulation during plant development. *Nitric Oxide* **68**, 68-76.
- Tichá T., Luhová L., Petřivalský M. (2018): Immunodetection of S-Nitrosogluthathione Reductase Protein in Plant Samples. *Nitric Oxide*, 267-280.
- Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M.K. (2004): Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **4**, 227-237.
- Underhill D.M., Ozinsky A. (2002): Toll-like receptors: Key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* **14**, 103-110.
- Vaandrager A.B., De Jonge H.R. (1996): Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Molecular and Cellular Biochemistry* **157**, 23-30.
- Valenzuela J.G., Walker F.A., Ribeiro, J.M. (1995): A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *Journal of Experimental Biology* **198**, 1519-1526.
- Vidal S., Khush R.S., Leulier F., Tzou P., Nakamura M., Lemaitre B. (2001): Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of I $\kappa$ B-dependent innate immune responses. *Genes & Development* **15**, 1900-1912.
- Vincendeau P., Gobert A. P., Daulouède S., Moynet D., Djavad Mossalayi M. (2003): Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology* **19**, 9-12.
- Wang P.F., Arscott L.D., Gilberger T.W., Müller S., Williams C.H., Jr. (1999): Thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*: evidence for interaction between the C-terminal cysteine residues and the active site disulfide-dithiol. *Biochemistry* **38**, 3187-3196.
- Wegener G., Volke V. (2010): Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals* **3**, 273-299.
- Weidinger A., Kozlov A. (2015): Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **5**, 472-484.
- Williams C.H., Arscott L.D., Müller S., Lennon B.W., Ludwig M.L., Wang P.F., Veine D.M., Becker K., Schirmer R.H. (2000): Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry* **267**, 6110-6117.
- Wink D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R., Eshenaur S.C., Nims R.W. (1993): Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 115-123.
- Xia Y., Roman L.J., Masters B.S.S., Zweier J.L. (1998): Inducible Nitric-oxide Synthase Generates Superoxide from the Reductase Domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**(35), 22635-22639.
- Xu Z., Li P., Tong C., Figueroa J., Tobin J.R., Eisenach J.C. (1996): Location and Characteristics of Nitric Oxide Synthase in Sheep Spinal Cord and Its Interaction with  $\alpha$ 2-Adrenergic and Cholinergic Antinociception. *Anesthesiology* **84**(4), 890-899.
- Yuda M., Hirai M., Miura K., Matsumura H., Ando K., Chinzei Y. (1996): cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhoniuss prelixus*. *European Journal of Biochemistry* **242**, 807-812.
- Zhong L., Holmgren A. (2002): Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 18121-18128.
- Zor T., Selinger Z. (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* **236**, 302-308.
- Zweier J.L., Samouilov A., Periannan K. (1999): Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 250-262.

## Seznam použitých zkratek

AA/BIS	Akrylamid/bisakrylamid
ADH	Alkoholdehydrogenasa
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AgTrx	Thioredoxin z <i>Anopheles gambia</i>
AMP	Antimikrobiální peptidy
AP	Alkalická fosfatasa
APS	Persíran amonný
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BmNOS	NO synthasa <i>Bombyx mori</i>
BSA	Hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBPV	Virus chronické paralýzy včel
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
cNOS	Konstitutivní NO synthasa
DAN	2,3-diaminonaftalen
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DmTrxP	Thioredoxinperoxidasa <i>Drosophily</i>
DmTrxR	Thioredoxinreduktasa <i>Drosophily</i>
dNOS	NO synthasa <i>Drosophily</i>
dTAK1	Kinasa TAK 1 <i>Drosophily</i>
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT	Dithiotreitol
DWV	Virus deformovaných křídel
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina
eNOS	Endoteliální NO synthasa
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
G <sup>±</sup>	Grampozitivní/gramnegativní
GR	Glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GSONH <sub>2</sub>	Glutathionsulfinamid

GSOOH	Glutathionsulfinová kyselina
GSNHOH	N-hydroxysulfinamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	Glutathiondisulfid
HEPES	Kyselina [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonová
HMGS	S-hydroxymethylglutathion
HRP	Křenová peroxidasa
IC <sub>50</sub>	Inhibiční konstanta 50 (koncentrace inhibitoru, při níž enzym dosahuje 50% aktivity vůči reakci neinhibované)
iNOS	Indukovatelná NO synthasa
JAK	Janusova kinasa
JNK	Jun N-terminální kinasa
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginin methylester
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadeninukleotid oxidovaný
NADH	Nikotinamidadeninukleotid redukovaný
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadeninukleotid fosfát oxidovaný
NADPH	Nikotinamidadeninukleotid fosfát redukovaný
NADPHd	NADPH diaforasa
NF-κB	Jaderný faktor kappa B
NK	Negativní kontrola
nNOS	Neuronální NO synthasa
NOS	NO synthasa
PAMPs	Molekulární struktury typické pro povrch patogenů
PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PDE	Fosfodiesterasa
PGRP	Peptidoglykan rozpoznávající proteiny
PKG	cGMP-závislé proteinkinasy
PVDF	Polyvinylidendifluoridová membrána
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNS	Reaktivní formy dusíku

RO•	Peroxylový radikál
ROONO	Alkylperoxynitrit
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNO	S-nitrosothiol
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
sGC	Rozpustná guanylátcyklasa
STAT	Převodníky signálu a aktivátory transkripčních proteinů
TBS	Fyziologický roztok pufovaný Tris
TBS-T	Roztok Tweenu v TBS
TEMED	Tetramethyldiamin
TNB	5-thionitrobenzoová kyselina
Trx	Thioredoxin
TrxP	Thioredoxinperoxidasa
TrxR	Thioredoxinreduktasa
YW	Yellow-White kmen bakterií