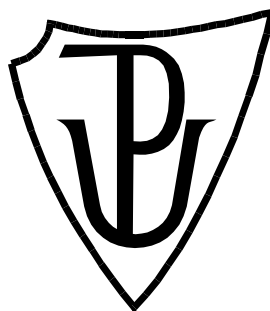


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Enzymy biosyntézy a metabolismu reaktivních forem dusíku v imunitních odpovědích včel**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Jakub Kubný</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.</b>
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen 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 .....

Děkuji svému školiteli doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, trpělivost, za poskytnutí potřebné literatury a za rady při zpracování experimentální a teoretické části diplomové práce. Děkuji Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. rovněž za cenné rady, pomoc během experimentální části a za poskytnutý materiál. Děkuji také kolektivu Katedry Biochemie za cenné rady a pomoc během celého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jakub Kubný
Název práce	Enzymy biosyntézy a metabolismu reaktivních forem dusíku v imunitních odpovědích včel
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty současné znalosti o funkci oxidu dusnatého (NO) a reaktivních forem dusíku (RNS) ve včelím metabolismu a imunitním systému. Jsou popsány enzymové i neenzymové mechanismy vzniku NO, jeho přímé reakce a reakce RNS. Popsány jsou rovněž interakce NO se signálními dráhami, které vedou k syntéze antimikrobiálních peptidů (AMPs) u hmyzu a včel. V teoretické části práce jsou také popsány biochemické a molekulárně biologické metody analýzy enzymů NO synthasy (NOS; EC 1.14.13.39) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR; EC 1.1.1.284).

Experimentální část byla zaměřená na zavedení metod analýzy genové exprese a enzymové aktivity NOS a GSNOR ve vzorcích včely medonosné (*Apis mellifera carnica*). Hodnota  $K_m$  včelí NOS byla stanovena  $3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota  $K_m$  včelí GSNOR byla stanovena  $85,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hodnota  $IC_{50}$  pro GSNOR inhibitor N6022 byla stanovena  $82,7 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Potvrzena byla dále závislost aktivity včelí NOS na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a inhibice enzymové aktivity vybranými inhibitory živočišných NOS. Substrátová specifita včelí NOS pro L-arginin byla potvrzena stanovením aktivity enzymu s využitím D-argininu. Metodou qPCR byla stanovena exprese genů *NOS*, *GSNOR*, *ESTERASY JUVENILNÍHO HORMONU (JHE)* a *VITELLOGENINU*. Exprese byla měřena u larev vystavených různým dávkám spor *Paenibacillus larvae* a u včel infikovaných směsnou kulturou bakterií *P. larvae* a *Escherichia coli*. U včel i larev bylo pozorováno zvýšení aktivity NOS a GSNOR v odpovědi na patogeny. Exprese *NOS* a *GSNOR* byla zvýšena v odpovědi na patogeny pouze u včelích larev. U larev nebyla hladina exprese *JHE* závislá na počtu spor *P. larvae* a *VITELLOGENIN* nebyl exprimován, zatímco u dospělých včel byla exprese *JHE* a *VITELLOGENINU* snížena. Hladiny S-nitrosothiolů (RSNOs) u včel nebyly použitými metodami detekovány. Výsledky této práce přinášejí první ucelený pohled na molekulární úrovni na zapojení těchto genů a enzymů u včel.

Klíčová slova	<i>Apis mellifera</i> , imunitní systém hmyzu, NO synthasa, oxid dusnatý, <i>Paenibacillus larvae</i> , S-nitrosoglutathionreduktasa, včela medonosná
Počet stran	82
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jakub Kubný
Title	Enzymes of biosynthesis and metabolism of reactive nitrogen species in honey bee immune responses
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2019

### Abstract

The theoretical part summarizes information concerning the function of nitric oxide (NO) and reactive nitrogen species (RNS) in metabolism and the immune system of honey bee. The enzymatic and non-enzymatic mechanisms of NO formation, its reactions and RNS interactions are described. NO interactions with signaling pathways that lead to the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs) are also described. Finally, biochemical and molecular biology methods of NO synthase (NOS; EC 1.14.13.39) and S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR; EC 1.1.1.284) analysis are described.

The experimental part was focused to introduction of methods of gene expression analysis and enzyme activity of NOS and GSNOR in honey bee samples (*Apis mellifera carnica*).  $K_m$  value of bee NOS was  $3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  and  $K_m$  value of bee GSNOR was determined to be  $85,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . The  $\text{IC}_{50}$  value for the GSNOR inhibitor N6022 was determined to be  $82,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Furthermore, the dependence of the bee NOS activity on the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions was confirmed, as well as the inhibition of enzyme activity by selected animal NOS inhibitors. The substrate specificity of bee NOS for L-arginine was confirmed by determining activity using D-arginine as a substrate. The expression of *NOS*, *GSNOR*, *JUVENILE HORMONE ESTERASE (JHE)* and *VITELLOGENIN* genes was determined by qPCR. Gene expression was measured in bee larvae exposed to various doses of spores of *Paenibacillus larvae* and in bees infected with a mixed culture of *P. larvae* and *Escherichia coli*. Increased NOS and GSNOR activities were observed in bees and larvae in response to pathogens. Expression of *NOS* and *GSNOR* genes was increased in response to pathogens only in bee larvae. In larvae, *JHE* expression levels were not dependent on doses of *P. larvae* spores and *VITELLOGENIN* was not expressed at all, whereas in adult bees the expression of *JHE* and *VITELLOGENIN* was reduced. S-nitrosothiols (RSNOs) levels were not detected by the used methods. These results bring the first comprehensive view of the involvement of these genes and enzymes in bees at the molecular level.

Keywords	<i>Apis mellifera</i> , insect immune system, NO synthase, <i>Paenibacillus larvae</i> , S-nitrosogluthathione reductase, honey bee
Number of pages	82

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	1
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	3
2.1 Reaktivní formy dusíku .....	3
2.1.1 Oxid dusnatý .....	3
2.1.2 Tvorba NO .....	5
2.1.3 Enzymová tvorba NO.....	5
2.1.3.1 NO synthasa .....	5
2.1.3.1.1 Neuronální, inducibilní a endoteliální NO synthasa.....	7
2.1.3.1.2 Hmyzí NO synthasa .....	7
2.1.3.2.1 Lokalizace a funkce hmyzí NO synthasy .....	8
2.1.3.2.2 Včelí NO synthasa .....	9
2.1.4 Neenzymová tvorba NO .....	9
2.2 Metabolismus NO a RNS u hmyzu .....	10
2.2.1 Přímé reakce NO .....	11
2.2.1.1 Reakce mezi NO a kovovými komplexy.....	11
2.2.1.2 Reakce NO s oxokomplexy a volnými radikály.....	12
2.2.2 Reakce reaktivních forem dusíku.....	13
2.2.3 Posttranslační modifikace proteinů prostřednictvím RNS.....	15
2.2.3.1 Enzymy katalyzující odbourání RSNOs .....	16
2.2.4 Propojení reakčních mechanismů RNS s ROS .....	17
2.3 Funkce NO a S-nitrosylace v imunitě hmyzu a včel .....	18
2.3.1 Signální dráhy zapojené v imunitě hmyzu.....	20
2.3.1.1 Signální dráha Toll .....	21
2.3.1.1.1 S-nitrosylace a signální dráha Toll .....	22
2.3.1.1.2 Signální dráha Imd .....	23
2.3.1.1.3 Propojení NO se signální dráhou Toll a Imd.....	24
2.3.1.1.4 Signální dráha JAK/STAT .....	25
2.3.2 Funkce NO a RNS v hmyzím imunitním systému.....	25
2.3.3 Včelí imunitní systém .....	26
2.3.3.1 Funkce NO a RNS ve včelím imunitním systému .....	27
2.4 Metody analýzy NOS a GSNOR .....	28
2.4.1 Biochemické metody analýzy NOS a GSNOR.....	28
2.4.2 Molekulárně biologické metody analýzy NOS a GSNOR .....	30

<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	31
3.1 Materiál.....	31
3.1.1 Použité kity .....	31
3.1.2 Chemikálie .....	31
3.1.3 Biologický materiál.....	31
3.1.3.1 Včela medonosná .....	31
3.2 Přístrojové vybavení .....	32
3.3 Experimentální metody.....	33
3.3.1 Extrakce vzorků .....	33
3.3.1.1 Extrakce vzorků pro stanovení $\text{NO}_2^-$ a $\text{NO}_3^-$ .....	33
3.3.1.2 Extrakce vzorků pro měření aktivity NOS .....	33
3.3.1.3 Extrakce vzorků pro měření aktivity GSNOR .....	34
3.3.2 Příprava činidel pro použité metody .....	34
3.3.2.1 Příprava oxyhemoglobinu .....	34
3.3.2.2 Příprava S-nitrosoglutathionu .....	34
3.3.3 Spektrofotometrické metody.....	35
3.3.3.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradforda .....	35
3.3.3.2 Stanovení koncentrace $\text{NO}_2^-$ a $\text{NO}_3^-$ Griessovou metodou.....	35
3.3.3.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity NOS .....	36
3.3.3.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR.....	38
3.3.4 Stanovení aktivity NOS pomocí NO analyzátoru .....	38
3.3.5 Stanovení koncentrace RSNOs pomocí NO analyzátoru.....	40
3.3.6 Metody analýzy genové exprese .....	41
3.3.6.1 Roztoky použité v rámci PCR metody .....	41
3.3.6.2 Izolace RNA ze vzorků .....	41
3.3.6.3 Kontrola integrity RNA.....	43
3.3.6.4 Přepis RNA do cDNA prostřednictvím reverzní transkriptasy .....	43
3.3.6.5 Endpoint PCR reakce pro kontrolu přepisu.....	44
3.3.6.6 První fáze qPCR .....	44
3.3.6.7 Druhá fáze qPCR.....	45
3.3.6.8 Měření účinnosti přisedání primerů .....	46
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	47
4.1 Stanovení celkových proteinů .....	47
4.2 Stanovení kinetických parametrů NOS .....	47
4.2.1 Stanovení $K_m$ včelí NOS .....	47

4.2.2 Aktivita včelí NOS po přidavku inhibitorů a D-argininu .....	48
4.3 Stanovení kinetických parametrů GSNOR.....	50
4.3.1 Stanovení $K_m$ včelí GSNOR .....	50
4.3.2 Stanovení $IC_{50}$ inhibitoru N6022 .....	50
4.4 Imunizace včel vede ke zvýšené aktivitě NOS.....	51
4.4.1 Imunizace včel vede ke zvýšené koncentraci $NO_2^-$ .....	51
4.5 Změny exprese a aktivity NOS a GSNOR ve včelích larvách infikovaných bakteriálním patogenem <i>P. larvae</i> .....	54
4.6 Změny exprese a aktivity NOS a GSNOR u dospělých včel vystavených bakteriím.....	57
4.7 Analýza hladiny RSNOs v extraktech včel .....	59
<b>5 DISKUZE</b> .....	60
5.1 Kinetické parametry včelí NOS.....	60
5.2 Kinetické parametry včelí GSNOR .....	61
5.3 Imunizace včel vede ke zvýšené aktivitě NOS a koncentraci $NO_2^-$ .....	62
5.4 Expresa a aktivita GSNOR a NOS včelích larev infikovaných bakterií <i>P. larvae</i> .....	63
5.4.1 Spory <i>P. larvae</i> zvyšují expresi <i>NOS</i> a <i>GSNOR</i> .....	64
5.4.2 Spory <i>P. larvae</i> zvyšují aktivitu NOS a GSNOR .....	65
5.5 Expresa a aktivita GSNOR a NOS v dospělých včelách infikovaných bakteriálními patogeny .....	65
5.5.1 Bakterie minimálně zvyšují expresi včelí <i>NOS</i> a <i>GSNOR</i> .....	65
5.5.2 Bakterie významně zvyšují aktivitu včelí NOS a GSNOR.....	66
5.5.3 Bakterie významně snižují expresi <i>JHE</i> a <i>VITELLOGENINU</i> u dospělých včel.....	67
5.6 Hladina RSNOs u včel byla pod mezí detekce.....	68
<b>6 ZÁVĚR</b> .....	69
<b>7 LITERATURA</b> .....	71
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	80



## **CÍLE PRÁCE**

Vypracovat rešerši na téma metabolismus NO u včely medonosné (*Apis mellifera*) se zaměřením na klíčové enzymy biosyntézy a metabolismu reaktivních forem dusíku (RNS), včetně přehledu metod jejich studia.

Zavedení metod analýzy genové exprese a enzymové aktivity NO synthasy (NOS; EC 1.14.13.39) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR; EC 1.1.1.284) ve vzorcích včel.

Studium funkce NOS a GSNOR v signálních drahách včel v různých stádiích vývoje na modelové patogenní podněty a aktivaci složek imunitního systému.

# 1 ÚVOD

V roce 1998 získali Furchgott, Ignarro a Murad Nobelovu cenu za práci na úloze oxidu dusnatého (NO) jako signalizační molekuly. Objev následně spustil vědecký zájem tuto molekulu studovat. Mnoho nových článků následně ukázalo široký rozsah tělesných funkcí, které jsou NO řízeny. Již několik let je známo, že NO funguje u obratlovců jako obranná molekula proti infekci způsobené virem, bakteriemi a parazity. Nové poznatky ukazují, že NO zastává stejnou roli u bezobratlých (Rivero, 2006).

V živých organismech NO vzniká enzymovou a neenzymovou cestou. Při acidických podmínkách vzniká NO z dusitanů ( $\text{NO}_2^-$ ). Tento proces je zesílen v rámci silně redukčního prostředí. Nitrosací vzniklé S-nitrosothioly (RSNOs) představují další významný zdroj NO (Zweier *et al.*, 1999; Jahnová *et al.*, 2013). Enzymově NO vzniká činností NOS. Daný enzym katalyzuje pětielektronovou konverzi L-argininu na L-citrulin. Daná přeměna čítá dvě postupné monooxygenásové reakce a vyžaduje celkem čtyři kofaktory: flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP) a tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) (Griffith a Stuehr, 1995).

NO u hmyzu funguje jako signální a cytotoxická molekula. Cytotoxicita NO je připisována především jeho schopnosti interagovat s atomy a ionty železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) v aktivních místech klíčových enzymů. NO je jako signální molekula produkován v odpovědi na napadení různými patogeny a parazity a hraje centrální roli v signalizaci obranných mechanismů. Signalizace skrze NO a další signální dráhy vede k expresi antimikrobiálních peptidů (AMPs; Negri *et al.*, 2017).

Hmyz je všeobecně důležitý pro stabilitu ekosystémů, včely pak pro hospodářskou funkci krajiny, ke které přispívají opylováním. Opylování je důležité pro stabilitu výnosu mnoha plodin, oproti tomu mnoho biotických a abiotických stresorů ovlivňuje zdraví včel, působí jako imunosupresory a přispívají ke zhoršení zdravotního stavu včelích kolonií, právě proto stále roste počet a význam studií, jejichž cílem je zlepšovat schopnosti včel čelit hrozbám těchto stresorů (Negri *et al.*, 2017).

Včela medonosná (*A. mellifera*) má několik linií vrozené imunity, které ji chrání před parazity a patogeny. První obrannou linií tvoří fyzikální a chemické bariéry, které znemožňují zachycení a průnik infekčních částic do včelího těla. Jakmile parazit či patogen překoná fyzikální a chemické bariéry, dochází k aktivaci buněčných

a humorálních imunitních odpovědí. Dané odpovědi představují druhou a třetí obrannou linii (Gliński a Jarosz, 2001).

Momentálně je o funkcích NO v imunitním systému včely medonosné známo pouze několik málo informací. NO vzniká ve včelích hemocytech, střevu a tukovém tělese v odpovědi na přítomnost bakteriálních lipopolysacharidů (LPS; Negri *et al.*, 2017). NO se u včel podílí na aktivaci imunitního systému. NO se dále podílí na humorální a buněčné imunitě, v jejichž rámci reguluje imunitní odpovědi, ovlivňuje náchylnost k patogenům, bakteriím a omezuje rozvoj parazitů (Negri *et al.*, 2013; Sadekuzzaman a Kim, 2018).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Reaktivní formy dusíku

Volné radikály lze definovat jako molekuly či molekulární fragmenty obsahující jeden a více nepárových elektronů v atomových či molekulárních orbitalech. Právě tyto nepárové elektrony určují stupeň reaktivity volných radikálů (Miller *et al.*, 1990). Křehká rovnováha mezi prospěšnými a škodlivými účinky volných radikálů je udržována procesem redoxní regulace, který chrání organismy před oxidativním stresem a udržuje redoxní rovnováhu (Dröge, 2002).

Reaktivní formy dusíku (RNS) se společně s reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) účastní fyziologických a patologických pochodů. Vyskytují-li se ROS a RNS v nízkých koncentracích, zastávají důležitou roli v buněčných procesech, např. v rámci signálních drah či v obraně proti infekcím, aby radikály plnily svou fyziologickou roli, musí být jejich koncentrace udržována na nízké hladině (Valko *et al.*, 2006). Hladina ROS a RNS je regulována např. NOS, NADPH-oxidase (EC1.6.3.1), katalasou (CAT, EC 1.11.1.6) a superoxidodismutase (SOD; EC 1.15.1.1). Nadprodukce RNS a ROS následně vede k oxidativnímu a nitrosativnímu stresu, během kterého může dojít k poškození buněčných struktur, membrán, lipidů, proteinů a DNA (Valko *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2017).

#### 2.1.1 Oxid dusnatý

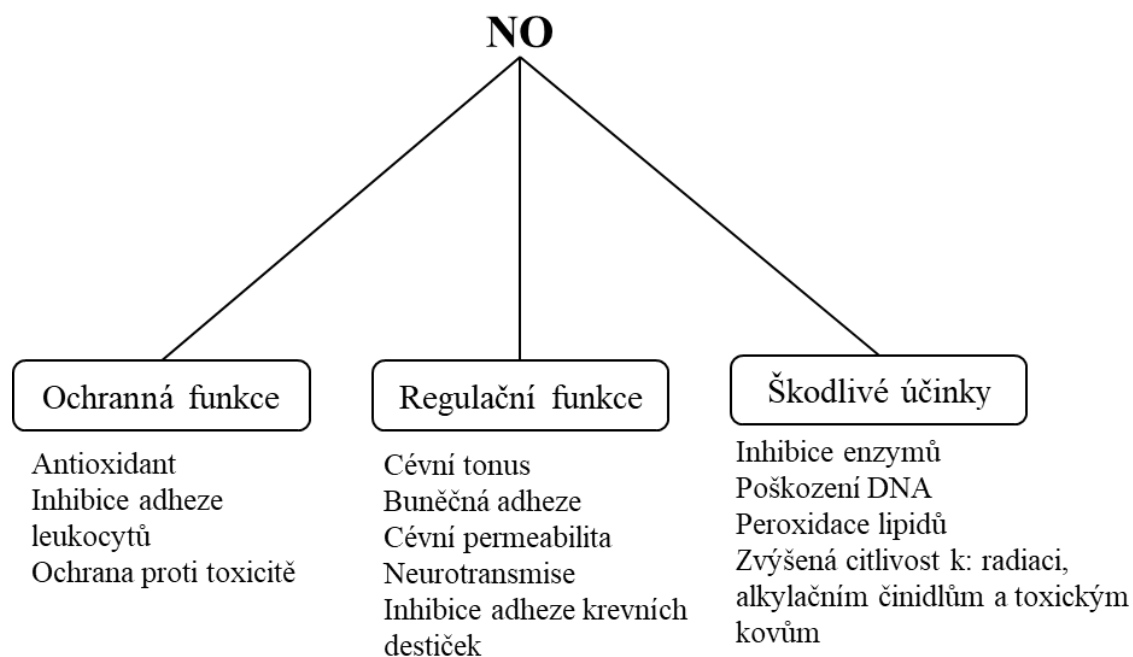
NO je malá molekula, která je díky přítomnosti nepárového elektronu na  $2\pi^*$  protivazebném orbitalu řazená mezi radikály. NO je v živých systémech produkován specifickými NOS, které metabolizují L-arginin na L-citrulin za vzniku NO. Stabilita NO závisí na prostředí, ve kterém se nachází, např. ve vodném prostředí je jeho doba života pouze několik sekund, větší stabilitu molekula jeví v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku ( $O_2$ ), kde je jeho doba života delší než 15 sekund. NO je rozpustný v polárním i nepolárním prostředí, snadno difunduje přes membrány a v extracelulárním prostředí reaguje s  $O_2$  za tvorby  $NO_2^-$  a dusičnanových aniontů ( $NO_3^-$ ; Bogdan, 2015).

Chemii NO v biologických systémech lze rozdělit do dvou kategorií. První kategorie zahrnuje reakce NO s biologickými molekulami, ve kterých je koncentrace NO nižší než  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Druhá kategorie zahrnuje reakce způsobené RNS, k nimž dochází při koncentraci NO vyšší než  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do této kategorie se řadí nitrosační, nitrační a oxidační reakce (Wink a Mitchel, 1998). Oxidační reakce zahrnují odstranění 1-2 elektronů ze substrátu. Nitrosační reakce představuje adici  $NO^+$  na thiolovou, amino

či hydroxy skupinu. Příkladem nitrosace je reakce  $\text{NO}^+$  s thiolovou skupinou peptidů za vzniku S-nitrosothiolů (RSNOs). Nitrace je adice  $\text{NO}_2^+$  k aromatické skupině, jako příklad lze uvést nitraci tyrosinu (Beckman *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2009; Jahnová *et al.*, 2013).

$\text{NO}$  může dále reagovat se superoxidovým aniontem ( $\text{O}_2^-$ ) za vzniku peroxynitritového aniontu ( $\text{ONOO}^-$ ). Vzniklé produkty následně reagují s jinými biologickými cíli a ovlivňují fyziologické a buněčné funkce (Wink a Mitchel, 1998).  $\text{NO}$  se také snadno váže na určité ionty přechodných kovů, důležitá je např. jeho vazba s  $\text{Fe}^{2+}$  hemové skupiny rozpustné guanylátcyklasy (sGC, EC 4.6.1.2; Archer, 1993; Wareham *et al.*, 2018).

$\text{NO}$  zastává roli v širokém spektru fyziologických procesů, včetně neurotransmise, regulace krevního tlaku, obranných mechanismů, relaxace hladkého svalstva a imunitních reakcí (Obr. 1). V rámci patofyziologie je  $\text{NO}$  zapojen v různých onemocněních, jako je např. artritida, ateroskleróza, rakovina, cévní mozková příhoda a infarkt myokardu.  $\text{NO}$  sice může způsobit poškození tkání, inhibovat enzymovou aktivitu, poškodit DNA a indukovat lipidovou peroxidaci, i přesto je však schopen chránit buňky před poškozením způsobeným cytokiny a před apoptózou (Wink a Mitchel, 1998; Ghimire *et al.*, 2017).



Obr. 1 Rozdělení a charakterizace funkcí, které  $\text{NO}$  zastává v živých organismech (upraveno podle Wink a Mitchel, 1998; Wareham *et al.*, 2018).

## 2.1.2 Tvorba NO

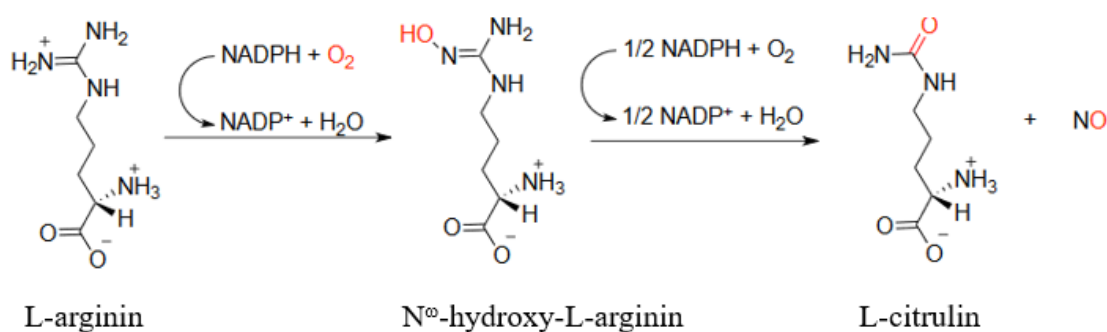
Molekula NO vzniká *in vivo* prostřednictvím enzymu NOS. U savců se rozlišují celkem tři isoformy tohoto enzymu, prvním typem je neuronální NOS (nNOS), druhým typem je inducibilní NOS (iNOS) a třetím typem je endoteliální NOS (eNOS). Isoformy nNOS a eNOS dohromady tvoří třídu označovanou jako konstitutivní NOS (cNOS). Skupina cNOS je konstitutivně přítomná v buňce, je aktivována influxem vápníku a jeho následnou vazbou na kalmodulinový receptor. Isoforma iNOS je exprimována až po rozpoznání specifického signálu. NO může vznikat i neenzymově redukcí  $\text{NO}_2^-$  na NO v kyselém a silně redukčním prostředí (Griffith a Stuehr, 1995; Zweier *et al.*, 1999; Bogdan, 2015).

## 2.1.3 Enzymová tvorba NO

Všechny isoformy NOS využívají L-arginin jako substrát,  $\text{O}_2$  a redukovaný NADP (NADPH) slouží jako kosubstráty. Enzymová přeměna čítá dvě postupné monooxygenasové reakce a vyžaduje FAD, FMN, NADP a  $\text{BH}_4$  jako kofaktory. V prvním kroku dochází ke dvouelektronové oxidaci NADPH a guanidinového dusíku, NADPH v reakci slouží jako donor dvou elektronů, danou reakcí vzniká  $\text{N}^\omega$ -hydroxy-L-arginin (Obr. 2), ve druhém kroku NADPH poskytuje pouze jeden elektron a oximová skupina  $\text{N}^\omega$ -hydroxy-L-argininu podléhá tříelektronové oxidaci za vzniku L-citrulinu a NO (Griffith a Stuehr, 1995; Bogdan, 2015).

### 2.1.3.1 NO synthasa

V roce 1991 byla odhalena struktura nNOS z potkaního mozku, ze sekvence cDNA odpovídající danému enzymu byla stanovena jeho molekulární hmotnost na 160 kDa (Bredt *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2016).

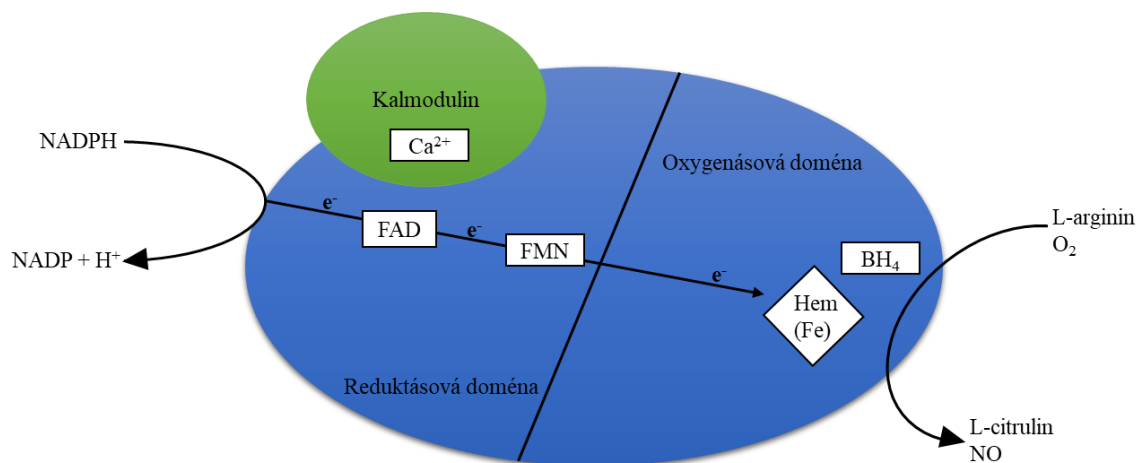


Obr. 2 Schéma dvoustupňové enzymové tvorby NO katalyzované enzymem NOS (upraveno podle Griffith a Stuehr, 1995).

Charakterizována byla následně jak iNOS s molekulární hmotností 130 kDa, tak eNOS s molekulární hmotností 133 kDa (Bogdan, 2015). Isoformy nNOS a iNOS postrádají aminokyselinové sekvence specifické pro vazbu k membráně, a proto jsou tyto enzymy přítomné v rozpustné části buněčných či tkáňových homogenátů. Isoforma eNOS je naopak vázána k endoteliální buněčné membráně (Griffith a Stuehr, 1995).

NOS je homodimerní enzym, který je složen z oxygenásové a reduktásové domény a obsahuje čtyři vazebná místa pro kofaktory FAD, FMN, NADPH a BH<sub>4</sub> (Obr. 3). Všechny NOS dále obsahují hem a vazebné místo pro kalmodulin. V průběhu reakce jsou elektrony přeneseny z NADPH přes FAD a FMN na C-koncovou reduktásovou doménu, dále jsou elektrony přeneseny přes hemovou skupinu až na oxygenásovou doménu, která váže BH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> a L-arginin (Förstermann a Sessa, 2012).

Vazba kalmodulinu k NOS je podmíněná zvýšenou koncentrací Ca<sup>2+</sup> iontů, se zvyšující se afinitou kalmodulinu k NOS vzrůstá následně schopnost toku elektronů z NADPH v reduktásové doméně na hem v oxygenásové doméně. Isoformy eNOS a nNOS dosahují své poloviční aktivity při 200-400 nmol·l<sup>-1</sup> koncentraci intracelulárních Ca<sup>2+</sup> iontů, naopak na iNOS se kalmodulin váže již při extrémně nízké koncentraci Ca<sup>2+</sup> iontů (40 nmol·l<sup>-1</sup>), a to díky odlišné aminokyselinové struktuře vazebného místa pro kalmodulin (Hemmens a Mayer, 1998; Alderton *et al.*, 2001; Piazza *et al.*, 2015).



Obr. 3 Mechanismus reakce katalyzované enzymem NOS společně s přítomnými kofaktory (upraveno podle Alderton *et al.*, 2001).

### **2.1.3.1.1 Neuronální, inducibilní a endoteliální NO synthasa**

Isoforma nNOS je konstitutivně exprimována v mozkových neuronech, vedle mozkové tkáně byla nNOS detekována v míše, nadledvinách, buňkách epitelu a v pankreatických ostrůvcích. Enzym je zapojen ve fyziologických funkcích jako je učení, tvorba paměti či neurogeneze. Je dokázáno, že inhibitory NOS zhoršují učení a mohou způsobit amnézii u zvířecích modelů. Abnormální signalizace skrze nNOS vede k různorodým neurodegenerativním onemocněním, jako je např. excitotoxicita následovaná mrtvicí, Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Holscher a Rose, 1992; Förstermann a Sessa, 2012).

Isoforma iNOS není za normálních podmínek exprimována, k její expresi dochází až po její indukci prostřednictvím bakteriálních LPS a cytokinů. Aktivita exprimované iNOS je poté konstantní a nezávislá na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. (Nathan a Hibbs, 1991; Lind *et al.*, 2017). Po aktivaci NOS v makrofázích vzniká značné množství NO, které působí cytotoxicky. Cytotoxicita spočívá ve vysoké afinitě NO k proteinovému železu a v následné inhibici klíčových proteinů, které v jejich katalytickém centru obsahují atomy železa. Mezi tyto klíčové proteiny patří např. složky komplexů I a II zapojené v mitochondriálním dýchacím řetězci, dále ribonukleotidreduktasa (EC 1.17.4.1), nebo akonitasa (EC 4.2.1.3) zapojená v citrátovém cyklu (Nathan a Hibbs, 1991; Cui *et al.*, 2019). NO ve vysokých koncentracích dále interferuje s molekulou DNA a může způsobit její rozpad a fragmentaci. V rámci patofyziologie nemusí vysoká koncentrace NO působit toxicky pouze proti nežádoucím mikrobům, parazitům či nádorovým buňkám, ale může poškodit i zdravé buňky. Toxicky působí jak samotný NO, tak ONOO<sup>-</sup> vzniklý reakcí NO s O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nathan a Hibbs, 1991; Wink *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015).

Isoforma eNOS je nejvíce exprimována v buňkách endotelu, v menším množství se nachází v srdečních myocytech, bílých krvinkách a v mozkových neuronech. Aktivita enzymu je regulována intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, vedle  $\text{Ca}^{2+}$  iontů existuje i několik proteinů schopných interagovat s eNOS, např. heat shock protein 90 (hsp90) funguje jako alosterický modulátor enzymové aktivity (Lange *et al.*, 2009).

### **2.1.3.2 Hmyzí NO synthasa**

V 90. letech 20. století byla NOS charakterizována u několika hmyzích druhů. Bylo zjištěno, že hmyzí isoforma sdílí řadu vlastností s cNOS isoformou popsanou



u obratlovců. Dále byla popsána signální role enzymu, díky jeho schopnosti syntetizovat NO v odpovědi na zvýšenou hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Původní práce naznačily zapojení NOS ve zpracování čichových a vizuálních informací, při tvorbě dlouhodobé paměti a v produkci proteinů označovaných jako nitroforiny. Nitroforiny obsahují NO a usnadňují krmení u hematofágního hmyzu (Elphick *et al.*, 1993; Ribeiro a Nussenzveig, 1993; Rivero, 2006). Následně byla popsána role NOS v indukci buněčné a humorální imunity hmyzu (Choi *et al.*, 1995; Nappi *et al.*, 2000). Charakterizována byla také inducibilní forma enzymu, která např. u komára rodu *Anopheles* (*Anopheles*) limituje rozvoj parazita *Plasmodium berghei* skrze inducibilní tvorbu NO (Luckhart *et al.*, 1998). Všechny tyto studie dokázaly, že u hmyzu NOS a NO zastávají podobné funkce jako u obratlovců (Luckhart a Rosenberg, 1999; Rivero, 2006).

NOS (DmNOS) purifikována z mozku hmyzího modelového organismu octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) má molekulovou hmotnost 152 kDa. Enzym svými vlastnostmi odpovídá homologu izolovaného z mozku obratlovců. Isoforma DmNOS vykazuje nejvyšší homologii se savčí nNOS (43% identita) a obsahuje vazebná místa pro FMN, FAD, NADPH a kalmmodulin. Isoforma DmNOS je podobně jako savčí nNOS a eNOS regulována  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulinovým komplexem. Samotný enzym neobsahuje na N-konci oblast pro myristylaci a neobsahuje transmembránovou doménu (Regulski a Tully, 1995). Enzym svými kinetickými vlastnostmi ( $K_m = 2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $V_{\text{max}} = 1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) rovněž odpovídá homologu izolovanému z mozků obratlovců (Bredt a Snyder, 1994; Regulski a Tully, 1995; Colasanti a Venturini, 1998).

### **2.1.3.2.1 Lokalizace a funkce hmyzí NO synthasy**

Hmyzí NOS se podle své lokalizace dělí do dvou skupin. První skupina zahrnuje NOS lokalizovanou v nervovém systému, naopak druhá skupina čítá NOS zapojenou v hmyzím imunitním systému.

NOS zapojená v nervového systému hmyzu byla původně charakterizována v mozku včely medonosné (*A. mellifera*), octomilky obecné (*D. melanogaster*) a sarančete pustinného (*Schistocerca gregaria*; Müller, 1997). V rámci nervového systému je až 90 % veškeré aktivity NOS lokalizováno v mozku, především v neuronech, neuropilech a gliových buňkách (Bicker a Hähnlein, 1995). V hmyzím nervovém systému existuje vedle  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní NOS také NOS nezávislá na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , která představuje 5-10 % z celkové aktivity NOS (Müller, 1994). Hlavním cílem NO v rámci

nervového systému hmyzu je sGC. NO aktivuje sGC prostřednictvím jeho vazby s hemovou skupinou enzymu. Vazbou následně dochází ke změně konformace enzymu. Aktivní sGC katalyzuje přeměnu guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), který následně aktivuje nejméně tři skupiny enzymů, tj. proteinkinasy závislé na cGMP, iontové kanály řízené cyklickým nukleotidem a fosfodiesterasy regulované cGMP (Müller, 1997).

Druhým místem lokalizace NOS je hmyzí imunitní systém, ve kterém se daný enzym nachází především v Malpighiho trubicích a v tukovém tělese. V tukovém tělese a Malpighiho trubicích je lokalizována LPS inducibilní  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní NOS, která vyžaduje přítomnost 4 kofaktorů, tj. FAD, FMN, NADPH a  $\text{BH}_4$  (Choi *et al.*, 1995). NOS je dále přítomná v hmyzích hemocytech, které lze považovat za ekvivalent savčích krvinek. Hemocyty zajišťují fagocytózu, degranulaci a enkapsulaci (Conte a Ottaviani, 1995). NOS je v hemocytech aktivována LPS, gramnegativními a grampozitivními bakteriemi (Weiske a Wiesner, 1999).

#### **2.1.3.2.2 Včelí NO synthasa**

V genomu včely medonosné (*A. mellifera*) byl identifikován jediný gen pro NOS. Gen byl charakterizován jako *AmNOS*. Rovněž byla identifikována pouze jediná isoforma enzymu NOS, která zastává buď konstitutivní (signální), nebo inducibilní (toxickou) roli. Enzym je homodimerní a obsahuje čtyři vazebná místa pro kofaktory NADPH, FAD, FMN a  $\text{BH}_4$ . NOS je lokalizovaný ve včelím nervovém a imunitním systému (Negri *et al.*, 2013). Včely poskytují cenný model pro studium procesu učení z důvodu, že kombinují snadno dostupný nervový systém se schopností se učit. Tvorba paměti u včel souvisí s aktivitou enzymu NOS, a proto jsou funkce NOS ve včelím nervovém systému dobře popsány. Ve včelím nervovém systému se nachází  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní NOS (Dacher a Gauthier, 2008). Stejný enzym je lokalizován ve včelím imunitním systému, a to především ve včelích střevech a hemocytech (Negri *et al.*, 2014). Při studiu včelí NOS byly charakterizovány její inhibitory:  $\text{N}^{\text{O}}$ -nitro-L-arginin (L-NNA) a  $\text{N}^{\text{O}}$ -nitro-L-arginin-methylester (L-NAME) (Müller, 1994; Negri *et al.*, 2015).

#### **2.1.4 Neenzymová tvorba NO**

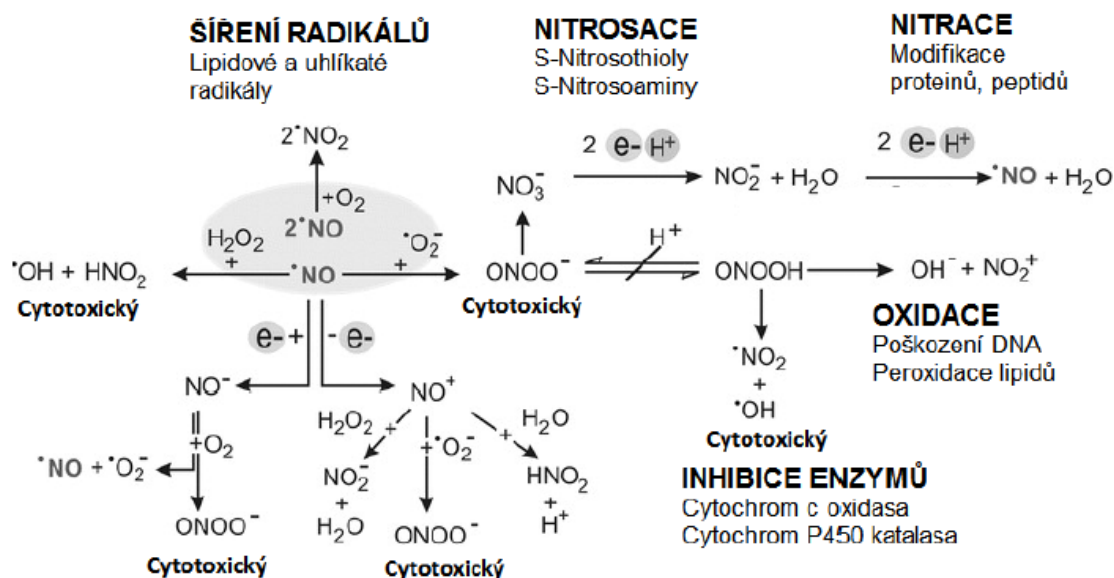
Mezi neenzymové zdroje NO patří především  $\text{NO}_2^-$  a RSNOs (Jahnová *et al.*, 2013). V biologických systémech dochází k tvorbě NO z  $\text{NO}_2^-$  při acidických podmínkách samotná tvorba NO je navíc zesílena přítomností silně redukčního prostředí (Zweier

*et al.*, 1999). Nitrosací vzniklé RSNOs se podílí na transportu a uvolňování NO, čímž představují významné meziprodukty metabolismu NO (Jahnová *et al.*, 2013). NO se za hypoxických podmínek akumuluje ve tkáních a váže se na široké spektrum hemových proteinů (Zweier *et al.*, 1999). Přítomnost RSNOs byla potvrzena u octomilky obecné (*D. melanogaster*), naopak tvorba NO z  $\text{NO}_2^-$  nebyla u hmyzu popsána (Homem, 2015).

## 2.2 Metabolismus NO a RNS u hmyzu

Přítomnost parazitů a patogenů vede u hmyzu k silným stresovým stimulům, které následně ohrožují homeostázu organismu, jednou z možných odpovědí na přítomnost patogenů je tvorba NO. NO vzniká u hmyzu především po vystavení organismu LPS, grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Zvýšená koncentrace NO následně vede jeho reakcím s  $\text{O}_2$  a ROS za vzniku širokého spektra toxických molekul (Obr. 4). Vzniklé molekuly následně poškozují proteiny, lipidy a DNA (Rivero, 2006).

Nadprodukce RNS se souhrnně označuje jako nitrosativní stres, ke kterému dochází, jakmile tvorba RNS převyší schopnost tyto radikály neutralizovat a eliminovat. Reakce RNS s biologickými molekulami vedou k oxidaci, nitraci, nitrosaci a nitrosylaci (Carr *et al.*, 2000; Homem, 2015).



Obr. 4 Schéma reakcí NO s reaktivními formami kyslíku, které vedou k produkci reaktivních molekul, radikálů, proteinovým modifikacím a k poškození DNA (upraveno podle Carr *et al.*, 2000).

## 2.2.1 Přímé reakce NO

NO nereaguje rychle s aminy ani thioly, tudíž tyto reakce nelze považovat za fyziologicky významné, naopak rychlost reakce NO s některými komplexy přechodných kovů a volnými radikály je dostatečně rychlá a vede k různým fyziologickým změnám v živých systémech (Wink a Mitchell, 1998).

### 2.2.1.1 Reakce mezi NO a kovovými komplexy

Celkově se dají reakce NO s kovy rozdělit do dvou skupin: 1) přímé reakce NO s centrálním atomem kovu; 2) redoxní reakce NO s oxokomplexy. NO spolu s  $\text{Fe}^{2+}$  tvoří nitrosylželeznatý komplex, naopak s  $\text{Fe}^{3+}$  k tvorbě takového komplexu nedochází (Wink a Ford, 1995). Mezi nejdůležitější reakce s kovovými komplexy patří reakce NO s hemovými proteiny, jako je např. sGC a cytochrom P450 (CYP, EC 1.14; Montfort *et al.*, 2017).

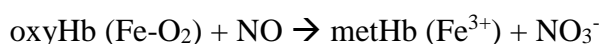
Reakce mezi NO a sGC vede k tvorbě nitrosylželeznatého komplexu, čímž následně dochází k aktivaci enzymu a k tvorbě cGMP, který funguje jako sekundární posel a podílí se na regulaci řady důležitých funkcí. Koncentrace NO potřebná k aktivaci sGC je relativně nízká,  $\text{EC}_{50}$  je  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Murad, 1994). Kaskáda byla popsána rovněž u hmyzu a je důležitá při zpracování čichových a vizuálních informací (Nighorn *et al.*, 1998; Gibbs *et al.*, 2001). U včel (*A. mellifera*) NO-cGMP signální dráha spolu s cAMP systémem hrají zásadní roli při tvorbě dlouhodobé paměti, která trvá alespoň 24 hodin a je závislá na syntéze proteinů. Krátkodobá paměť, kterou lze definovat jako paměť trvající méně než 24 hodin, není NO-cGMP systémem ovlivněna. U včel se NO-cGMP systém dále podílí na tvorbě hmatové a čichové paměti (Müller, 1996; Dacher a Gauthier, 2008; Montfort *et al.*, 2017).

Podobným způsobem reaguje NO s hemovou skupinou enzymu CYP. Rodina cytochromů P450 je zapojena při odbourávání cizorodých látek a účastní se katabolismu řady biomolekul, jako jsou např. mastné kyseliny, steroidy, prostaglandiny a leukotrieny. Působením NO na CYP vede k inhibici enzymu. Inhibice může být reversibilní či ireversibilní. K reversibilní inhibici dochází vazbou NO na hemovou skupinu enzymu, čímž je následně znemožněna vazba  $\text{O}_2$ , a tudíž i samotná enzymová reakce. Ireversibilní reakce nastává prostřednictvím RNS, nicméně může být snížena přítomností glutathionu (Wink *et al.*, 1993; Dacher a Gauthier, 2008). Mechanismus ireversibilní inhibice je takový, že vazbou NO na hem enzymu vzniká koordinační adukt,

jehož cysteinový ligand je odstraněn z koordinační sféry železa. RNS mohou poté působit nitrosačně či oxidačně na daný cysteinový ligand. Modifikací cysteinového ligandu je následně zabráněno opětovnému připojení hemu, což vede k nevratné inhibici enzymové aktivity (Girvan a Munro, 2016). U hmyzu byl CYP charakterizován např. u octomilky obecné (*D. melanogaster*; Hovemann *et al.*, 1997). Enzym se vyskytuje ve všech hmyzích tkáních a podílí se např. na syntéze a degradaci ekdysteroidů a juvenilního hormonu (JH). U včel CYP zastává také detoxifikační funkci, díky které přispívá k ochraně včel vůči přírodním a syntetickým xenobiotikům včetně pesticidů (Feyereisen, 1999; Manjon *et al.*, 2018).

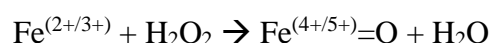
### 2.2.1.2 Reakce NO s oxokomplexy a volnými radikály

Reaktivita NO není omezená pouze na přímé interakce s ionty kovů, ale dochází také k jeho interakci s oxokomplexy. V rámci této skupiny existuje důležitá reakce mezi NO a oxyhemoglobinem (oxyHb) za vzniku  $\text{NO}_3^-$  a methemoglobinu (metHb):

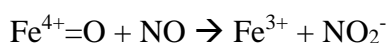


Daná reakce je hlavním mechanismem regulující koncentraci a lokalizaci NO *in vivo* u obratlovců. OxyHb díky své vysoké koncentraci a reaktivitě s NO funguje jako primární detoxifikační mechanismus pro NO u obratlovců (Lancaster, 1994; Wink a Mitchel, 1998).

U hmyzu se ukázalo, že vedle difuze  $\text{O}_2$  hmyzím tracheálním systémem, se na transportu  $\text{O}_2$  podílí také proteinové přenašeče. U octomilky obecné (*D. melanogaster*) byl charakterizován monomerní hemoglobin (Hb) o velikosti 153 AMK (17 kDa). Tento intracelulární protein je přítomen ve velmi nízké koncentraci v tracheálním systému a v tukovém tělesu. Z důvodu velmi nízké hladiny Hb není jeho interakce s NO tak důležitá, jako u obratlovců (de Sanctis *et al.*, 2005). NO velmi rychle reaguje s komplexy kovů s vysokým valenčním číslem. Oxokomplexy vznikají oxidací komplexů kovů oxidativními látkami, jako je např.  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



Tyto hypervalentní komplexy kovů jsou velmi silné oxidanty, které mohou způsobit buněčné poškození, včetně peroxidace lipidů. NO s těmito hypervalentními komplexy rychle reaguje:

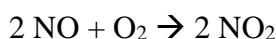


Reakcí dochází k redukci a snížení valenčního čísla komplexů kovů, a tím také ke snížení oxidativního poškození (Wink a Mitchel, 1998).

Mezi přímé reakce NO jsou dále řazeny jeho reakce s volnými radikály. Nejvýznamnější je reakce NO s  $O_2^-$  za tvorby  $ONOO^-$ , dále zde patří reakce NO s tyrosylovými či s lipidovými radikály. Reakce NO s lipidovými radikály vede k terminaci lipidové peroxidační řetězové reakce a následně k ochraně buněk proti cytotoxicitě (Padmaja a Huie, 1993; Förstermann *et al.*, 2017).

### 2.2.2 Reakce reaktivních forem dusíku

Kategorie zahrnuje reakce RNS vzniklých reakcí NO s  $O_2$  nebo  $O_2^-$ . NO je v přítomnosti  $O_2$  nestabilní a tvoří RNS jako je oxid dusitý ( $N_2O_3$ ) a dusičitý ( $NO_2$ ):

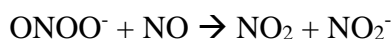


NO ve vodném prostředí podléhá autooxidaci, v porovnání s plynnou fází ve vodném prostředí vzniká pouze  $N_2O_3$ , který následně podléhá hydrolyze za vzniku  $NO_2^-$ . Autooxidační reakce je druhého řádu, tudíž poločas života NO významně závisí na jeho koncentraci. Bude-li např. počáteční koncentrace NO  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , bude jeho střední doba života 800 s, ovšem bude-li počáteční koncentrace NO  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , bude jeho střední doba života pouhých 8 s (Ford *et al.*, 1993).

Při difúzi NO z místa jeho původu se jeho koncentrace postupně snižuje. Pokles koncentrace NO v aerobním prostředí vede ke zvýšení jeho životnosti. Vyšší životnost NO následně umožňuje interakce NO s biologickými cíli, např. s sGC a CYP. Významné zvýšení hladiny NO vede naopak ke zvýšené tvorbě meziproduktů autooxidační reakce. Popsané závislosti vysvětlují, proč bude při nízkých koncentracích NO převládat jeho přímý účinek, zatímco při vyšších koncentracích NO bude docházet k reakcím, které jsou zprostředkovány skrze RNS (Wink a Mitchel, 1998). Předpokládá se, že v biologických systémech jsou primárním místem autooxidace lipidové vrstvy, ve kterých jsou následně lokalizovány vzniklé reaktivní meziprodukty. Nitrosační, případně nitrační reakce se tudíž vyskytují v blízkosti lipofilní membrány, a proto mohou být proteiny spojené s touto membránou převedeny na RSNOs nebo na nitrosaminy. Nitrosace thiolů v proteinech vede např. k inhibici proteinů nebo k tvorbě RSNOs, které jsou schopny modulovat přenos signálu (Lander *et al.*, 1996; Förstermann *et al.*, 2017).

Hlavní příčinou cytotoxicity vznikajícího NO je tvorba ONOO<sup>-</sup>, který vzniká reakcí NO s O<sub>2</sub><sup>-</sup>. ONOO<sup>-</sup> je za fyziologických podmínek nestálý a isomerací se přeměňuje na NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Tvorba ONOO<sup>-</sup> je ovlivněna dvěma hlavními faktory: 1) množstvím vzniklého NO a O<sub>2</sub><sup>-</sup>; 2) reakcí radikálů s biologickými složkami, které omezují dostupnost NO a O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a tudíž i množství vzniklého ONOO<sup>-</sup>. Za normálních podmínek je koncentrace O<sub>2</sub><sup>-</sup> díky katalyzované i nekatalyzované dismutační reakci nižší než 1 nmol·l<sup>-1</sup>. Koncentrace O<sub>2</sub><sup>-</sup> následně určuje množství vzniklého ONOO<sup>-</sup> (Beckman a Koppenol, 1996; Negri *et al.*, 2017).

ONOO<sup>-</sup> podléhá řadě reakcí, z nichž nejčastější je tvorba kyseliny peroxodusité, která následně zprostředkovává většinu oxidačních a nitračních reakcí (Koppenol *et al.*, 1992). Kyselina peroxodusitá může přímo oxidovat thioly, reakce ovšem díky vysoké koncentraci glutathionu (GHS) v organismu probíhá ve velmi malém množství. Dalším faktorem, který ovlivňuje reaktivitu ONOO<sup>-</sup> je jeho reakce s NO či O<sub>2</sub><sup>-</sup> za tvorby NO<sub>2</sub>. NO<sub>2</sub> poté rychle reaguje s NO za vzniku N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který je následně schopen nitrosačních reakcí (Ford *et al.*, 1993; Wink a Mitchel, 1998; Radi, 2013).



ONOO<sup>-</sup> je reaktivní se všemi hlavními třídami biomolekul (Beckman *et al.*, 1990). Molekula se účastní jednoelektronových reakcí za tvorby volných radikálů. Tímto způsobem je zahájena např. samovolná peroxidace lipidů. Dvouelektronové reakce vedou k modifikaci aromatických struktur důležitých molekul, mezi které se řadí např. důležitý antioxidant  $\alpha$ -tokoferol (Hogg *et al.*, 1994; Radi, 2013). Nejčastější biologicky relevantní reakcí je nukleofilní adice ONOO<sup>-</sup> na CO<sub>2</sub> za vzniku nitrosoperoxouhličitanu (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), který se rychle rozpadá na NO<sub>2</sub> a uhličitanový radikál (Bonini *et al.*, 1999). CO<sub>2</sub> tedy funguje jako scavenger ONOO<sup>-</sup>, na druhou stranu jeho reakce s ONOO<sup>-</sup> vede ke vzniku dvou molekul, které přispívají k oxidativnímu a nitrosativnímu stresu (Carballal *et al.*, 2014).

U hmyzího modelového organismu octomilky obecné (*D. melanogaster*) byla potvrzena účast ONOO<sup>-</sup> na nitraci tyrosinu. Daná reakce je pro RNS velmi charakteristická a probíhá prakticky u všech organismů. Nitrace následně ovlivňuje funkci příslušných enzymů. ONOO<sup>-</sup> je rovněž schopen odstranit H<sup>+</sup> z polynenasycených mastných kyselin, což vede k tvorbě aldehydů, konjugovaných dienů

a hydroperoxyradikálů, které jsou schopny iniciovat poškození lipidových membrán peroxidací.

Vedle peroxidace lipidů je nadbytečné množství ONOO<sup>-</sup> schopno iniciovat štěpení mitochondrií (Suzuki *et al.*, 2004; Lancaster, 2008). Rozpadu mitochondrií je zabráněno aktivitou GTPas podobných dynaminu, které brání tvorbě agregátů. RNS naopak přispívají k tvorbě těchto agregátů, které následně iniciují rozpad mitochondrií a buněčnou smrt (Yuan *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Posttranslační modifikace proteinů prostřednictvím RNS

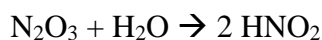
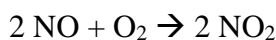
Posttranslační modifikace proteinů ovlivňují a kontrolují jejich strukturu, funkci, aktivitu, buněčnou lokalizaci, stabilitu a odbourávání. Během modifikací dochází k reakcím mezi RNS a postranními řetězci proteinových aminokyselin. Reakce vedou k nitraci, nitrosylaci a oxidaci příslušných proteinů (Lancaster, 2008).

Na nitraci proteinů se významně podílí RNS a ROS, neboť jejich vzájemným působením vzniká celá řada nitračních činidel. Mezi nejvýznamnější nitrační činidla *in vivo* patří NO, NO<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>, HNO<sub>2</sub> a nitrylchlorid (Hnízdová *et al.*, 2009). Mezi charakteristické reakce těchto nitračních činidel s proteiny patří např. nitrace tyrosinu, kdy dochází k navázání nitroskupiny v *ortho* poloze aromatického kruhu postranního řetězce aminokyseliny. Mezi častou reakcí ONOO<sup>-</sup> patří také nitrace tryptofanu za vzniku 6-nitrotryptofanu (Suzuki *et al.*, 2004; Lancaster, 2008).

Nitrosylace označuje připojení nitrosylové skupiny (•NO) k jiné chemické skupině prostřednictvím koordinačně kovalentní vazby. Specifické označení S-nitrosylace popisuje tvorbu vazby mezi skupinou •NO a thiolovým postranním řetězcem cysteinu (Stamler *et al.*, 1992; Jahnová *et al.*, 2013). Tento důležitý mechanismus je nezávislý na cGMP a daná reakce probíhá bez enzymové katalýzy. S-nitrosylace může ovlivňovat konformaci proteinů, protein-protein interakce a další posttranskripční modifikace, např. fosforylaci, acetylaci, ubikvitinaci a tvorbu disulfidové vazby (Hess a Stamler, 2012). V živých organismech dále vznikají nízkomolekulární RSNOs, které jsou relativně stabilní a mají delší poločas života než NO. Mezi nejznámější RSNOs patří S-nitrosoglutathion (GSNO), který *in vivo* slouží jako zásobní a transportní forma NO (Carver *et al.*, 2005).



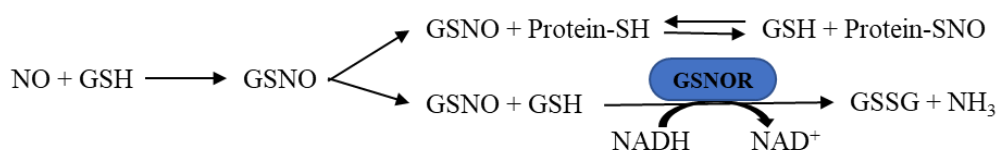
Na základě studia průběhu S-nitrosylace v aerobním prostředí lze předpokládat, že S-nitrosylace probíhá zejména prostřednictvím tvorby reaktivních oxidů dusíku, např.  $\text{N}_2\text{O}_3$  a  $\text{N}_2\text{O}_4$ . Kharitonov *et al.* (1995) navrhli možný mechanismus S-nitrosylace:



Studie *in vitro* prokázaly, že při fyziologické milimolární koncentraci GSH téměř veškerý  $\text{N}_2\text{O}_3$  reaguje s GSH za vzniku GSNO (Kharitonov *et al.*, 1995; Jahnová *et al.*, 2013). RSNOs mohou snadno uvolňovat NO z důvodů, že vzniklá S-NO vazba je silně polarizovaná a málo stabilní. RSNOs se nejčastěji rozkládají na NO a příslušný disulfid. Samotný rozklad RSNOs probíhá jak enzymově, tak neenzymově. Stabilita RSNOs je ve vodném prostředí ovlivněna světlem, teplotou, pH, přítomností  $\text{O}_2$  a kationtů přechodných kovů. Rozklad vazby S-NO může proběhnout jako monomolekulární reakce, redukční štěpení katalyzované kovy, nebo jako reakce vyššího řádu. Monomolekulární rozpad S-NO vazby může být homolytický, nebo heterolytický, přičemž heterolytické štěpení není za fyziologických podmínek významné, naproti tomu homolytické vedoucí ke vzniku NO a příslušného disulfidu je dráha s nejmenší energií (Kharitonov *et al.*, 1995; Jahnová *et al.*, 2013).

### 2.2.3.1 Enzymy katalyzující odbourání RSNOs

Aktivita GSNOR společně s neschopností RSNOs prostupovat buněčnou membránou vede k nestejněměrné distribuci RSNOs. GSNOR zastává klíčovou roli v rámci katabolismu GSNO, a tak sám nepřímou reguluje hladinu ostatních RSNOs. GSNOR katalyzuje NADH-dependentní přeměnu GSNO na glutathiondisulfid (GSSG) a amoniak (Obr. 5; Lui *et al.*, 2001). GSNOR je vysoce konzervovaný enzym a jeho ztráta či poško-



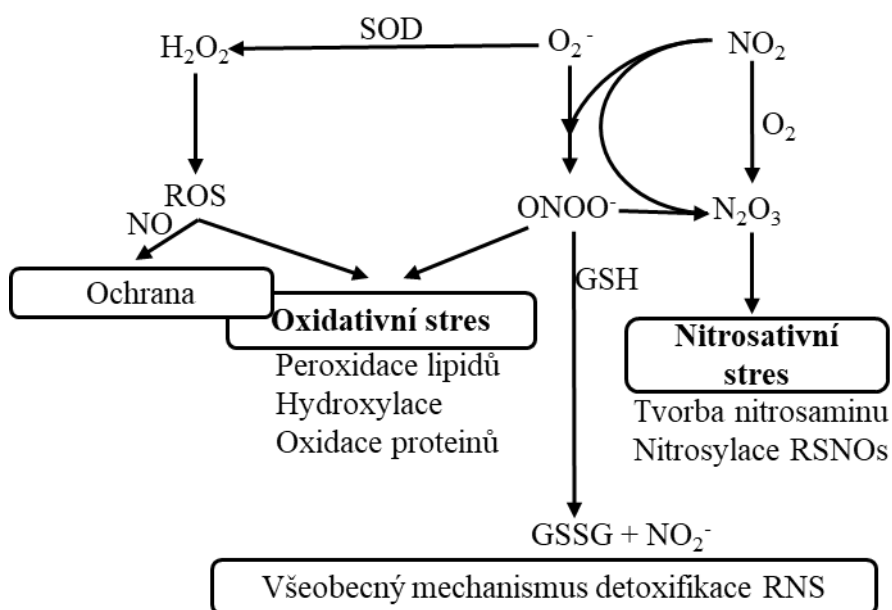
Obr. 5 GSNOR nepřímou kontroluje hladinu S-nitrosothiolů katalýzou přeměny S-nitrosoglutathionu (GSNO) na glutathiondisulfid (GSSG; upraveno podle Lui *et al.*, 2001).

zení vede k akumulaci GSNO a RSNOs. Vzhledem k tomu, že organismy, které postrádají GSNOR jsou více náchylné k infekci se předpokládá, že S-nitrosylace představuje jeden z hlavních a vysoce konzervovaných mechanismů imunitní odpovědi (Tang *et al.*, 2013; Homem, 2015).

## 2.2.4 Propojení reakčních mechanismů RNS s ROS

V kapitole 2.2.2 bylo zmíněno, že tvorba ONOO<sup>-</sup> je omezená dostupností NO a O<sub>2</sub><sup>-</sup>, tudíž mezi RNS a ROS dochází ke vzájemným interakcím a jednotlivé radikály se vzájemně ovlivňují (Obr. 6). V aerobních organismech představuje poměr vzniklého O<sub>2</sub><sup>-</sup> 1-5 % z celkového množství spotřebovaného O<sub>2</sub>. Konečná koncentrace O<sub>2</sub><sup>-</sup> je v organismu mnohonásobně nižší, díky přítomnosti enzymů SOD (Beckman a Koppenol, 1996). SOD je enzym, který katalyzuje konverzi O<sub>2</sub><sup>-</sup> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tato přeměna představuje jednu z katalyticky neúčinnějších reakcí, které kdy byly popsány (Gray a Carmichael, 1992).

Vzniklý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je následně metabolizován CAT, peroxidasami a přítomnými scavengery, které lze charakterizovat jako látky, jež se podílí na odstraňování volných radikálů. U octomilky obecné (*D. melanogaster*) byly popsány 3 isoformy SOD. Cytoplazmatická SOD (Sod1) je enzym, který obsahuje Cu a Zn v aktivním místě a je lokalizován v cytoplazmě a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Mitochondriální SOD (Sod2) váže v aktivním místě Mn a je lokalizována v matrix mitochondrií. Třetí SOD, označována jako extracelulární (Sod3), byla jako první identifi-



Obr. 6 Vzájemné interakce mezi ROS a RNS (upraveno podle Wink a Mitchel, 1998).

kována právě u octomilky (Parker *et al.*, 2004; Blackney *et al.*, 2014). U včel jsou popsány pouze 2 isoformy SOD (Sod1 a Sod2), jejichž exprese a aktivita závisí na intenzitě stresových podmínek, kterým jsou včely vystaveny (Nikolić *et al.*, 2015).

CAT je klíčový antioxidační enzym, který chrání organismus před oxidativním stresem. CAT popsána u octomilky obecné (*D. melanogaster*) je tetramerní enzym, jehož každá podjednotka má hmotnost přibližně 58 kDa. Enzym je nejvíce aktivní ve třetím instaru a během metamorfózy. U octomilky jsou dva geny kódující proteiny s katalasovou aktivitou. Gen *CAT* kóduje intracelulární katalasu a gen *immune-regulated catalase (IRC)* kóduje sekreční enzym s katalasovou aktivitou, jež hraje důležitou roli ve střevní imunitě octomilky (Ha *et al.*, 2005). U včel se exprese *CAT* genu zvyšuje v odpovědi na přítomnost těžkých kovů, či jiných látek znečišťujících životní prostředí (Nikolić *et al.*, 2015).

### **2.3 Funkce NO a S-nitrosylace v imunitě hmyzu a včel**

Samostatně je hmyz před patogeny chráněn třemi stupni vrozeného imunitního systému. Mimo tyto tři stupně se u hmyzích řádů blanokřídlých (*Hymenoptera*) a termitů (*Isoptera*) vyvinulo tzv. sociální chování. Sociální chování hmyzu chrání jedince i celé hmyzí kolonie proti patogenům (Meunier, 2015).

Hlavními orgány zapojenými v hmyzí imunitě jsou hemocyty a tukové těleso. V tukovém tělese dochází k expresi AMPs, které jsou následně uvolněny do hemolymfy. U octomilky obecné (*D. melanogaster*) bylo charakterizováno 7 AMPs, u včel (*A. mellifera*) byly charakterizovány 4 rodiny genů pro AMPs (abaecin, defensin, apidaecin a hymenoptaecin). Vzhledem k nepřítomnosti cév u hmyzu je krev a intersticiální tekutina nerozlišitelná a souhrnně jsou označovány jako hemolymfa. Hemolymfa obsahuje hemocyty a usnadňuje transport živin, odpadních látek a metabolitů. (Hoffmann, 1995; Tsakas a Marmaras, 2010).

První stupeň ochrany hmyzu před patogeny představují fyzické bariéry, které chrání jedince před průnikem infekčních a cizorodých látek. Dalším stupněm je poté buněčná imunita, k jejíž aktivaci dochází ihned po průchodu cizorodých látek do hmyzího těla. V rámci tohoto stupně dochází k imunitním reakcím jako je nodulace, zapouzdření a fagocytóza. Třetí stupeň hmyzí imunity představuje humorální imunita, která je spuštěna nejdříve hodinu po infekci a je těsně spojena s imunitou buněčnou. Humorální imunita se projevuje melanizací, syntézou obranných enzymů a AMPs (Rosales, 2011).

Ke specifické imunitní odpovědi dochází prostřednictvím mediátorů, které vznikají po rozpoznání určitého signálu specifickým receptorem. Podle chemického složení lze charakterizovat čtyři skupiny mediátorů, které zastávají důležitou roli v buněčné i humorální imunitě hmyzu (Clark *et al.*, 2004).

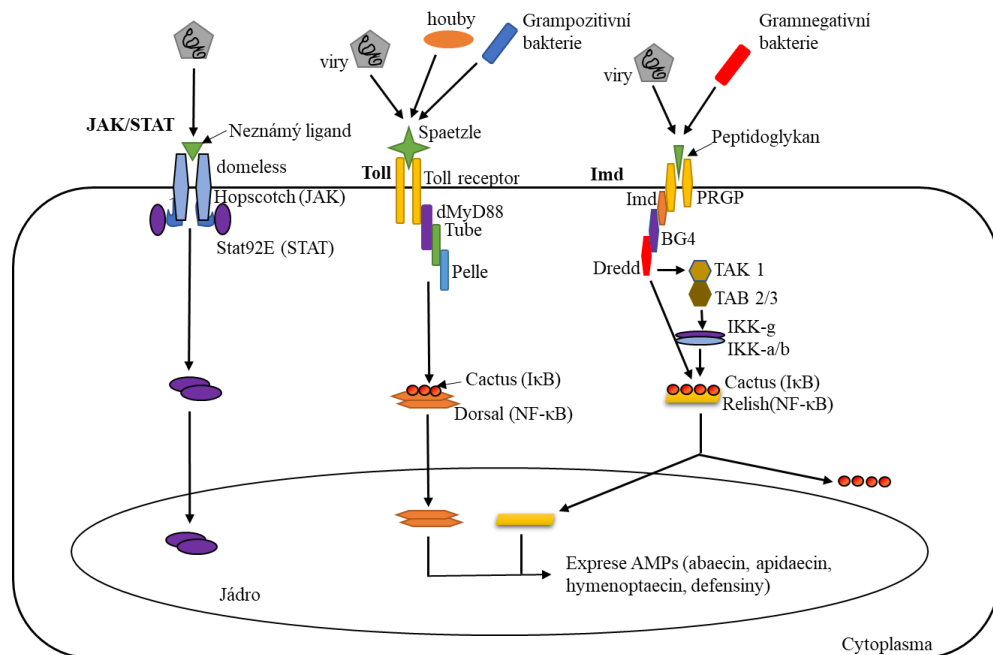
První skupinou jsou cytokiny, mezi které patří protein unpaired (Upd) ze signální dráhy, která zahrnuje receptory, Janusovy kinasy (JAK), převodníky signálu a aktivátory transkripčních proteinů (STAT) (JAK/STAT; Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription proteins). Do první skupiny dále patří protein Spaetzle ze signální dráhy Toll, plasmocyte-spreading peptid (PSP) a Edin. PSP je exprimován v hemocytech a tukovém tělese jako prekurzor, který je následně štěpen na funkční PSP. PSP jeho vazbou na specifický receptor o velikosti 190 kDa ovlivňuje tvorbu panožek při adhezenci hemocytů (Vanha-Aho *et al.*, 2016).

Druhou skupinu imunitních mediátorů představují monoaminy. Monoaminy ovlivňují tvorbu panožek při adhezenci hemocytů, fagocytózu a nodulaci tím, že mění strukturu buněk přeuspořádáním aktinového cytoskeletu. Monoaminy mohou dále aktivovat malý G protein Rac1, čímž dochází ke změně přilnavosti hemocytů a k jejich přeměně z přisedlých na cirkulační (Kim a Kim 2010). Třetí skupinu představuje NO, který se jako malá, membránou propustná signální molekula podílí na humorální i buněčné imunitě. U hmyzu NO reguluje imunitní odpovědi, ovlivňuje náchylnost k patogenům, bakteriím a omezuje rozvoj parazitů (Sadekuzzaman *et al.*, 2018). Čtvrtá skupina hmyzích imunitních mediátorů zahrnuje eikosanoidy, které lze charakterizovat jako skupinu oxidovaných dvacetihlíkatých nenasycených mastných kyselin. Eikosanoidy nejčastěji vznikají z arachidonové kyseliny enzymovou činností cyklooxygenasy (EC 1.14.99.1), lipoxygenasy (EC 1.13.11) a epoxygenasy (EC 1.11.2.3). Arachidonová kyselina vzniká katalytickou aktivitou fosfolipasy 2 (PLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4; Dennis *et al.*, 2011). V rámci bakteriální infekce eikosanoidy mobilizují přisedlé hemocyty a podílí se na jejich šíření do místa infekce. V místě infekce se eikosanoidy podílí na fagocytóze, nodulaci a enkapsulaci v závislosti na typu patogenu (Carton *et al.*, 2002; Shrestha a Kim, 2007). Eikosanoidy se dále podílí na expresi AMPs. Hwang *et al.*, (2013) uvádí, že pokles tvorby eikosanoidů v odpovědi na inhibici enzymu PLA<sub>2</sub> vede k poklesu tvorby AMPs.

### 2.3.1 Signální dráhy zapojené v imunitě hmyzu

Signálním drahám předchází specifické rozpoznání signálu skrze určitý receptor. Receptory rozpoznávají specifické vzory, jež se souhrnně označují jako molekulární vzory spojené s patogeny (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns; Medzhitov a Janeway, 1997). Receptory jsou lokalizovány na povrchu plazmatické membrány buněk v tukovém tělese a hemocytech, popřípadě jsou rozpuštěny v hemolymfě. Látky syntetizované mikroorganismy se následně na tyto receptory vážou a spouští následnou signální kaskádu vedoucí k určité odpovědi. Mezi nejčastější PAMPs patří LPS gramnegativních bakterií, kyselina lipoteichoová, peptidoglykany grampozitivních bakterií a fungální  $\beta$ -1,3-glukany (Nappi *et al.*, 2000). U octomilky obecné (*D. melanogaster*) a včely medonosné (*A. mellifera*) byly popsány čtyři signální dráhy, k jejichž aktivaci dochází v odpovědi na PAMPs (Evans *et al.*, 2006). Signální dráhy zapojené v induktivní obraně hostitele se nazývají Toll, Imd, JAK/STAT a JNK (Obr.7).

Včelí JAK/STAT signální dráha postrádá unpaired (Upd) ligand v porovnání se stejnou drahou popsanou u octomilky obecné (*D. melanogaster*), nicméně přítomnost JAK/STAT cytokinového receptoru domeless a všech ostatních složek této signální dráhy naznačuje, že JAK/STAT signální dráha je u včel funkční, ale je spuštěna dosud neznámým ligandem (Evans *et al.*, 2006; Brutscher *et al.*, 2015).

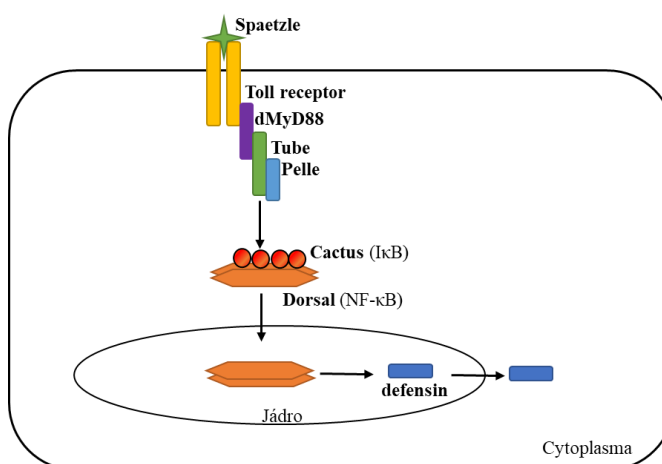


Obr. 7 Signální dráhy zapojené v imunitě hmyzu, aktivované v odpovědi na přítomnost molekulárních vzorů spojených s patogeny (PAMPs) (upraveno podle Brutscher *et al.*, 2015).

### 2.3.1.1 Signální dráha Toll

Signální dráha Toll je zapojena v obraně proti grampozitivním bakteriím a houbám. Toll a Toll podobné receptory (TLRs; Toll-like receptors) jsou transmembránové signální proteiny, které hrají klíčovou roli v hmyzí imunitě a v hmyzím vývoji. Jedná se o ortology savčích TLRs a všechny jsou zapojeny v hmyzí imunitě (Beutler, 2004). U octomilky obecné (*D. melanogaster*) je signální dráha Toll aktivována, jakmile se signální protein Spaetzle naváže na extracelulární doménu transmembránového Toll receptoru. Genom octomilky kóduje rodinu šesti Spaetzle molekul, které následně fungují jako ligandy devíti TLRs (Parker *et al.*, 2001). Následně dochází ke konformačním změnám aktivovaného receptoru a několik proteinů poté vytváří receptorový komplex. Aktivovaný receptorový komplex vede k degradaci inhibitoru NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) zvaného Cactus, čímž dochází k jaderné translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B Dorsal a k následné expresi genů AMPs (Royet *et al.*, 2005).

Signální dráha Toll (Obr. 8) je u včel aktivována rodinou receptorů rozpoznávajících patogen (PRRs; pattern recognition receptors), na které se vážou fungální a bakteriální PAMPs. Navázání PAMPs vede k tvorbě Spaetzle. Aktivace a tvorba dimeru Toll receptoru vede k navázání proteinů dMyD88, Tube a Pelle. Protein Pelle způsobí degradaci I $\kappa$ B (Cactus-1, Cactus-2, Cactus-3), čímž následně dojde k uvolnění transkripčních faktorů (Dorsal-1A a Dorsal-1B). Jaderná translokace Dorsal vede k expresi AMPs a melanizaci. Mezi exprimované AMPs patří abaecin, apidaecin, apisimin, defensin-1, defensin-2 a hymenoptaecin (Evans *et al.*, 2006; McMenemy *et al.*, 2018).

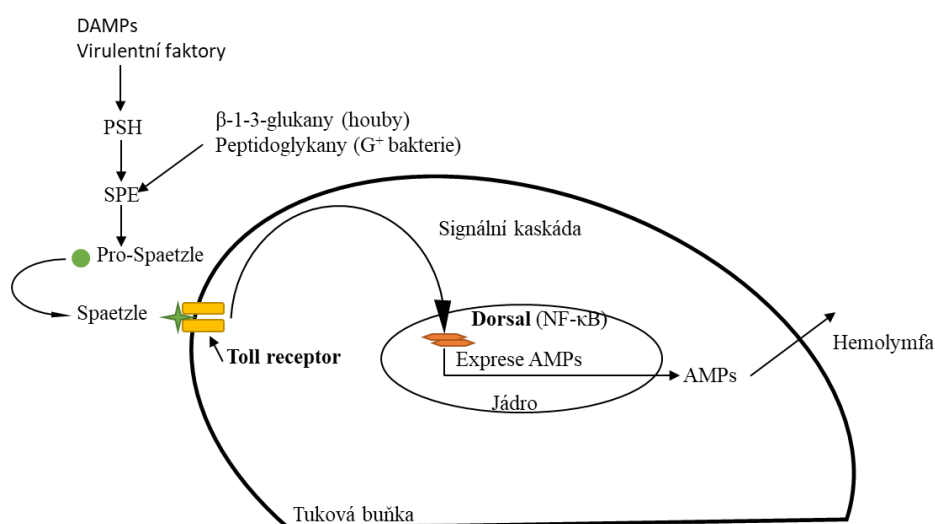


Obr. 8 Schéma signální dráhy Toll vedoucí k tvorbě antimikrobiálního peptidu defensinu (upraveno podle McMenemy *et al.*, 2018).

### 2.3.1.1.1 S-nitrosylace a signální dráha Toll

Signální dráhu Toll lze dále aktivovat rozštěpením serinové proteasy Persephone (PSH) pomocí bakteriálních a fungálních faktorů. Signální dráhu lze také aktivovat endogenními molekulárními vzory spojenými s poškozením (DAMPs; damage associated molecular patterns), které jsou přítomny v hemolymfě apopticky deficientních mutantních larev octomilky obecné (Ming *et al.*, 2014). Aktivovaný Spaetzle zpracovává enzym (SPE; Spaetzle-processing enzym) štepí prekurzor pro-Spaetzle na funkční ligand Spaetzle, jež následně aktivuje Toll receptor (Jang *et al.*, 2006). Homem (2015) potvrdil hypotézu, že S-nitrosylace PSH a SPE je důležitý proces v rámci imunitní odpovědi octomilky obecné vůči houbě *Beauveria bassiana* (Obr. 9).

PSH má velikost 42,5 kDa, obsahuje 394 aminokyselin a je složen ze signálního peptidu (rezidua 1-22), CLIP domény (rezidua 23-143) a serinové proteasové domény (rezidua 144-394). Protein je sekretován do hemolymfy jako zymogen, a pro svou funkčnost vyžaduje proteolytickou aktivitu. Ke štěpení dochází mezi H143 a I144 proteasou sekretovanou patogeny, nebo proteasou spojenou s buněčným poškozením. PSH obsahuje 17 cysteinových reziduí, přičemž k S-nitrosylaci dochází na cysteinu 254, který místo strukturální funkce zastává funkci regulační a nepředpokládá se u něj tvorba disulfidového můstku. Cystein 324 tvoří disulfidový můstek s cysteinem 300 podobně jako cystein 111 s cysteinem 243 (Homem, 2015). Jakmile dojde k aktivaci PSH, spustí se proteasová kaskáda vedoucí k aktivaci Spaetzle proteinu, který funguje jako ligand sig-



Obr. 9 Funkce PSH a SPE v rámci signální dráhy Toll octomilky obecné (*D. melanogaster*). SPE je aktivován fungální či bakteriální infekcí, PSH je aktivován patogenními proteasami. Obě cesty vedou k tvorbě aktivního Spaetzle proteinu a k aktivaci signální dráhy Toll, signální dráha vede k expresi AMPs (upraveno podle Homem, 2015).

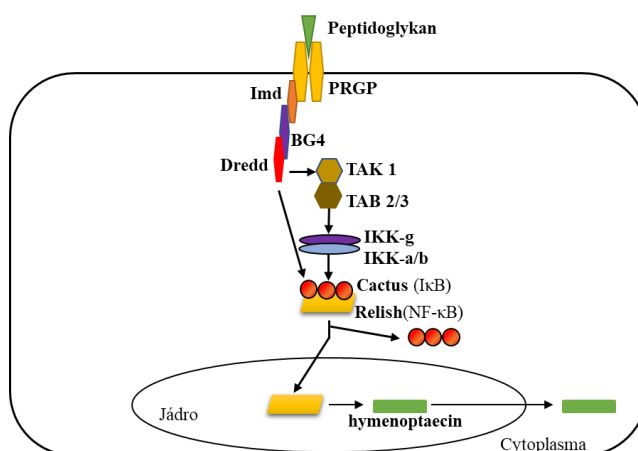
nální dráhy Toll, jež je zakončená tvorbou AMPs (Ligoxygakis *et al.*, 2002; El Chamy *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2014)

Cílem S-nitrosylace byl dále potvrzen SPE, který je aktivován v odpovědi na fungální či bakteriální infekci. V cytoplasmě octomilky obecné (*D. melanogaster*) jsou PSH a SPE přítomny jako monomery, oligomery a intermediáty spojené disulfidovým můstkem. Poměr je ovlivněn jak redoxním stavem prostředí, tak koncentrací RSNOs. Dojde-li k napadení organismu patogeny, vznikají monomery, které indukují imunitní odpověď následovanou zvýšením hladiny RSNOs. Vyšší hladiny RSNOs indukují oligomerizaci SPE a PSH, čímž dochází k regulaci imunitní odpovědi (Homem, 2015).

### 2.3.1.2 Signální dráha Imd

Signální dráha Imd je zapojena pouze v imunitní odpovědi a neovlivňuje hmyzí vývoj (Hultmark, 2003). U octomilky obecné (*D. melanogaster*) je signální dráha Imd indukovaná primárně gramnegativními bakteriemi, podobně silnou indukci vyvolávají také grampozitivní bakterie s peptidoglykany obsahující kyselinu diaminopimelovou. Slabší imunitní odpověď indukují také houby. Příčinou této široké specifčnosti jsou tři různé možnosti sestřihu proteinu rozpoznávajícího peptidoglykany (PGRP, peptidoglycan recognition proteins; Hultmark, 2003; Werner *et al.*, 2003). U octomilky obecné (*D. melanogaster*) tato dráha aktivuje nejen Relish protein, ale i komponenty zapojené v signální dráze JNK, které by mohly sloužit jako pozitivní a negativní zpětnovazební smyčka. Všechny tyto komponenty byly identifikovány také ve včelím genomu (Boutros *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2006; Brutscher *et al.*, 2015).

U včel (*A. mellifera*) je signální dráha Imd (Obr. 10) spuštěna aktivací PGRP. Aktivace



Obr. 10 Schéma signální dráhy Imd u včely medonosné (*A. mellifera*), která vede k tvorbě hymenoptaecinu (upraveno podle McMenamin *et al.*, 2018).



receptoru je spuštěna vazbou peptidoglykanu, který obsahuje kyselinu diaminopimelovou a je pro gramnegativní bakterie charakteristický. Následně dochází k aktivaci adaptorového proteinu Imd a k fosforylaci proteinu Relish prostřednictvím IκB kinasy (IKK; EC 2.7.11.10). Následné odštěpení proteinu Relish od proteinu Cactus probíhá díky kaspase zvané Death related ced-3/Nedd2-like (Dredd; EC 3.4.22). Uvolněný Relish následně ovlivňuje expresi AMPs a genů zapojených v obraně hostitele. Vedle popsaného mechanismu mohou komponenty signální dráhy Imd aktivovat signální dráhu JNK. Signální dráha JNK je aktivována kinasou aktivovanou transformujícím růstovým faktorem 1 (TAK 1; transforming growth factor-activated kinase) a proteiny 2 a 3 vázající se k TAK (TAK binding protein 2 a 3; TAB 2 a 3). Signální dráha vede k expresi AMPs, popřípadě k apoptóze (McMenamin *et al.*, 2018).

### **2.3.1.3 Propojení NO se signální dráhou Toll a Imd**

Signální dráhy Toll a Imd indukují expresi NOS a genů AMPs. Prostřednictvím NOS poté vzniká nadměrné množství NO, které aktivuje PLA<sub>2</sub>. Aktivovanou PLA<sub>2</sub> vznikají eikosanoidy, jež indukují buněčnou imunitní odpověď tvorbou nodulů. Eikosanoidy dále fungují jako sekundární efekторы zvyšující množství AMPs, jež vznikají prostřednictvím signálních drah Toll a Imd. Mechanismus, kterým eikosanoidy aktivují expresi AMPs není znám, nicméně bylo zjištěno, že inhibice PLA<sub>2</sub> u octomilky obecné (*D. melanogaster*) vede k supresi obou signálních drah (Hyršl *et al.*, 2011; Sadekuzzaman a Kim, 2018).

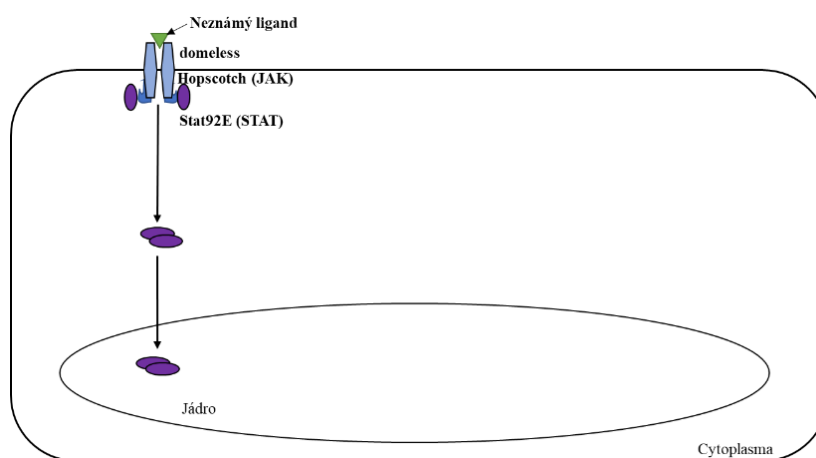
### 2.3.1.4 Signální dráha JAK/STAT

Signální dráha JAK/STAT přispívá k vrozené imunitě tím, že indukuje faktory podobné komplementu a způsobuje nadměrnou proliferaci hemocytů. U modelového organismu octomilky obecné (*D. melanogaster*) funguje glykosylovaný protein Upd jako ligand signální dráhy JAK/STAT. Aktivace vede k fagocytóze hemocytů, dále byla u octomilky potvrzena úloha této dráhy v rámci antivirální odpovědi (Dostert *et al.*, 2005).

Signální dráha JAK/STAT u včel (Obr. 11) zahrnuje cytokinový receptor domeless, JAK tyrosinkinasu (EC 2.7.10.2), transkripční faktor STAT92E a 2 negativní regulátory SOCS a PIAS. U včel, i přes absenci ligandu Upd, přítomnost receptoru a dalších komponent JAK/STAT signální dráhy naznačuje, že dráha plní signální funkci a vede k aktivaci včelího imunitního systému podobně, jako např. u octomilky. Ligand odpovídající proteinu Upd však nebyl u včel detekován (Boutros *et al.*, 2002; Brutscher *et al.*, 2015; McMenamín *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Funkce NO a RNS v hmyzím imunitním systému

NO v imunitním systému hmyzu funguje jako signální a cytotoxická molekula. Po vystavení organismu patogenům se zvyšuje koncentrace NO díky vyšší aktivitě enzymu NOS. Enzym je v rámci imunitního systému octomilky obecné (*D. melanogaster*) lokalizován v hemocytech a střevu. Nadprodukce NO vede k tvorbě ROS a RNS, které následně inhibují enzymy a poškozují DNA. NO jako signální molekula zprostředkovává imunitní odpovědi v rámci buněčné a humorální imunity hmyzu (Negri *et al.*, 2017; Sadekuzzaman a Kim, 2018).



Obr. 11 Schéma signální dráhy JAK/STAT u včely medonosné (upraveno podle McMenamín *et al.*, 2018).

NO dále indukuje expresi AMPs v tukovém tělese a hemocytech prostřednictvím signálních drah Toll a Imd. Nové poznatky naznačují, že NO vede k tvorbě eikosanoidů, které následně zvyšují množství exprimovaných AMPs těmito dráhami. Dnes však není známo, jakým mechanismem eikosanoidy expresi AMPs aktivují. NO u octomilky obecné (*D. melanogaster*) v odpovědi na přítomnost gramnegativních bakterií indukuje expresi antimikrobiálního peptidu diptericinu skrze signální dráhu Imd (Foley a O'Farrell, 2003; McGettigan *et al.*, 2005; Sadekuzzaman a Kim, 2018).

### 2.3.3 Včelí imunitní systém

Včelí kolonie lze charakterizovat jako relativně homeostatický celek s vysokou četností jedinců a vysokým obsahem živin. Díky těmto vlastnostem včelstva představují atraktivní cíl pro různé infekční agens. Včela medonosná (*A. mellifera*) je během svého života ohrožena řadou patogenních a saprofytických mikroorganismů (viry, houby a bakterie), parazitů (larvy *Senotainia tricuspis*), parazitických roztočů (*Acarapis woodi*, *Varroa destructor*) a prvoků. Včela má v rámci odpovědi na infekci či poranění vyvinuto široké spektrum obranných mechanismů (Gliński a Jarosz, 2001; Rosales, 2011).

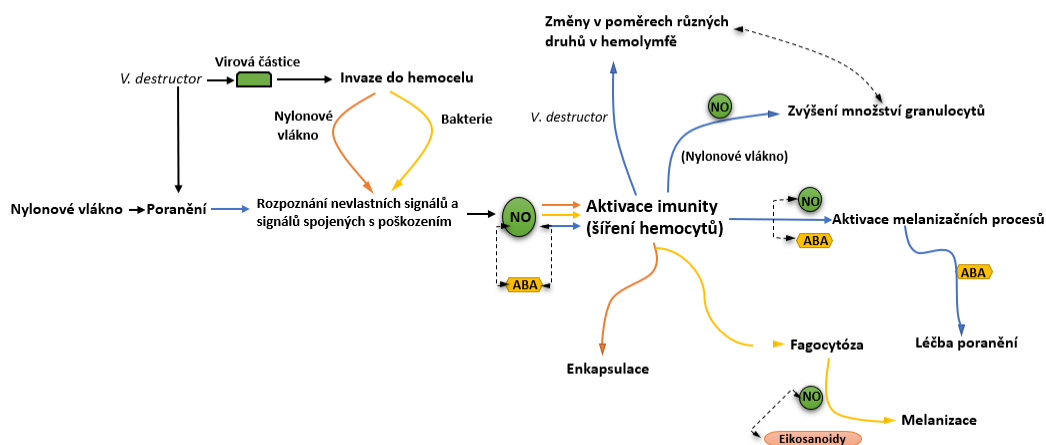
Prvotní a velmi důležitý obranný mechanismus představuje včelí anatomická a fyzikální bariéra, která je tvořená střevem, pokožkou a tracheálním systémem. Tato bariéra brání pronikání mikrobiálním narušitelům do hemolymfy (Dunn, 1986; Gliński a Jarosz, 2001). Mimo fyzikální bariéru byly ve včelím střevu identifikovány symbiotické bakteriální kultury, které mohou inhibovat růst některých mikroorganismů (Kwong a Moran, 2016). Ihned po průniku cizorodých látek do včelího těla dojde v coelomické dutině včel k aktivaci vnitřních imunitních odpovědí, které jsou doprovázeny nodulací, zapouzdřením a fagocytózou. Následně hodinu po infekci je spuštěn třetí stupeň včelí imunity, který představuje humorální imunita, jež se projevuje melanizací, syntézou obranných enzymů a genů AMPs (Gliński a Jarosz, 2001; Rosales, 2011).

Včely, jakožto zástupci sociálního hmyzu, využívají vedle individuálního imunitního systému další strategie sociální imunity, které chrání je a celé včelstvo proti útokům patogenů. Mezi tyto obranné strategie sociálního hmyzu patří např. grooming, odstraňování infikovaných larev a tvorba hnízd z antimikrobiálních materiálů (Evans *et al.*, 2006; Natsopoulou *et al.*, 2016).

### 2.3.3.1 Funkce NO a RNS ve včelím imunitním systému

Vědecké práce zabývající se funkcí NO v imunitním systému hmyzu jsou většinou zaměřeny na modelový hmyzí organismus octomilku obecnou, i přesto již bylo publikováno několik článků, které se danou problematikou zabývají právě u včel. Mimo problematiku NO v imunitním systému včel bylo publikováno dostatečné množství článků, zabývajících se úlohou NO ve včelí paměti. NO v rámci včelího nervového systému funguje jako neurotransmiter a podílí se na procesu učení (Negri *et al.*, 2017).

NO jako součást imunitního systému včel vzniká enzymově činností NOS ve včelích hemocytech, střevu a tukovém tělese, jako odpověď na přítomnost bakteriálních LPS. Negri *et al.*, (2013) prokázali úlohu NO v prvních krocích aktivace včelího imunitního systému, dále autoři popsali účast NO na procesu tvorby panožek při adhezenci hemocytů, kterého se účastní již dříve popsané  $Ca^{2+}$  ionty a eikosanoidy (Tojo *et al.*, 2000). Negri *et al.*, (2014) dále prokázali úlohu NO v hojení ran způsobených po napadení včelích larev parazitickým roztočem *V. destructor*. Dále bylo zjištěno, že na procesu migrace hemocytů se podílí také kyselina abscisová (ABA). ABA je fytohormon, který reguluje základní fyziologické funkce rostlin. Přítomnost ABA byla potvrzena v nektaru, medu a u dospělých včel. ABA vedle šíření hemocytů zlepšuje hojení ran u larev napadených parazitickým roztočem *V. destructor*, zvyšuje aktivitu fenoloxidasy (EC 1.14.18.1), chladovou toleranci včel a pravděpodobně i množství vzniklého NO. Předpokládá se, že ABA hraje ve včelím imunitním systému stejně důležitou roli jako NO (Obr. 12; Negri *et al.*, 2015; Negri *et al.*, 2017).



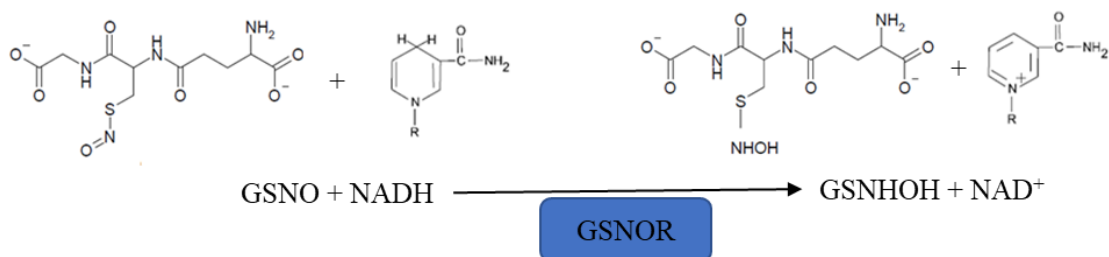
Obr. 12 Schéma funkcí NO a ABA ve včelím imunitním systému. Plné čáry odpovídají stresovým a bunčným odpovědím potvrzeným literaturou. Tečkované čáry představují pravděpodobné vztahy mezi stresovými a bunčnými odpověďmi (upraveno podle Negri *et al.*, 2016).

## 2.4 Metody analýzy NOS a GSNOR

Oba enzymy zapojené v metabolismu NO lze analyzovat prostřednictvím biochemických a molekulárně biologických metod. Enzymy představují klíčovou složku v metabolismu RNS. Enzymy se u hmyzu podílí na signalizaci prostřednictvím NO a hrají klíčovou roli při aktivaci imunitního systému hmyzu (Homem, 2015; Negri *et al.*, 2017). V rámci biochemických metod se jedná o lokalizaci, nebo o stanovení aktivity daných enzymů. Metodami molekulární biologie lze naopak studovat expresi příslušných genů.

### 2.4.1 Biochemické metody analýzy NOS a GSNOR

Aktivitu enzymu GSNOR lze měřit spektrofotometricky při 340 nm a teplotě 25 °C. Principem této metody je oxidace NADH na NAD<sup>+</sup> (Obr. 13). V průběhu reakce se měří pokles absorbance při 340 nm, který odpovídá úbytku koncentrace NADH (Kubienová *et al.*, 2016). Při použití S-(hydroxymethyl)glutathionu jako substrátu lze měřit dehydrogenasovou aktivitu GSNOR. Během reakce dochází k oxidaci substrátu a k tvorbě NADH, tudíž i k nárůstu absorbance při 340 nm. Dále lze detekovat dehydrogenasovou aktivitu GSNOR pomocí elektronových akceptorů, jako je např. nitrotetrazoliová modř (NBT). Stanovení probíhá na gelu, přičemž principem metody je redukce NBT za tvorby nerozpustného modrého formazanu v místě výskytu GSNOR. Fluorescenční metodou lze na gelu za nativních podmínek měřit reduktasovou aktivitu GSNOR. NADH se během reakce spotřebovává, následně jsou detekovány tmavé skvrny na světlém pozadí. K excitaci NADH dochází při 340 nm a k emisi při 460 nm. Výhodou detekce GSNOR na gelech je, že v gelu nejsou přítomné nízkomolekulární látky, které byly v původním extraktu a rušili spektrofotometrickou metodu. Spektrofotometrická metoda je naopak snazší, rychlejší a levnější (Kubienová *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2016).



Obr. 13 Princip metody měření aktivity GSNOR při 340 nm. V průběhu reakce dochází k oxidaci NADH na NAD<sup>+</sup> a k tvorbě nestabilního intermediátu N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH) (upraveno podle Kubienová *et al.*, 2013).

K analýze NO v biologických vzorcích bylo pospáno již mnoho metod, např. metoda využívající oxyHb, chemiluminiscenční metoda, hmotnostní spektrometrie a amperometrická metoda využívající selektivní elektrodu pro NO.

Pro fluorescenční detekci NO se používají deriváty odvozené od fluoresceinu zvané diaminofluoresceiny (DAF). Nejčastěji se pro detekci NO využívá 4,5-diaminofluorescein (DAF-2). Reakce mezi oxidačním produktem NO a DAF-2 vede k tvorbě vysoce fluorescenčního derivátu 4,5-diaminofluoresceintriazolu (DAF-2T). Pro intracelulární detekci NO lze použít derivát DAF-2, např. DAF-2 diacetát (DAF-2 DA), který je po průniku do buněk hydrolyzován intracelulárními esterasami na DAF-2. Detekční limit DAF-2 DA pro NO je  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a výhodou je, že intenzita fluorescence je nezávislá na pH (Planchet a Kaiser, 2006).

Vedle fluorescenční detekce NO s využitím DAF-2 lze dále využít tzv. chemiluminiscenční metodu analýzy NO. Metodou lze stanovit nízké (fyziologické) koncentrace NO nižší než  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , které nelze stanovit DAF-2. Principem metody je reakce NO s  $\text{O}_3$  za vzniku excitovaného oxidu dusičitého ( $\text{NO}_2^*$ ), který při rozpadu emituje světlo (foton). Foton poté dopadá na fotodetektor. Největší výhodou metody je její měřicí rozsah a vysoká selektivita (Planchet a Kaiser, 2006).

Aktivitu enzymu NOS lze měřit spektrofotometricky při 401 nm, principem metody je konverze oxyHb na metHb. Metoda byla prvně popsána v roce 1987, následně byla modifikována pro měření jak *in vitro*, tak *in vivo*. Dále byly popsány inhibitory NOS jako L-NAME a L-NNA. Limit metody je  $20 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$  na 1 g tkáně (Salter a Knowles, 1998).

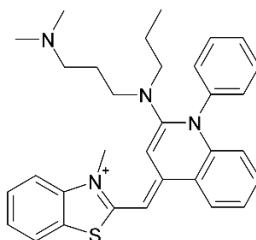
Koncentraci metabolitů NO ( $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ ), lze stanovit prostřednictvím Griessovy metody, popsanou Johanem Peterem Griessem v roce 1897. Po dobu jednoho staletí byla Griessova reakce používána výhradně k detekci bakteriální infekce v urogenitálním traktu. Jakmile byla v roce 1987 objevena funkce NO jako signální molekuly, začala se Griessova metoda používat pro kvantifikaci metabolitů NO v různých tělních tekutinách (např. krev a moč). Principem této metody je stanovení koncentrace  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , které vznikají reakcí NO s  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^-$ . Metodou lze stanovit pouze  $\text{NO}_2^-$ , tudíž  $\text{NO}_3^-$  je nutno nejprve zredukovat na  $\text{NO}_2^-$  redukčním činidlem.  $\text{NO}_2^-$  reagují za kyselých podmínek se sulfanilovou kyselinou za vzniku diazoniového kationtu, který následně

reaguje s 1-naftylaminem za tvorby červeno-fialového azobarviva s absorpčním maximem při 540 nm. Limit detekce metody je  $125 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tsikas, 2007).

## 2.4.2 Molekulárně biologické metody analýzy NOS a GSNOR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) představuje jednu z nejpoužívanějších metod molekulární biologie. Metoda byla objevena Kary Mullisem v roce 1983, který byl za daný objev oceněn Nobelovou cenou (Mullis *et al.*, 1986). Principem metody je zmnožení (amplifikace) určité části molekuly DNA *in vitro*. K amplifikaci dochází během PCR cyklu, který zahrnuje 3 kroky: denaturace dvouvláknové DNA (dsDNA); navázání primerů k jednovláknové DNA (ssDNA); prodloužení. Většinou se cyklus opakuje 40x (Pfaffl, 2004).

Jednou z možných variant PCR je Real-Time PCR (qPCR), které kvantifikuje množství DNA či RNA ve vzorku. Kvantifikace je možná díky detekci množství amplifikovaného produktu v reálném čase. Pro detekci se využívají fluorescenční próby a barviva schopné se vázat na DNA. Výsledná hladina fluorescence je nakonec zachycena detektorem. V rámci diplomové práce bylo jako interkalační DNA barvivo použito SYBR<sup>®</sup> Green I, které se po navázání na dsDNA stává silně fluorescenční, s maximální excitací při 497 nm a emisí při 520 nm. Jedná se o nespecifické cyaninové barvivo, které obsahuje 2 odlišné heterocyklické kruhy (Obr. 14). Barvivo se používá pro kvantifikaci genové exprese, gelovou elektroforézu, průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii (Mackay *et al.*, 2002; Zipper *et al.*, 2004). Expresi vybraných genů (GOI) lze relativně kvantifikovat vůči provozním genům (tzv. „housekeeping geny“, HKG) z důvodu, že exprese HKG se v čase a různých podmínkách nemění. Mezi nejpoužívanější HKG patří  $\beta$ -aktin, elongační faktor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) a tubulin (Pfaffl, 2001). Pro dané vyhodnocení je důležitá hodnota Ct (z anglického výrazu cycle of treshold), která odpovídá cyklu, při kterém fluorescence generovaná během reakce překročí fluorescenční prahovou hodnotu (Bustin a Nolan, 2004).



Obr. 14 Vzorec fluorescenčního barviva SYBR<sup>®</sup> Green I (převzato ze Zipper *et al.*, 2004).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Použité kity**

Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, USA); RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo); Syber® Select Master Mix (Life Technologies, USA); Transcriptor High Fidelity Kit (Roche, Švýcarsko).

#### **3.1.2 Chemikálie**

Bioline (Anglie): HyperLadder™ 50bp.

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue G250.

Lachema (Česká republika): hydroxid draselný; chlorid sodný.

Lach-Ner (Česká republika): aceton; ethanol; formaldehyd; glycerol; kyselina chlorovodíková; methanol.

Promega (USA): 6x blue loading dye.

Serva (Německo): Katalasa z hovězích jater.

Sigma-Aldrich (USA): agarosa; DTT; dihydrogenfosforečnan draselný; dusičnan sodný; dusitan sodný; EDTA; glycin; glycerol; HEPES; hovězí sérový albumin (BSA); hydrogenfosforečnan draselný; jodid sodný; 85% kyselina fosforečná; ledová kyselina octová.

#### **3.1.3 Biologický materiál**

##### **3.1.3.1 Včela medonosná**

Dospělci a larvy včely medonosné kraňské (*A. mellifera carnica*) byly poskytnuty Mgr. Jiřím Danihlíkem, Ph.D z Katedry biochemie PřF UPOL. Jednodenní larvy byly odebrány v červnu roku 2012 ze včelnice u Valašského Meziříčí. Larvy byly následně umístěny do 96-jamkové mikrodestičky, ve které byly 7 dní krmeny mateří kašičkou (skupina kontrola). Další skupiny byly krmeny mateří kašičkou, obsahující 15, 150 a 1500 spor bakterie *P. larvae* ve 20 µl mateří kašičky. Vzorky byly podle počtu spor rozděleny do experimentálních skupin (15, 150 a 1500), přičemž každá skupina obsahovala 72 takto ošetřených larev. Po 7 dnech byly larvy v mikrodestičkách umístěny do mrazáku při teplotě -80 °C. Metodika přípravy krmiva byla použita dle Gregorc a Ellis (2011).



Úmrtnost byla stanovena podle velikosti larev v destičce. Larvy, které nebyly v mateří kašičce téměř viditelné a nedošlo k jejich růstu byly považovány za mrtvé.

Dospělé včely (*A. mellifera carnica*) pocházely z Pokusného včelína Kývalka Výzkumného ústavu včelařského. Tyto včely byly 1. den zaizolovány do rámků pro vylíhnutí mladušek. Po vylíhnutí byly 3. den mladušky označeny bílou barvou na hrudi. Označené včely byly vráceny zpět do úlu, kde žily 10 dní při normálních podmínkách (do 13. dne). Třináctý den byly včely rozděleny do 4 skupin: 1) včely, které byly uspány CO<sub>2</sub> a následně zmrazeny při teplotě -80 °C (skupina CO<sub>2</sub>); 2) včely, které byly uspány CO<sub>2</sub>, poté jim bylo pod kutikulu vpíchnuto 5 µl sterilního roztoku fosfátového pufru (PBS) a následně byly tyto včely zamrazeny při teplotě -80 °C (skupina PBS); 3) včely, které byly uspány CO<sub>2</sub>, poté jim bylo pod kutikulu vpíchnuto 5 µl bakteriální suspenze *P. larvae* a *E. coli* v PBS o koncentraci 1·10<sup>6</sup> buněk v 1 ml suspenze. Včely z této skupiny byly po dobu 24 hodin drženy v inkubátoru při teplotě 35 °C v plastových klíčkách. Po této době byly včely usmrceny mrazem a uchovány při teplotě -80 °C (skupina bakterie); 4) včely, které byly pouze zamrazeny při teplotě -80 °C (kontrola). Experiment a přepis izolované RNA vzorků do cDNA reverzní transkriptasou prováděl Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D v roce 2018. Včely, které nebyly použity pro izolaci RNA, byly použity pro měření aktivit NOS a GSNOR.

Pro měření aktivity NOS a stanovení koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> byl použit další vzorek včel. Jednalo se o dospělé včely (*A. mellifera carnica*), které byly krmeny v klíčkovém pokusu v laboratorních podmínkách: 1) pouze sacharosou; 2) sacharosou a LPS (skupina Sach + LPS); 3) sacharosou, LPS a aminokyselinami (skupina Sach + LPS +AMK). AMK byly přidány k roztoku sacharosy tak, aby jejich konečná koncentrace byla 10 mmol·l<sup>-1</sup>. Jednalo se o tyto AMK: Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Met, Val, Thr, Arg a Lys. Daný roztok byl připraven podle Paoli *et al.*, 2014. Roztok obsahující LPS byl připraven tak, že k 5 ml roztoku obsahujícího sacharosu a AMK o koncentraci 10 mmol·l<sup>-1</sup> byl přidán 1 mg LPS tak, aby výsledná koncentrace LPS v roztocích byla 200 µg·ml<sup>-1</sup> (Negri *et al.*, 2017). Tyto včely mi byly poskytnuty již ve zmraženém stavu. Popsaný experiment prováděl Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D v roce 2017.

### 3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, USA); chlazená centrifuga

5415R (Eppendorf, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); Elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); Flowbox Bioban (SterilSafe, Itálie); Inkubátor EN 120 (Nüve, Turecko); magnetický stojánek; mikrodestičkový reader Synergy-HT (Bio-Tek, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika); NO analyzátor Eco Physics CLD88 etNO (ECO PHYSICS, Švýcarsko); PCR termocykler (Eppendorf, Německo); spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex mixer (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac™ 300 (Bio-Rad, USA).

### **3.3 Experimentální metody**

#### **3.3.1 Extrakce vzorků**

##### **3.3.1.1 Extrakce vzorků pro stanovení NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

Vzorky byly homogenizovány ve vychlazené třecí misce s pískem podle Chandok *et al.*, (2003). Ke vzorku byl přidán extrakční pufr v poměru 2:1 (2 ml extrakčního pufru na 1 g vzorku). Extrakční pufr byl připraven ze zásobního pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> HEPES, 2 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, 0,5% PVPP a 10% glycerol), ke kterému byl přidán DTT (výsledná koncentrace 2 mmol·l<sup>-1</sup>) a PMSF (výsledná koncentrace 2 mmol·l<sup>-1</sup>). Homogenizovaný extrakt byl centrifugován 10 min při 16000 RPM a 4 °C. Supernatanty vzorků byly napipetovány do mikrozkušavek a uloženy v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

##### **3.3.1.2 Extrakce vzorků pro měření aktivity NOS**

Extrakční postup byl použit jak pro spektrofotometrické stanovení aktivity NOS, tak pro stanovení aktivity NOS pomocí NO analyzátoru. Zásobní pufr byl připraven přidáním 476 mg HEPES, 58 mg EDTA, 0,5 g PVPP a 10 g glycerolu do deionizované vody. Vzniklý roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Těsně před extrakcí bylo k 10 ml zásobního pufru přidáno 7,7 mg DTT, 4,8 mg AEBSF (pefabloc) a 10 ul zásobního roztoku aprotininu. Zásobní roztok aprotininu byl připraven rozpuštěním 1 mg aprotininu v 1 ml zásobního pufru. Konečná koncentrace složek v reakčním roztoku 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.

Jednotlivé vzorky byly zváženy a poté homogenizovány ve vychlazené třecí misce, kde byl k nim přidán extrakční pufr v poměru 2:1 (2 ml extrakčního pufru na 1 g vzorku).

Homogenizovaný vzorek byl centrifugován 10 min při 16000 RPM a 4 °C. Supernatanty extraktů vzorků byly pipetovány do mikrozkušavek a uloženy v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

### **3.3.1.3 Extrakce vzorků pro měření aktivity GSNOR**

Pro extrakci byly použity celá včelí těla. K těmto včelám byl přidán extrakční pufr (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> (4-2-aminoethyl) benzenesulfonyl-fluorid-hydrochlorid (AEBSF)) v poměru 2:1 (2 ml extrakčního pufru na 1 g vzorku včelích těl). Homogenizace probíhala ve třecí misce vychlazené na ledu. Homogenizovaný vzorek byl centrifugován 10 min při 16000 RPM a 4 °C. Supernatanty vzorků byly pipetovány do mikrozkušavek a uloženy v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

## **3.3.2 Příprava činidel pro použité metody**

### **3.3.2.1 Příprava oxyhemoglobinu**

OxyHb byl připraven podle aplikačního listu firmy Sigma. Byl připraven 20 mmol·l<sup>-1</sup> fosfátový pufr (pH 7,0) smícháním 12,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 7,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, navážka byla doplněna deionizovanou vodou do 1 l, následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 7,0. Fosfátovým pufrem byla promyta kolona obsahující Sephadex G-25. Dále bylo na kolonu nanášeno 300 mg dithioničnanu sodného rozpuštěného ve 2 ml fosfátového pufru. Po zatečení roztoku byl na kolonu nanášen 1 ml fosfátového pufru. Po jeho zatečení byl na kolonu nanášen roztok, připravený rozpuštěním 150 mg bovinního hemoglobinu v 5 ml fosfátového pufru. Poté kolonou procházel fosfátový pufr a byl zachycen sytě rudý eluát. Eluát byl 10 min probubláván vzduchem a poté byl umístěn do dialyzačního střívka, ve kterém byl ponechán 8 hodin. Jako dialyzační roztok byl použit fosfátový pufr. Dialyzovaný roztok byl rozpipetován po 500 μl do mikrozkušavek a uchován v mrazícím boxu při teplotě -20 °C. Koncentrace připraveného oxyHb byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 560, 576 a 630 nm. Po odečtení absorbance při daných vlnových délkách byla koncentrace připraveného oxyHb stanovena podle vzorce:  $(1,013 \cdot A_{576} - 0,327 \cdot A_{630} - 0,7353 \cdot A_{560}) \cdot 10^2$ . Výsledná koncentrace oxyHb byla stanovena jako 12,36 μmol·l<sup>-1</sup>.

### **3.3.2.2 Příprava S-nitrosoglutathionu**

GSNO byl připraven podle článku Moore a Mani (2002). Navážka 614 mg glutathionu (GSH) byla rozpuštěna ve 3 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl. Ke vzniklému roztoku bylo za stálého

míchání přidáno 138 mg NaNO<sub>2</sub>. Vzniklá reakční směs byla ponechána 40 min na ledové lázni za vzniku červené sraženiny. Sraženina byla nejprve odsáta na Büchnerově nálevce a poté byla promyta 2x 10 ml vychlazené deionizované vody, 2x 10 ml vychlazeného acetonu a 2x 10 ml vychlazeného diethyletheru. Promytá sraženina byla seškrábnuta z filtračního papíru na alobal a ponechána v exikátoru ve tmě pro vysušení. Vysušený produkt byl uchován v mrazícím boxu při -20 °C. Bylo připraveno 258 mg GSNO. Reakcí by teoreticky mělo vzniknout 672 mg GSNO, tudíž výtěžek reakce představoval 38,5 %.

### 3.3.3 Spektrofotometrické metody

#### 3.3.3.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradforda

Principem metody je tvorba stabilního komplexu, díky adsorpci barviva Coomasie Brilliant Blue G250 na molekuly proteinů v kyselém prostředí. Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 50 ml 85% kyseliny fosforečné a ve 25 ml methanolu. Roztok byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven zředěním zásobního roztoku Coomasie Brilliant Blue deionizovanou vodou v poměru 1:4. Do každé jamky 96 jamkové destičky bylo nanášeno 45 µl deionizované vody, poté 5 µl extraktu, či standardu BSA a nakonec bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Destička byla jemně protřepána a ponechána inkubaci 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla změřena absorbance při 450 a 595 nm. Jako standard byl použit BSA v rozmezí 0 - 1,2 mg·ml<sup>-1</sup>. Měření bylo prováděno na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT v triplicátech. Kalibrační rovnice byla vyhodnocena lineární regresí závislosti poměru absorbance při 595 a 450 nm ku koncentraci BSA. Z kalibrační přímky byla odečtena její rovnice, která byla upravena do tvaru:  $x = (y + 0,0145)/0,0016$ , při dosazení poměru absorbance při 595 a 450 nm za hodnotu y dostaneme koncentraci proteinů ve vzorku (µg·ml<sup>-1</sup>; Bradford, 1976; Zor a Selinger 1996).

#### 3.3.3.2 Stanovení koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Griessovou metodou

Stanovení bylo provedeno dle Miranda *et al.*, (2001). Jedná se o nepřímou kolorimetrickou metodu pro stanovení NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, které vznikají reakcí NO s O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Principem je tvorba diazoniové soli v kyselém prostředí a její následná kopulace s N-(1-naftyl)etylendiaminem (NED) za tvorby azobarviva s λ<sub>max</sub> 543 nm. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> je nutné nejprve převést na NO<sub>2</sub><sup>-</sup> redukcí kovem. Z důvodu nepřítomnosti hemoglobinu u hmyzu, jsou NO<sub>2</sub><sup>-</sup> hlavním stabilním produktem autooxidace NO v tělních tekutinách.

Pro metodu byly připraveny 2 reakční roztoky: roztok Griess A byl připraven rozpuštěním 1 g sulfanilamidu v 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Vzniklý roztok byl následně zfiltrován a uchován v lednici při teplotě 4 °C. Roztok 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  byl připraven rozpuštěním 5,9 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve 94,1 ml deionizované vody. Roztok Griess B byl připraven rozpuštěním 100 mg NED ve 100 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl následně zfiltrován a uchován v lednici při teplotě 4 °C. Pro kalibrační řadu byl připraven  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  rozpuštěním 6,9 mg  $\text{NaNO}_2$  ve 100 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$ .  $\text{NaNO}_3$  o koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 8,5 mg  $\text{NaNO}_3$  ve 100 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$ .

Měření probíhalo v mikrodestičkách na readeru Synergy-HT. Kalibrační řada pro  $\text{NO}_2^-$  byla připravena postupným ředěním  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  na koncentraci 10, 20, 30, 40, 50, 80 a  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kalibrační řada pro  $\text{NO}_3^-$  byla připravena postupným ředěním zásobního  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  na koncentraci 20, 50, 100, 200, 300, 400 a  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Pro stanovení  $\text{NO}_2^-$  bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu\text{l}$  standardu, nebo vzorku (jako blank bylo použito 50  $\mu\text{l}$  extrakčního pufu). Dále bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  deionizované  $\text{H}_2\text{O}$  a 100  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného Griessova činidla (smíchané činidlo Griess A a Griess B v poměru 1:1). Destička byla promíchána a inkubována 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byla změřena absorbance při 540 nm.

Pro stanovení  $\text{NO}_3^-$  bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu\text{l}$  standardu, nebo vzorku (jako blank bylo použito 50  $\mu\text{l}$  extrakčního pufu). Dále bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  činidla Griess A, 50  $\mu\text{l}$   $\text{VdCl}_3$  (navážka 40 mg na 5 ml  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{HCl}$ ) a 50  $\mu\text{l}$  činidla Griess B. Destička byla promíchána a poté 3 hodiny inkubována v inkubátoru při teplotě 45 °C. Po inkubaci byla změřena absorbance při 540 nm, která však odpovídá součtu koncentrace  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ . Koncentrace  $\text{NO}_3^-$  se stanoví po odečtení koncentrace  $\text{NO}_2^-$ . Pro statistické vyhodnocení výsledků byl u vzorků nejprve proveden test normálního rozdělení (kvantil-kvantil graf; Q-Q graf). Při nenormálním rozdělení těchto vzorků následoval Kruskal-Wallisův test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### 3.3.3.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity NOS

Principem metody je reakce oxyHb ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se vznikajícím NO za tvorby metHb ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a  $\text{NO}_3^-$ . Nárůst absorbance je díky konverzi oxyHb na metHb a její rychlost je přímo úměrná množství vznikajícího NO. Citlivost metody je zaručena výběrem správné vlnové délky, při které je rozdíl mezi absorbancí oxyHb a metHb největší, tj. 401 nm (Hevel a Marletta, 1994).

Spektrofotometrické stanovení aktivity NOS bylo provedeno podle Hevel a Marletta (1994). Pro měření bylo připraveno 100 ml zásobního pufru obsahujícího 2,38 g HEPES a 21 mg octanu hořečnatého, pH roztoku bylo upraveno NaOH na hodnotu 7,5. Rozpuštěním 147 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  v 10 ml deionizované vody byl připraven roztok  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ . Roztoky byly uchovány v lednici při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dále byl připraven  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  L-arginin (navážka 1,05 g na 100 ml zásobního pufru),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  L-norvalin (navážka 0,6 g na 100 ml zásobního pufru), SOD (navážka 5 mg na 1,5 ml zásobního pufru), CAT (navážka 20 mg na 2 ml zásobního pufru),  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  FAD (navážka 4,2 mg na 500  $\mu\text{l}$  deionizované vody),  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  FMN (navážka 2,4 mg na 500  $\mu\text{l}$  deionizované vody),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  kalmodulin (navážka 60  $\mu\text{g}$  na 3,53 ml deionizované vody). Tyto roztoky byly uchovány v mrazícím boxu při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . L-norvalin se do reakční směsi přidává z důvodu inhibice arginasy (EC 3.5.3.1), která spotřebovává L-arginin. SOD a CAT se do reakční směsi přidávají pro rozklad ROS, které by mohly reagovat s oxyHb.

Před měřením bylo k 10 ml zásobního HEPES pufru přidáno 1 mg DTT, 100  $\mu\text{l}$   $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{l}$   $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  L-argininu, 200  $\mu\text{l}$   $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  L-norvalinu, 10  $\mu\text{l}$   $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  FAD, 10  $\mu\text{l}$   $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  FMN a 10  $\mu\text{l}$   $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  kalmodulinu. Dále byl připraven  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADPH rozpuštěním 0,55 mg v 1 ml zásobního pufru. K danému roztoku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$   $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztoku  $\text{BH}_4$ . Dále byl připraven ředěný roztok oxyHb, který byl připraven zředěním připraveného oxyHb (příprava viz. kapitola 3.3.2.1) deionizovanou vodou v poměru 1:4.

Měření, při němž se odečítala absorbance při 401 nm probíhalo v mikrodestičkách na readeru Synergy-HT. Do jamky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  reakčního pufru, 5  $\mu\text{l}$  CAT, 5  $\mu\text{l}$  SOD, 30  $\mu\text{l}$  zředěného oxyHb a 30  $\mu\text{l}$  NADPH +  $\text{BH}_4$ . Reakce byla iniciována přidávkem 50  $\mu\text{l}$  vzorku. V případě blanku byl vzorek nahrazen deionizovanou vodou. Reakce probíhala při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 5 min.

Metoda byla využita pro optimalizaci aktivity NOS, pro stanovení  $K_m$  a  $V_{\max}$  NOS a pro stanovení závislosti aktivity NOS na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Pro stanovení  $K_m$  byl použit L-arginin v rozmezí koncentrace  $500\text{-}1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro závislost aktivity NOS na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů byl použit L-arginin o koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , během měření se měnila pouze koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v rozmezí  $0\text{-}5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro stanovení, zda jsou změny aktivity NOS významné, byl použit software Statistica. U vzorků byl nejprve proveden

test normálního rozdělení (Q-Q graf). Při normálním rozdělení těchto vzorků následovala one-way ANOVA a Post-hoc analýza pomocí Bonferroniho testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Při nenormálním rozdělení následoval Kruskal-Wallisův test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### 3.3.3.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

Pro měření byl použit  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 7,5), který byl připraven navážením 0,606 g Tris a 0,2 g Triton-X100, navážka byla rozpuštěna v 75 ml deionizované vody. Po úpravě pH na 7,5 byl roztok doplněn po 100 ml deionizovanou vodou. Před měřením byl připraven  $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADH rozpuštěním 1,42 mg NADH v 1 ml deionizované vody. Dále byl připraven  $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSNO rozpuštěním 1,34 mg GSNO v 1 ml deionizované vody.

Měření, při němž se odečítala absorbance při 340 nm probíhalo v mikrodestičkách na readeru Synergy-HT. Byla použita destička pro měření v UV oblasti. Do jamky bylo napipetováno 225  $\mu\text{l}$  Tris-HCl, 15  $\mu\text{l}$  vzorku a 30  $\mu\text{l}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADH. Reakce byla odstartována přidávkem 30  $\mu\text{l}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSNO. V případě blanku byl GSNO nahrazen deionizovanou vodou. Reakce probíhala při 30 °C po dobu 5 min. V rámci měření inhibice GSNOR inhibitorem N6022 bylo přidáno pouze 200  $\mu\text{l}$  Tris-HCl, dále bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  inhibitoru N6022 o různé koncentraci, poté bylo přidáno 15  $\mu\text{l}$  vzorku a 30  $\mu\text{l}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADH. Reakce byla odstartována přidávkem 30  $\mu\text{l}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSNO. V případě blanku byl GSNO nahrazen deionizovanou vodou. Koncentrace inhibitoru se pohybovala v rozsahu 1-300  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Metoda byla použita pro stanovení aktivity GSNOR ve včelách a larvách, pro stanovení  $K_m$ ,  $V_{\max}$  GSNOR a pro stanovení  $IC_{50}$  pro inhibitor GSNOR N6022.

### 3.3.4 Stanovení aktivity NOS pomocí NO analyzátoru

Příprava vzorků byla provedena stejným způsobem jako pro spektrofotometrické stanovení aktivity NOS (kapitola 3.3.1.2). Principem metody je smíchání reakční směsi se vzorkem, přičemž se vzniklý roztok napipetuje do dvou mikrozkušavek. Následně je jedna zkumavka inkubována při 37 °C po dobu 30 min a poté dojde k deproteinaci vzorku, zatímco ve druhé zkumavce se provede deproteinaci vzorku ihned. Nakonec se porovnává množství vzniklých  $\text{NO}_2^-$  v obou zkumavkách pomocí NO analyzátoru (Laver *et al.*, 2008).

Pro měření byly použity stejné roztoky jako v kapitole 3.3.3.2. Reakční roztok byl připraven přidáním 100  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-argininu, 200  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-norvalinu, 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  FAD, 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  FMN a 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kalmodulinu k 10 ml zásobního pufru (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES). V rámci měření inhibice NOS byl reakční roztok připraven přidáním 100  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-argininu, 200  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-norvalinu, 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  FAD, 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  FMN a 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kalmodulinu k 8,34 ml zásobního pufru (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES). Dále byl připraven 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADPH rozpuštěním 0,55 mg NADPH v 1 ml zásobního pufru. K danému roztoku bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  8  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku  $\text{BH}_4$ . Roztok 0,8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH byl připraven rozpuštěním 3,2 g NaOH v deionizované vodě na konečný objem 100 ml. Roztok 16%  $\text{ZnSO}_4$  byl připraven rozpuštěním 28,49 g  $\text{ZnSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

Pro samotnou reakci bylo do 1,5 ml mikrozkušavky napipetováno 120  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného reakčního roztoku 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 95  $\mu\text{l}$  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 25  $\mu\text{l}$  35  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  inhibitoru (konečný objem 150  $\mu\text{l}$ ). Jako inhibitory byly použity: L-NAME, 7-nitroindazol, S-ethylisothiomočovina a aminoguanidin.

K připravenému roztoku bylo následně přidáno 150  $\mu\text{l}$  extraktu a roztok byl promíchán. Poté bylo odebráno 150  $\mu\text{l}$  vzorku do druhé 1,5 ml mikrozkušavky. Ke 150  $\mu\text{l}$  vzorku v první mikrozkušavce bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a 100  $\mu\text{l}$  16%  $\text{ZnSO}_4$ . Vzorek byl následně centrifugován při 16000 RPM a laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po centrifugaci byl vzorek uchován v mrazícím boxu při teplotě  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Zbýlých 150  $\mu\text{l}$  vzorku ve druhé mikrozkušavce bylo inkubováno 30 min při teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a 100  $\mu\text{l}$  16%  $\text{ZnSO}_4$ . Vzorek byl následně centrifugován při 16000 RPM a laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po centrifugaci byl vzorek uchován v mrazícím boxu při teplotě  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Měření probíhalo na NO analyzátoru CLD88 podle Laver *et al.*, (2008). Před měřením byl připraven zásobní roztok NaI rozpuštěním 150 mg NaI v 1,5 ml deionizované vody. Těsně před měřením bylo 500  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku NaI přidáno ke 4,5 ml ledové kyseliny octové. Vzniklý reakční roztok byl přidán do reakční nádoby NO analyzátoru. Měření koncentrace  $\text{NO}_2^-$  probíhalo po napipetování 10  $\mu\text{l}$  vzorku do reakční nádoby.



Kalibrační řada byla připravena postupným ředěním  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  na 100, 200, 300, 400, 500,  $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hodnota plochy píku byla odečtena v programu EdaQ CHART. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

### **3.3.5 Stanovení koncentrace RSNOs pomocí NO analyzátoru**

Jako extrakční činidlo byl použit roztok Griess A (příprava kap. 3.3.3.2), z důvodu zamezení interference metody s přítomnými  $\text{NO}_2^-$ , jejichž koncentrace je vyšší než koncentrace RSNOs. Před měřením byl vždy připraven čerstvý reakční roztok, kdy bylo naváženo 52,5 mg KI a 33,6 mg  $\text{I}_2$ . Navážka byla rozpuštěna ve 2,1 ml deionizované vody a 7,9 ml ledové kyseliny octové. Roztok byl poté ponechán 15 min na magnetické míchačce.

Vzorek byl připraven jeho homogenizací ve třecí misce, kde byl ke vzorku přidán extrakční pufr v poměru 2:1 (2 ml extrakčního pufru na 1 g vzorku). Vzorek byl po homogenizaci převeden do mikrozkuhavky, ve které byl centrifugován při 16000 RPM a teplotě  $4^\circ\text{C}$  po dobu 10 min. Supernatant byl nakonec převeden do čisté mikrozkuhavky.

Měření probíhalo na NO analyzátoru CLD88. Nejprve byl do reakční nádoby přidán čerstvý reakční roztok, po ustálení základní hladiny bylo do reakční nádoby nanášeno  $10 \mu\text{l}$  připraveného vzorku. Pro dané stanovení byly připraveny 3 kalibrační řady: ( $10\text{-}1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1000\text{-}200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $100\text{-}1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO). Hodnota plochy píku byla odečtena v programu EdaQ CHART. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

### 3.3.6 Metody analýzy genové exprese

V rámci PCR metody byla nejprve izolována RNA ze 40 vzorků sedmidenních larev včely medonosné (*A. mellifera carnica*) pomocí kitu Qiagen. DNA přítomná ve vzorku byla rozložena DNAsou (EC 3.1.21.1), přečištěná RNA byla poté zkoncentrována pomocí magnetických kuliček. RNA byla dále přepsána do cDNA reverzní transkriptasou (EC 2.7.7.49), poté byla koncentrace cDNA vzorků zředěna tak, aby amplifikace genu EF-1 $\alpha$  překročila stanovenou mez Ct při hodnotě 20. Nakonec bylo provedeno qPCR pro GOI, získané hodnoty exprese GOI byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica.

#### 3.3.6.1 Roztoky použité v rámci PCR metody

Pro GITC pufr byl připraven roztok 50 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,4) rozpuštěním 2,42 g Tris ve 200 ml RNase-free vody, pH roztoku bylo upraveno koncertovanou HCl. Dále bylo naváženo 124,16 g guanidium thiokyanátu a 1,169 g EDTA, ke kterým bylo přidáno 2,6 ml Triton X-100. Roztok byl doplněn do 198 ml Tris-HCl pufrém. Po autoklávování byly k roztoku přidány 2 ml 2-merkapt ethanolu. Pufry RLT, RW1 a RPE byly součástí komerčního kitu značky Qiagen. TAE pufr (50x koncertovaný) byl připraven přidáním 28,55 ml ledové kyseliny octové a 50 ml 0,5 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> EDTA ke 121 g Tris. Vzniklý roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 500 ml. Roztok 0,5 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> EDTA byl připraven navážením 14,61 g EDTA a doplněním deionizovanou vodou na 100 ml.

#### 3.3.6.2 Izolace RNA ze vzorků

Vzorky byly připraveny ze sedmidenních larev, které byly infikovány různým počtem spor *P. larvae*. Pro izolaci byl použit komerční Plant Mini Easy kit značky Qiagen. Do mikrozkuhavky byly vloženy 2 larvy, ke kterým bylo přidáno 150  $\mu$ l GITC pufru a 10 skleněných kuliček. Vzorek byl homogenizován v kuličkovém mlýnku, dále bylo ke vzorku přidáno 150  $\mu$ l GITC pufru a vzorek byl opět homogenizován. Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány 5 min při 16000 RPM a laboratorní teplotě. Ze vzorku bylo odebráno 100  $\mu$ l supernatantu, ke kterému bylo přidáno 350  $\mu$ l RLT pufru obohaceného o 2-merkapt ethanol (RLT pufr byl s 2-merkapt ethanolem smíchán v poměru 100:1). Promíchaný roztok byl nanesen na fialovou kolonku (součást kitu; slouží pro uvolnění DNA a RNA z jádra), která byla následně centrifugována 2 min při 16000 RPM a laboratorní teplotě. Supernatant byl poté napipetován do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky, kde bylo ke vzorku přidáno 225  $\mu$ l 96% ethanolu. Vzorek byl pro řádném promíchání přenesen na růžovou kolonku (součást kitu; váže DNA a RNA, naopak soli a jiné

nenavázané látky jsou odstraněny), ve které byl centrifugován 2 min při 8000 RPM a laboratorní teplotě. Kolonka byla promyta 700  $\mu$ l RW1 pufru a opět centrifugována při 8000 RPM po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Dále byla kolonka promyta 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugována při 8000 RPM po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě, následně byla kolonka opět promyta 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugována při 8000 RPM po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Vrchní část kolonky byla přenesena do 2 ml mikrozkušavky a centrifugována při 16000 RPM po dobu 2 min při laboratorní teplotě, mikrozkušavka byla následně pootočena a znovu centrifugována při 16000 RPM po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Nakonec byla vrchní část kolonky přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky a na kolonku bylo nanášeno 95  $\mu$ l RNase-free vody. Po uplynutí 10 min byla mikrozkušavka centrifugována při 8000 RPM po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Vzorek obsahující izolovanou RNA byl napipetován do nové 0,5 ml mikrozkušavky. Koncentrace a kvalita izolované RNA byly stanoveny na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT. Pro stanovení byly použity 2  $\mu$ l vzorku. RNA je správně izolována, pokud poměr absorbcí při 260 a 280 nm ( $A_{260/280}$ ) odpovídá hodnotě v rozmezí 1,8 – 2,2. Při hodnotě  $A_{260/280}$  nižší než 1,8 se jedná o kontaminaci proteiny.

Pro odstranění DNA byla použita DNAasa (kit TURBO DNA-free™ značky Thermo Fisher Scientific). K 95  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 10  $\mu$ l reakčního pufru a 1  $\mu$ l Turbo DNAasy. Připravený vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 30 min. Dále byl ke vzorku přidán 1  $\mu$ l Turbo DNAasy a vzorek byl opět inkubován při 37 °C po dobu 30 min.

RNA byla přečištěna pomocí suspenze magnetických kuliček značky Agencourt RNAClean XP a magnetického stojánu. Ke 100  $\mu$ l RNA bylo přidáno 50  $\mu$ l suspenze magnetických kuliček a 40  $\mu$ l isopropanolu. Vzorek byl důkladně promíchán pipetou a následně byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Vzorek byl dále umístěn na magnetický stojánek, kde došlo k usazení kuliček a k následnému odpipetování supernatantu. Magnetické kuličky byly promyty 200  $\mu$ l 70% RNase-free ethanolu (3x opakování). Po posledním odpipetování ethanolu byl vzorek vysušen ve flow boxu po dobu 10 min. Ke kuličkám bylo přidáno 32  $\mu$ l RNase-free vody a po důkladném promíchání byl vzorek 10 min inkubován. Po usazení magnetických kuliček bylo 32  $\mu$ l vzorku přepipetováno do sterilní 0,5 ml mikrozkušavky. Koncentrace a kvalita izolované a přečištěné RNA byly stanoveny na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT. RNA je správně přečištěna pohybuje-li se  $A_{260/280}$  v rozmezí 1,8 – 2,2.

### 3.3.6.3 Kontrola integrity RNA

Kontrola integrity izolované a přečištěné RNA byla provedena pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Pro elektroforézu byla připravena 1,1% agarosa v TAE (1x) pufru, ve které byl pro vizualizaci RNA rozpuštěn GelRed (4  $\mu$ l na 100 ml 1,1% agarosy). Vzorek pro elektroforézu byl připraven smícháním 6  $\mu$ l RNA s 1  $\mu$ l loading dye, jako standard byl použit 50 bp marker (Bioline), kterého byly nanесeny 3  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala 60 min při konstantním napětí 80 V.

### 3.3.6.4 Přepis RNA do cDNA prostřednictvím reverzní transkriptasy

Přepis izolované a přečištěné RNA do cDNA byl proveden pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis značky Roche. V první fázi byl vzorek připraven smícháním 1  $\mu$ l oligo dT primerů s 10,4  $\mu$ l izolované RNA. Maximální koncentrace izolované RNA je 390 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>. Daná hranice odpovídá maximální kapacitě transkriptasy. Inkubace reakční směsi probíhala v termocykléru 10 min při teplotě 65 °C.

Ve druhé fázi přepisu byl připraven reakční premix (Tab. 1). Následně bylo odebráno 8,6  $\mu$ l premixu, ke kterému bylo přidáno 11,4  $\mu$ l vzorku z první fáze. Vzorek byl inkubován 30 min při teplotě 55 °C, následně proběhla inaktivace reverzní transkriptasy při 86 °C po dobu 5 min. Vzorek byl následně chlazený při 4 °C. Veškeré kroky probíhaly v termocykléru. Nakonec bylo 20  $\mu$ l přepsané cDNA doplněno RNase-free vodou na konečný objem 100  $\mu$ l.

Koncentrace cDNA byla stanovena na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT. Pohybuje-li se  $A_{260/280}$  v rozmezí 1,8 – 2,0 znamená to, že cDNA je správně přepsaná, při hodnotě  $A_{260/280}$  nižší než 1,8 se jedná o kontaminaci proteiny.

Tab. 1 Složení reakčního premixu pro druhou fázi přepisu RNA do cDNA (konečný objem 8,6  $\mu$ l)

Složka	Objem složky ( $\mu$ l)
Reakční pufr (5x koncentrovaný; vialka 2)	4
Inhibitor RNasy (vialka 3)	0,5
Směs deoxynukleotidů (10 mmol·l <sup>-1</sup> ; vialka 4)	2
DTT (vialka 7)	1
Reversní transkriptasa (vialka 1)	1,1

### 3.3.6.5 Endpoint PCR reakce pro kontrolu přepisu

Byla připravena reakční směs (Tab. 2). Jako primer byl použit EF-1 $\alpha$ . Následně bylo odebráno 12  $\mu$ l reakční směsi, ke které bylo přidáno 0,5  $\mu$ l cDNA připravené podle kapitoly 3.3.4.4. Na termocykléru byl vybrán program GOTAQ (1. krok: 95 °C, 2 min; 2. krok: 95 °C, 40 s; 3. krok: 60 °C, 30 s; 4. krok: 72 °C, 60 s; krok 2-4 opakovat 34x; 5. krok: 72 °C, 5 min; 6. krok: 4 °C,  $\infty$  min).

Tab. 2 Objemy jednotlivých složek pro přípravu premixu pro jednu reakci endpoint PCR (konečný objem 12  $\mu$ l)

Složka	Objem složky ( $\mu$ l)
RNase-free voda	4,75
10 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> primer pro EF-1 $\alpha$ (reverse)	0,5
10 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> primer pro EF-1 $\alpha$ (forward)	0,5
Go-Taq polymerase premix	6,25

Pro kontrolu produktů endpoint PCR byla použita agarosová elektroforéza. Pro elektroforézu byla připravena 3% agarosa v TAE (1x) pufru. V gelu byl pro vizualizaci cDNA rozpuštěn GelRed (4  $\mu$ l na 100 ml 3% agarosy). Na gel bylo naneseno 10  $\mu$ l vzorku připraveného endpoint PCR. Jako standard byl použit 50 bp marker Bioline, kterého byly napipetováno 3  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala 60 min při konstantním napětí 80 V.

### 3.3.6.6 První fáze qPCR

Koncentrace cDNA ve vzorcích byla před měřením zředěna na 65 ng $\cdot$  $\mu$ l<sup>-1</sup> kvůli maximální kapacitě DNA polymerasy. Vzorek nebyl ředěný, pokud byla koncentrace cDNA nižší než 65 ng $\cdot$  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Následně byla připravena reakční směs, ve které byl jako primer použit EF-1 $\alpha$  o koncentraci 3,33 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> (Tab. 3). Do každé jamky bylo přidáno 3,4  $\mu$ l reakční směsi, po napipetování všech potřebných jamek bylo k reakční směsi přidáno 1,6  $\mu$ l cDNA. Termocyklér byl nastaven na tyto parametry (1. krok: 95 °C, 10 min; 2. krok: 95 °C, 15 s; 3. krok: 60 °C, 60 s; krok 2 a 3 opakovat 34x; 4. krok : 60 °C, 1 min; 5. krok: 95, 5 °C, 10 s; 6. krok: 0,5 °C,  $\infty$  s).

Tab. 3 Objemy jednotlivých složek pro přípravu reakční směsi pro jednu reakci qPCR (konečný objem 5  $\mu$ l)

Složka	Objem složky ( $\mu$ l)
Syber Select Master Mix	2,5
3,33 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> primer (reverse)	0,45
3,33 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> primer (forward)	0,45

Po dokončení první fáze qPCR byla u všech vzorků stanovena hodnota Ct pro EF-1 $\alpha$ . Koncentrace cDNA byla poté zředěna tak, aby hodnota Ct pro EF-1 $\alpha$  odpovídala 20. Pro ředění byla využita rovnice: faktor ředění =  $2^{20 - Ct}$  (vzorek). Vzorky byly poté zředěny RNase-free vodou podle vypočteného faktoru ředění. Vzorky, v nichž byla koncentrace cDNA nízká (Ct > 20), zředěné nebyly.

### 3.3.6.7 Druhá fáze qPCR

Pro diplomovou práci byly použity primery pro tyto geny: *AKTIN*; *EF-1 $\alpha$* ; *AmNOS*; *GSNOR*; *JUVENILNÍ HORMON ESTERASA (JHE)*; *VITELLONGENIN* (Tab. 4). Do každé jamky PCR destičky bylo přidáno 3,4  $\mu$ l reakční směsi (Tab. 3), po napipetování všech potřebných jamek bylo k reakční směsi přidáno 1,6  $\mu$ l cDNA. Termocyklér byl nastaven na tyto parametry (1. krok: 95 °C, 10 min; 2. krok: 95 °C, 15 s; 3. krok: 60 °C, 60 s; krok 2 a 3 opakovat 34x; 4. krok: 60 °C, 1 min; 5. krok: 95,5 °C, 10 s; 6. krok: 0,5 °C,  $\infty$  min). Po dokončení PCR byly odečteny hodnoty Ct vybraných genů.

Nakonec byla pomocí hodnot Ct stanovena relativní exprese čtyř GOI vůči geometrickému průměru dvou HKG (*AKTIN* a *EF-1 $\alpha$* ). Ke statistickému vyhodnocení byl použit software Statistica. U vzorků byl proveden test normálního rozdělení (Q-Q graf). U všech vzorků bylo nenormální rozdělení, tudíž následoval Kruskal-Wallisův test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Tab. 4 Primery použité pro sledování exprese genů (Lourenço *et al.*, 2008; Ament *et al.*, 2011; Kubienová *et al.*, 2013; Negri *et al.*, 2014)

Peptid/ protein	Typ genu	Název genu	Velikost ampliko nu (bp*)	Primer 5' $\rightarrow$ 3'
Aktin	HKG	<i>Arp1</i>	155	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG R: AGAATTGACCCACCAATCCA
EF-1 $\alpha$	HKG	<i>EF-1a</i>	153	F: GGAGATGCTGCCATCGTTAT R: CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT
AmNOS	GOI	<i>AmNOS</i>	106	F: TCCACTCGCAGGTACTTTCC R: TCTGGAGGATCACCATTTCC
GSNOR	GOI	<i>GSNOR</i>	222	F: CTTACCAATTGCCTGAGTGC R: CTGCAGCGGGTCAAGAAATC
JHE	GOI	<i>JHE</i>	78	F: TTCTTTCTTCTCTTGTGACTTTTGGTT R: CCCTTAATTGCACCTAAAGGAGTTT
Vitellogenin	GOI	<i>ApisVg</i>	62	F: AGTTCCGACCGACGACG R: TTCCCTCCCACGGAGTCC

\*  
bp – počet bází

### 3.3.6.8 Měření účinnosti přisedání primerů

Pro statistické vyhodnocení relativní exprese vybraných genů bylo nutno vypočítat účinnost přisedání použitých primerů k templátové molekule cDNA. V rámci metody byla měřena závislost hodnoty Ct na koncentraci cDNA. Nejprve byl připraven mix cDNA tak, že z každého vzorku bylo odebráno 10  $\mu$ l. Při použití 40 vzorků byl konečný objem cDNA 400  $\mu$ l. Následně bylo odebráno 100  $\mu$ l zásobní cDNA a zbylých 300  $\mu$ l bylo postupně ředěno RNase-free vodou vždy na poloviční koncentraci. Takto bylo připravena koncentrační řada cDNA čítající 11 vzorků o různé koncentraci cDNA.

Koncentrační řada byla napipetována do jamek PCR destičky (1,4  $\mu$ l) a poté bylo k cDNA přidáno 3,6  $\mu$ l reakční směsi (Tab. 5). Termocyklér byl nastaven na tyto parametry (1. krok: 95 °C, 10 min; 2. krok: 95 °C, 15 s; 3. krok: 60 °C, 60 s; krok 2 a 3 opakovat 34x; 4. krok: 60 °C, 1 min; 5. krok: 95,5 °C, 10 s; 6. krok: 0,5 °C,  $\infty$  min).

Dále byla vytvořena přímka závislosti hodnoty Ct na koncentraci cDNA, poté byla odečtena směrnice přímky, díky níž byla stanovena účinnost přisedání použitých primerů podle vzorce: účinnost =  $10^{(-1/\text{směrnice})}$ . Účinnost přisedání primerů byla následně použita pro stanovení relativní exprese GOI vůči HKG podle vzorce:

$$\frac{\text{účinnost HKG}^{Ct}}{\text{účinnost GOI}^{Ct}}$$

Tab. 5 Objemy jednotlivých složek pro přípravu reakční směsi pro měření účinnosti primerů (konečný objem 3,4  $\mu$ l)

Složka	Objem složky ( $\mu$ l)
Syber Select Master Mix	2,5
3,33 mmol·l <sup>-1</sup> primer (reverse)	0,45
3,33 mmol·l <sup>-1</sup> primer (forward)	0,45

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Stanovení celkových proteinů

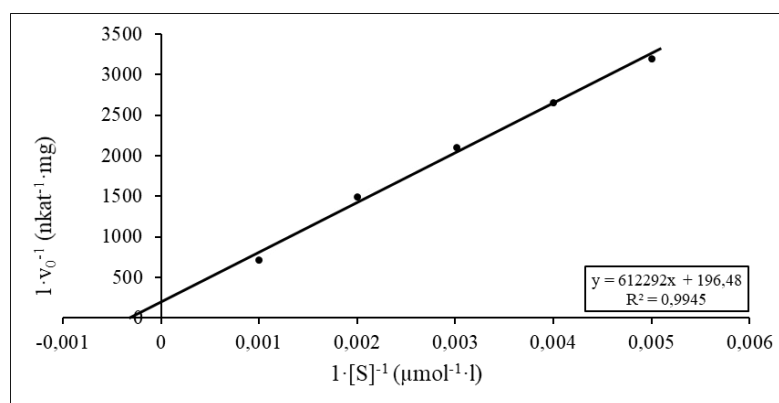
Pro stanovení proteinů ve včelích extraktech byly v mé bakalářské práci (BP) porovnány dvě metody. Jednalo se o Bradfordovu a bicinchoninovou metodu. Z výsledků plynoucích z mé BP je v diplomové práci použita pouze Bradfordova metoda, ve které se navíc vynáší poměr absorbance při 595 a 450 nm ke koncentraci proteinů, nebo standardů (Zor a Selinger, 1996). Stanovení koncentrace proteinů bylo použito v rámci metod stanovení aktivity enzymů, neboť výsledná aktivita byla poté vztažena na množství proteinů přítomných ve vzorku (specifická aktivita).

### 4.2 Stanovení kinetických parametrů NOS

Imunizované včely byly použity pro stanovení kinetických parametrů enzymu NOS. Experimenty byla stanovena  $K_m$  enzymu NOS ve včelí hlavě. Popsána byla také aktivita enzymu v závislosti na koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů. Dále byl sledován inhibiční účinek čtyř inhibitorů živočišných NOS (7-nitroindazol, L-NAME, S-ethylisothiomočovina a aminoguanidin). Nakonec byla stanovena aktivita NOS v reakci, v níž byl substrát L-arginin nahrazen jeho isomerem D-argininem.

#### 4.2.1 Stanovení $K_m$ včelí NOS

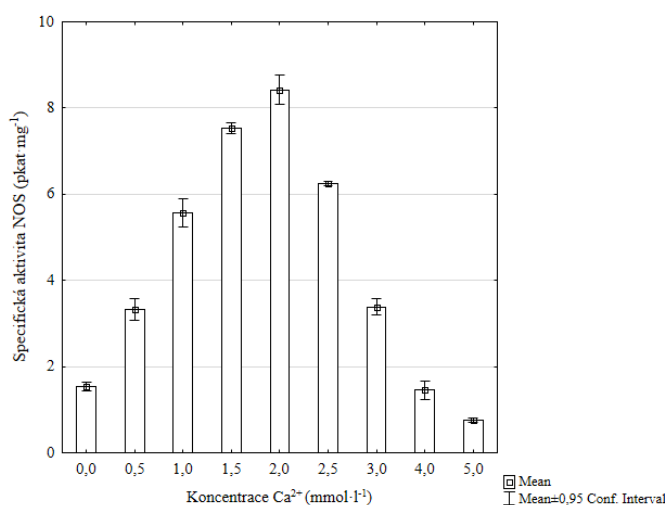
Po třech opakovaných měření byla spektrofotometricky stanovena  $K_m$  enzymu NOS ve včelí hlavě (Obr. 15). Ve včelí hrudi a zadečku nebyla konstanta z důvodu nečistoty extraktu a interference metody s přítomnými látkami stanovena. Z rovnice přímky byla následně stanovena  $K_m$  o hodnotě  $3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota  $V_{\text{max}}$  pro analyzovaný extrakt byla stanovena  $0,31 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu.



Obr. 15 Graf pro stanovení  $K_m$  enzymu NOS vynesáním závislosti  $1\cdot v^{-1}$  na  $1\cdot[S]^{-1}$  podle Lineweavera a Burka. Substrátem byl L-arginin v rozmezí koncentrace 0-1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření bylo opakováno třikrát a vzorky byly měřeny v technické triplikátu.



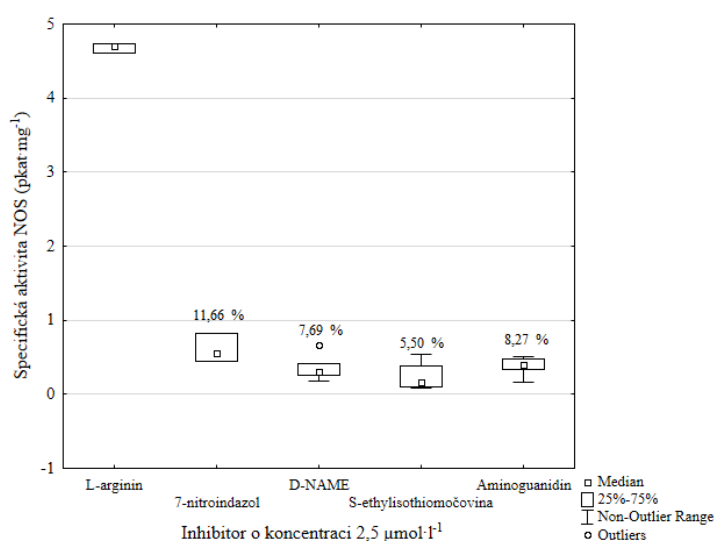
Dále byla stanovena závislost aktivity NOS na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Obr. 16). NOS dosahuje nejvyšší aktivity při  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. V nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je aktivita enzymu NOS 18% vůči  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů.



Obr. 16 Závislost specifické aktivity NOS ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vzorky byly měřeny v technickém triplikátu.

#### 4.2.2 Aktivita včelí NOS po přidavku inhibitorů a D-argininu

Aktivita NOS byla po přidavku čtyř inhibitorů (7-nitroindazol, L-NAME, S-ethylisothiomočovina a aminoguanidin) stanovena pomocí NO analyzátoru (Obr. 17). Stejně byla stanovena aktivita NOS v reakci, v níž byl substrát (L-arginin) nahrazen jeho isomerem D-argininem.



Obr. 17 Závislost specifické aktivity NOS ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) na přidavku inhibitoru ( $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Číslo nad box plotem udává procentuální aktivitu NOS vůči kontrole (L-arginin bez inhibitoru). Každý vzorek byl měřen v sérii 5 opakování v technickém triplikátu.

Po přidavku inhibitorů o koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , představovala konečná aktivita NOS 5-12 % své původní aktivity. NOS byl nejvíce inhibován S-ethylisothiomočovinou (aktivita pouze 5,5 %), nejnižší inhibici představoval 7-nitroindazol (aktivita 11 %). Aktivita NOS byla po přidavku L-NAME 7,7% a po přidavku aminoguanidinu 8,3%.

Dále byla stanovena aktivita NOS v reakci, v níž byl substrát (L-arginin) nahrazen svým isomerem D-argininem (Tab. 6). Specifická aktivita reakce, v níž byl použit isomer substrátu D-arginin byla  $0,34 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ , což představuje 7,2% aktivitu vůči reakci s L-argininem. Aktivita NOS je během reakce, v níž je místo L-argininu použit D-arginin stejná, jako např. aktivita NOS inhibované L-NAME, aminoguanidinem či S-ethylisothiomočovinou.

Tab. 6 Porovnání specifické aktivity NOS ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) během reakce, v níž je substrát L-arginin nahrazen jeho isomerem D-argininem vůči kontrole (L-arginin jako substrát). Každý vzorek byl měřen v sérii pěti opakování v technickém triplikátu. V závorce je uvedena směrodatná odchylka pěti opakování.

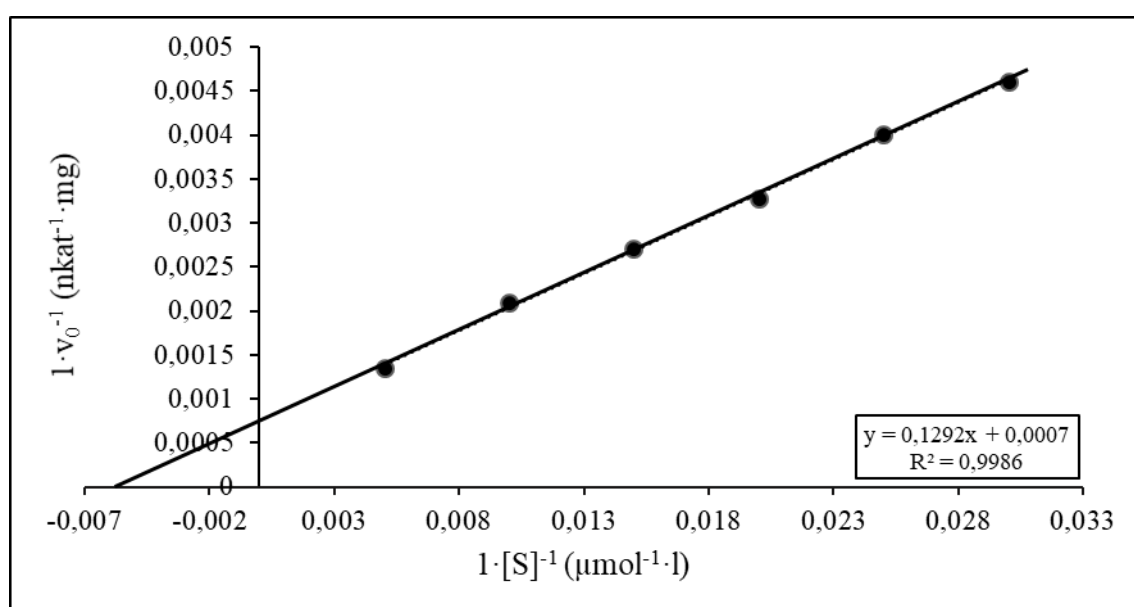
Substrát o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	Specifická aktivita NOS ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)	Aktivita isomeru vůči L-argininu (%)
L-arginin	4,68 ( $\pm 0,15$ )	100
D-arginin	0,34 ( $\pm 0,06$ )	7,2

### 4.3 Stanovení kinetických parametrů GSNOR

V rámci daných experimentů byla stanovena  $K_m$  enzymu GSNOR v extraktech celých včelích těl. Aktivita enzymu byla dostatečně vysoká, tudíž nebyla nutná optimalizace. Nakonec byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  inhibitoru N6022 pro včelí GSNOR. N6022 byl již dříve pospán jako kompetitivní inhibitor lidské GSNOR (Green *et al.*, 2012).

#### 4.3.1 Stanovení $K_m$ včelí GSNOR

Konstanty byly spektrofotometricky stanoveny v extraktech, připravených z celých včelích těl. Z rovnice přímky (Obr. 18) byla následně stanovena hodnota  $K_m$  184,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota  $V_{\text{max}}$  pro analyzovaný vzorek extraktu byla stanovena 85,7  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu.



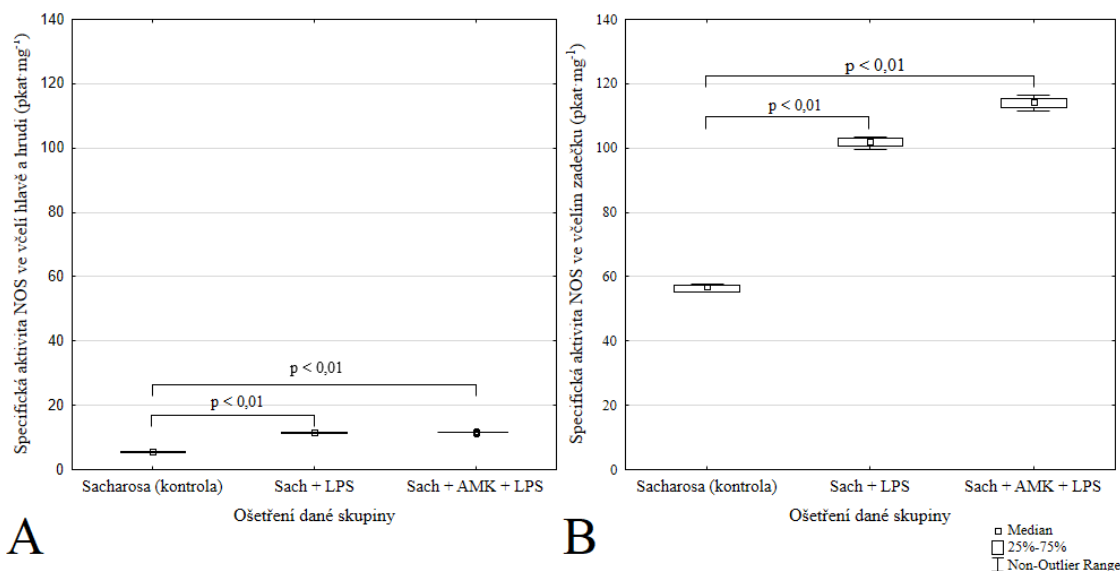
Obr. 18 Graf pro stanovení  $K_m$  enzymu GSNOR vynesemím závislosti  $1 \cdot v^{-1}$  na  $1 \cdot [S]^{-1}$  podle Lineweavera a Burka. Jako substrát byl použit GSNO v rozmezí koncentrace 0-200  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření bylo opakováno třikrát a vzorky byly měřeny v technickém triplikátu.

#### 4.3.2 Stanovení $IC_{50}$ inhibitoru N6022

Aktivita GSNOR inhibované látkou N6022 byla stanovena spektrofotometricky. Koncentrace inhibitoru N6022 byla v rozmezí 1-300  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ze získaných výsledků byla následně stanovena koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici včelí GSNOR ( $IC_{50}$ ). Hodnota  $IC_{50}$  pro inhibitor N6022 byla v analyzovaném vzorku extraktu včel stanovena jako 82,7  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 4.4 Imunizace včel vede ke zvýšené aktivitě NOS

Z výsledků je patrné (Obr. 19), že po imunizaci včel působením bakteriálního LPS, přidaného do cukerné výživy v klíčovém pokusu, dochází ke zvýšení aktivity NOS ve všech částech včelího těla (80-100 %).

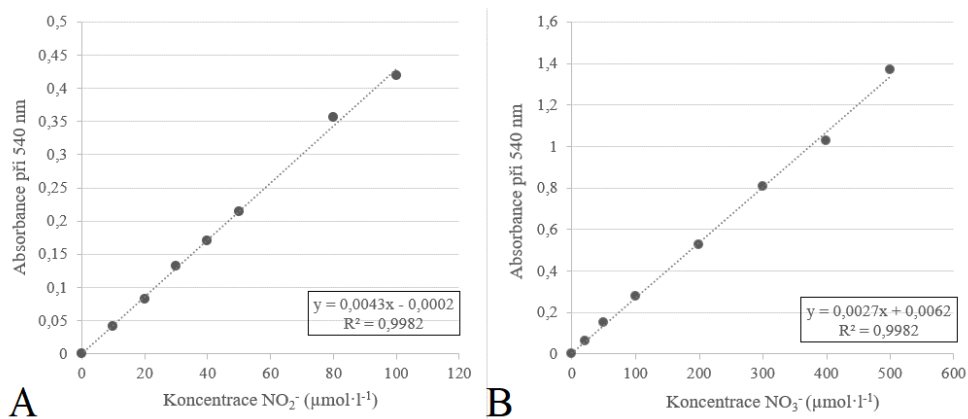


Obr. 19 Srovnání specifické aktivity NOS (pkat·mg<sup>-1</sup>) ve včelí hlavě a hrudi (A) a ve včelím zadečku (B) ve včelách, které byly imunizovány, popřípadě jim byla do cukerného krmiva přidána směs aminokyselin. U skupin se statisticky významnými rozdíly jsou znázorněny p-hodnoty na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Bonferroniho test). V rámci každé skupiny byla stanovena aktivita u 10 vzorků, každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

Dále je patrné, že aktivita NOS je ve včelích zadečcích mnohonásobně vyšší (10x), než ve zbylých částech včelího těla. Bylo také pozorováno, že přídavek AMK do cukerného krmiva pro imunizované včely v klíčovém pokusu vede k vyšší aktivitě NOS než při pouhé imunizaci včel.

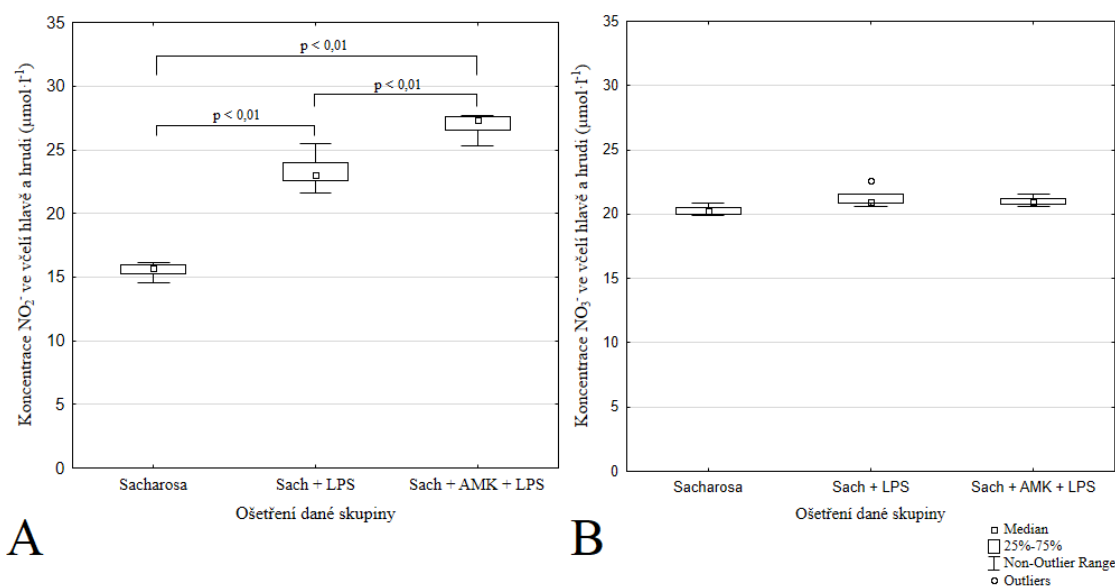
### 4.4.1 Imunizace včel vede ke zvýšené koncentraci NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Pro stanovení koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> byla použita Griessova metoda. Prvně byly vytvořeny kalibrační grafy a přímky (Obr. 20), pomocí nichž byla následně stanovena koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve včelích vzorcích (Obr. 21, 22). Každá koncentrace byla měřena v technickém triplikátu. Koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se ve včelí hlavě a hrudi zvyšuje v odpovědi na imunizaci včel LPS (Obr. 21A). Bylo dále pozorováno, že po přídavku AMK do cukerného krmiva pro imunizované včely v klíčovém pokusu je koncentrace NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve včelí hlavě a hrudi vyšší než při pouhé imunizaci včel LPS. Koncentrace NO<sub>3</sub><sup>-</sup> je naopak ve všech skupinách stejná (Obr. 21B).

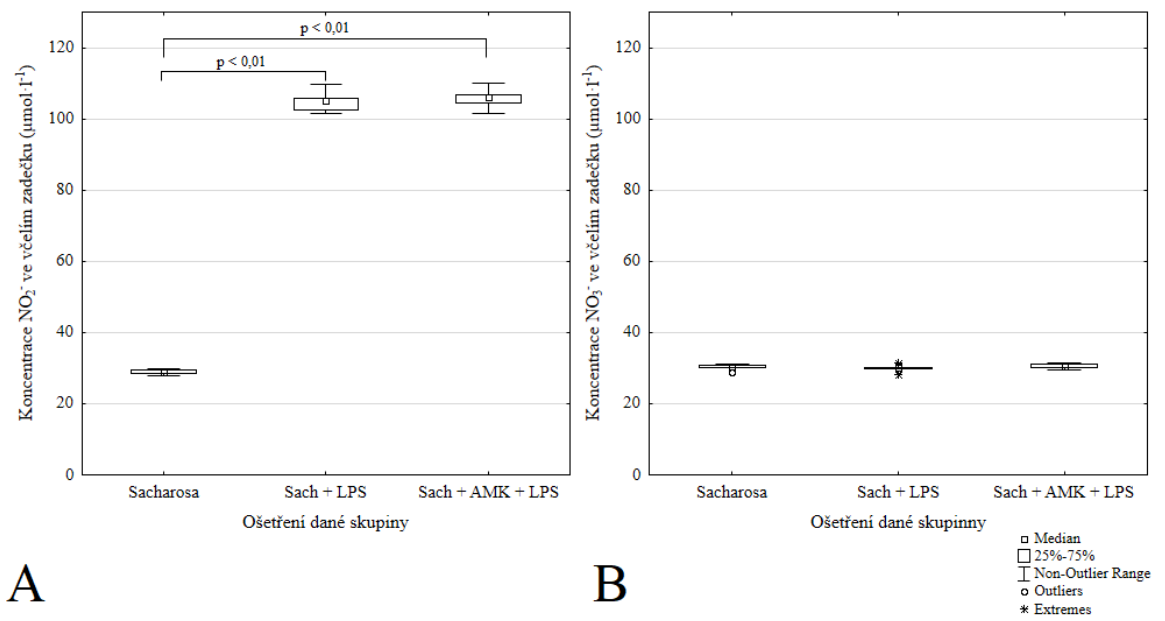


Obr. 20 Kalibrační grafy a přímky pro stanovení  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  ve včelích extraktech Griessovou metodou. V grafu je zobrazena závislost absorbance při 540 nm na koncentraci  $\text{NO}_2^-$  (A) a  $\text{NO}_3^-$  (B).

Podobné trendy byly pozorovány u vzorků včelích zadečků, které byly vystaveny stejnému ošetření (Obr. 22). Koncentrace  $\text{NO}_2^-$  se ve včelích zadečkách zvyšuje po předchozí imunizaci včel LPS, ještě vyšší je koncentrace  $\text{NO}_2^-$  po přidavku AMK do cukerného krmiva pro imunizované včely (Obr. 22A). Koncentrace  $\text{NO}_2^-$  je v zadečku imunizovaných včel až 4x vyšší, než ve včelí hlavě a hrudi, naopak koncentrace  $\text{NO}_3^-$  se mezi danými skupinami neliší, a tudíž je nezávislá na imunizaci včel, a také na přidavku AMK do cukerného krmiva pro imunizované včely.



Obr. 21 Srovnání koncentrace  $\text{NO}_2^-$  (A) a  $\text{NO}_3^-$  (B) v extraktech včelích hlavě a hrudi ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) se znázorněnými p-hodnotami u skupin se statisticky významnými rozdíly (Kruskal-Wallisův test;  $\alpha = 0,05$ ). V rámci každé skupiny byla koncentrace stanovena u 10 vzorků, každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.



Obr. 22 Srovnání koncentrace  $\text{NO}_2^-$  (A) a  $\text{NO}_3^-$  (B) v extraktech včelích zadečků ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) se znázorněnými p-hodnotami u skupin se statisticky významnými rozdíly (Kruskal-Wallisův test;  $\alpha = 0,05$ ). V rámci každé skupiny byla koncentrace stanovena u 10 vzorků, každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

#### 4.5 Změny exprese a aktivity NOS a GSNOR ve včelích larvách infikovaných bakteriálním patogenem *P. larvae*

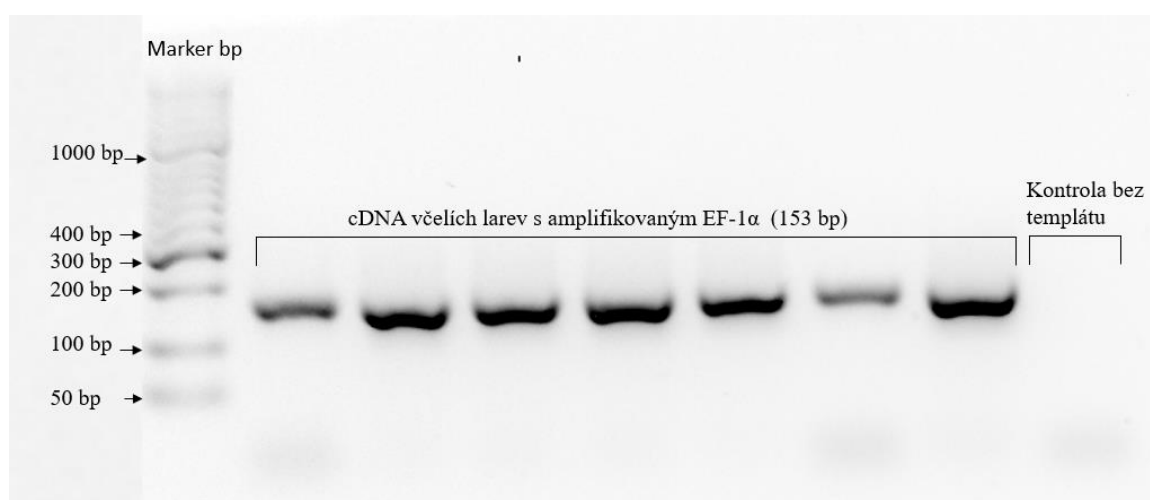
U každé skupiny včelích larev, kterým byly podány různé dávky bakteriálních spor *P. larvae*, byla stanovena úmrtnost (Tab. 7).

Tab. 7 Procentuální úmrtnost včelích larev v závislosti na počtu spor *P. larvae*.

Označení experimentální skupiny	Živé larvy	Mrtvé larvy	Úmrtnost (%)
Kontrola	25	47	65
15 spor <i>P. larvae</i>	18	54	75
150 spor <i>P. larvae</i>	20	52	72
1500 spor <i>P. larvae</i>	24	48	67

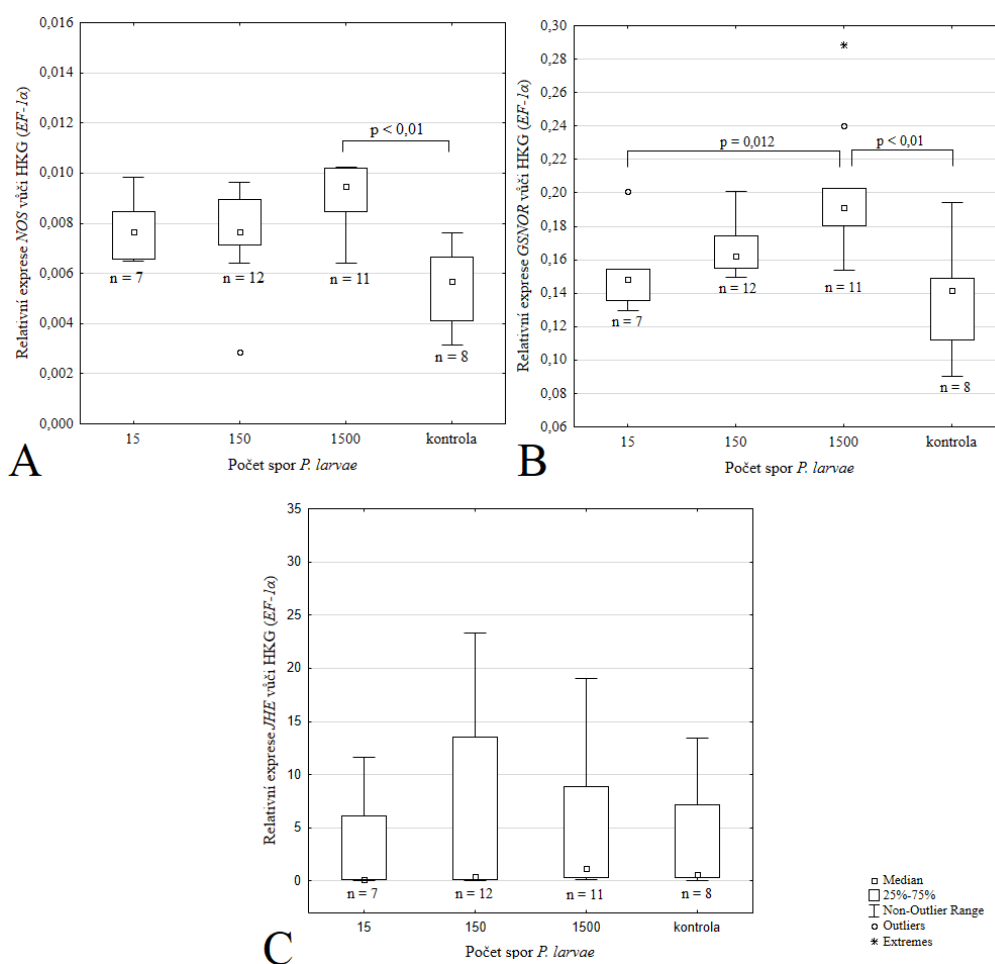
Úmrtnost byla u všech skupin včelích larev včetně kontroly vyšší než 50 %. Nejnižší úmrtnost (65%) byla u kontroly, která nebyla vystavena sporám *P. larvae*. U skupin larev, které byly vystaveny sporám *P. larvae* rostla úmrtnost se snižujícím se počtem spor *P. larvae*. Nejvyšší úmrtnost byla pozorována u larev vystavených 15 sporám *P. larvae* (75% úmrtnost), naopak nejnižší úmrtnost byla pozorována u larev vystavených 1500 sporám *P. larvae* (67% úmrtnost).

Dále byla ověřena úspěšnost přepisu RNA do cDNA pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 23). Podle výsledků z agarosové elektroforézy došlo k amplifikaci EF-1 $\alpha$  o velikosti 153 bp, čímž byla potvrzena správnost přepisu RNA do cDNA reverzní transkriptasou. U vzorku, ve kterém byla cDNA nahrazena vodou k amplifikaci nedošlo.



Obr. 23 Výsledek agarosové elektroforézy pro kontrolu správnosti přepisu RNA do cDNA u včelích larev, spolu s markerem počtu bází (bp). Pro kontrolu byl použit vzorek, ve kterém byla cDNA nahrazena RNase-free vodou.

Nakonec byla stanovena relativní exprese vybraných genů (*NOS*, *GSNOR*, *JHE* a *VITELLOGENINU*) vůči HKG (*EF-1α*; Obr. 24). Ve včelích larvách byla pozorována vzrůstající relativní exprese *NOS* a *GSNOR* v odpovědi na zvyšující se množství spor *P. larvae*. Statisticky významná změna v relativní expresi *NOS* proti kontrole byla pozorována u larev, které byly vystaveny 1500 sporám *P. larvae*. U ostatních skupin byl pozorován také nárůst relativní exprese *NOS*, který však nebyl statisticky významný. Statisticky významná změna relativní exprese *GSNOR* byla pozorována pouze u skupiny larev vystavené 1500 sporám *P. larvae*. Změny v relativní expresi *GSNOR* u této skupiny byly signifikantní i vůči skupině infikované pouhými 15 spory. Exprese genu *JHE* nebyla významně ovlivněna u žádné skupiny larev infikovaných spory *P. larvae*. *VITELLOGENIN* nebyl u žádné skupiny larev amplifikován.

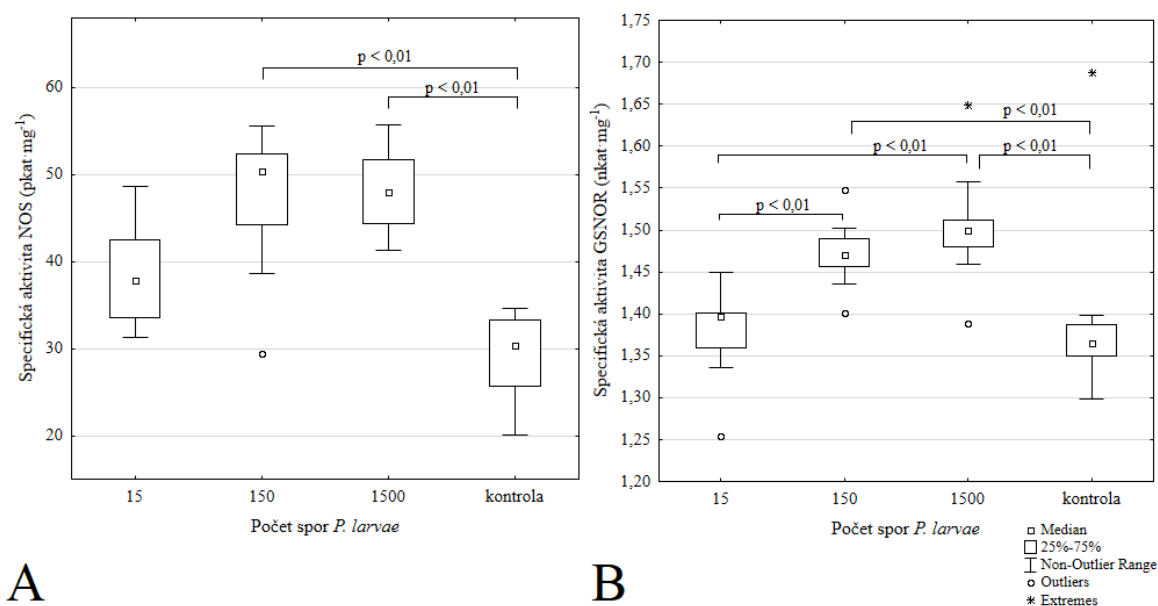


Obr. 24 Vliv počtu spor *P. larvae* na relativní expresi *NOS* (A), *GSNOR* (B) a *JHE* (C) ve včelích larvách. Gen pro *VITELLOGENIN* nebyl amplifikován. Relativní exprese je vztažena na jeden HKG (*EF-1α*). U skupin se statisticky významnými rozdíly jsou znázorněny p-hodnoty na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Kruskal-Wallisův test). Hodnota n odpovídá počtu vzorků, u kterých bylo provedeno qPCR, vzorky byly měřeny v technickém duplikátu.



U skupin včelích larev, které byly vystaveny sporám *P. larvae*, byla dále stanovena specifická aktivita enzymů NOS a GSNOR. Ve včelích larvách byla pozorována vzrůstající specifická aktivita NOS a GSNOR v odpovědi na zvyšující se množství spor *P. larvae* (Obr. 25). Specifická aktivita NOS byla zvýšena u všech skupin včelích larev vystavených sporám *P. larvae* (Obr. 25A). Nejvyšší specifická aktivita NOS byla pozorována u skupin včelích larev vystavených 150 a 1500 sporám *P. larvae*. Zvýšená specifická aktivita NOS u těchto skupin je statisticky významná oproti kontrole, která nebyla sporám *P. larvae* vystavena. Trend zvyšující se specifické aktivity v odpovědi na zvyšující se množství spor *P. larvae* byl rovněž pozorován u enzymu GSNOR (Obr. 25B). Enzym dosahoval své nejvyšší specifické aktivity ve včelích larvách vystavených 1500 sporám *P. larvae*. Statisticky významná změna specifické aktivity GSNOR vůči kontrole byla pozorována u skupin larev vystavených 150 a 1500 sporám *P. larvae*. Změny ve specifické aktivitě GSNOR u těchto skupin byly rovněž statisticky významné vůči skupině včelích larev vystavených pouhým 15 sporám *P. larvae*.

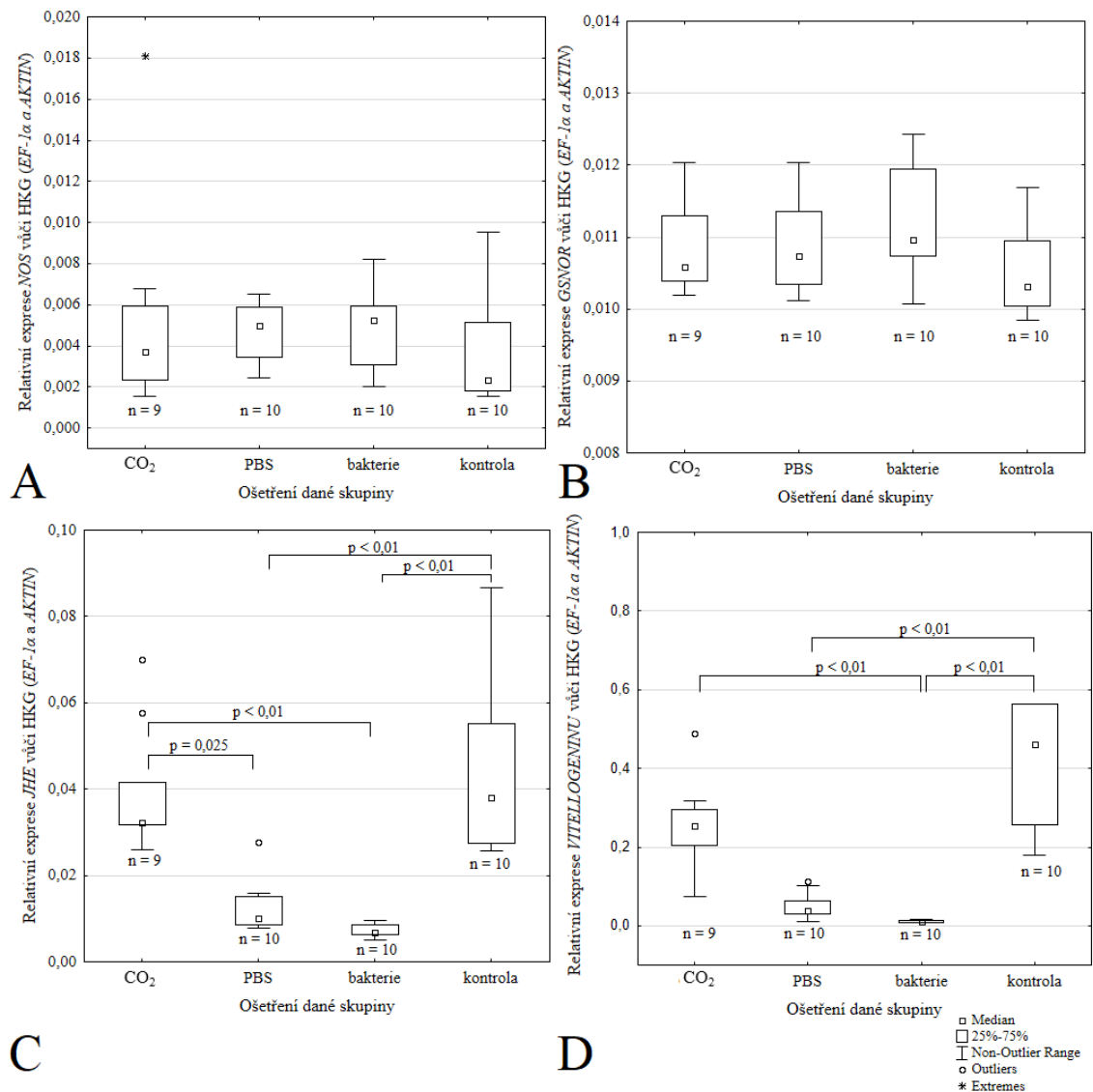
Souhrnně u včelích larev (*A. mellifera carnica*) dochází ke zvýšení exprese a aktivity NOS a GSNOR v odpovědi na zvyšující se množství spor *P. larvae*. Exprese *JHE* je naopak nezávislá na počtu spor *P. larvae* a *VITELLOGENIN* není exprimován vůbec.



Obr. 25 Vliv počtu spor *P. larvae* na specifickou aktivitu NOS (A;  $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a GSNOR (B;  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) ve včelích larvách. Pro každou skupinu bylo použito 10 vzorkům, které byly měřeny v technickém triplikátu. U skupin se statisticky významnými rozdíly jsou znázorněny p-hodnoty na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Kruskal-Wallisův test).

## 4.6 Změny exprese a aktivity NOS a GSNOR u dospělých včel vystavených bakteriím

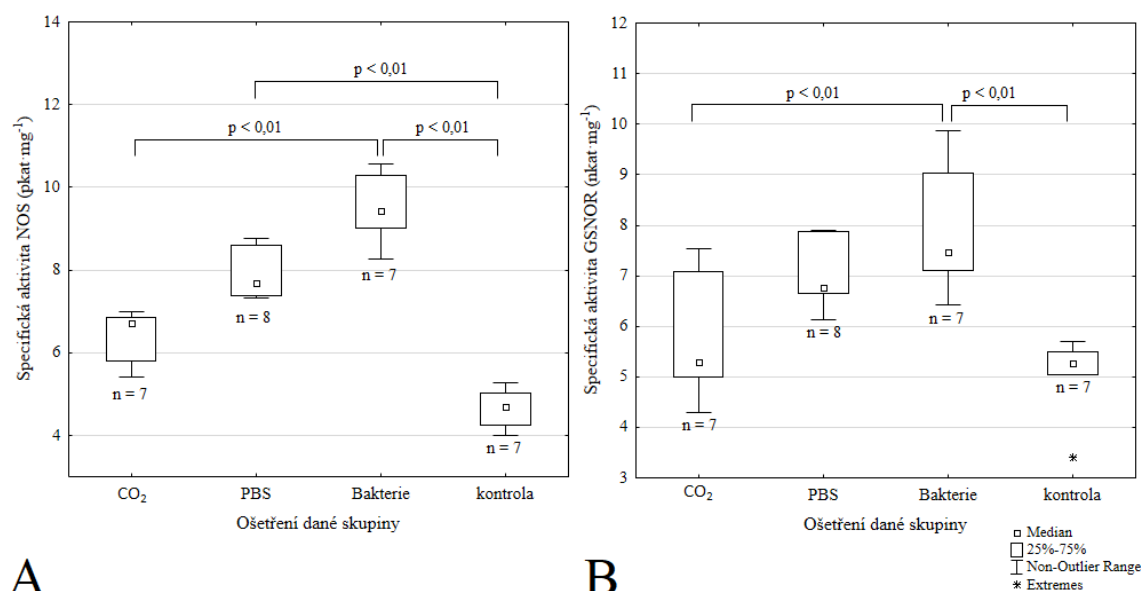
U dospělých včel byla stanovena relativní exprese vybraných genů (*NOS*, *GSNOR*, *JHE* a *VITELLOGENINU*) vůči geometrickému průměru exprese dvou HKG (*AKTIN*, *EF-1 $\alpha$* ) (Obr. 26). Exprese *NOS* a *GSNOR* se u infikovaných skupin včel (*A. mellifera carnica*) zvýšila minimálně a pozorovaný nárůst exprese nebyl statisticky významný (Obr. 26A-B). Hladiny exprese *VITELLOGENINU* a *JHE* klesaly v závislosti na ošetření dané skupiny a byly statisticky významné (Obr. 26C-D).



Obr. 26 Vliv různých ošetření na relativní expresi *NOS* (A), *GSNOR* (B), *JHE* (C) a *VITELLOGENINU* (D) v dospělých včelách. Relativní exprese je vztažena na geometrický průměr dvou HKG (*EF-1 $\alpha$*  a *AKTIN*). U skupin se statisticky významnými rozdíly jsou znázorněny p-hodnoty na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Kruskal-Wallisův test). Hodnota n odpovídá počtu vzorků, u kterých bylo provedeno qPCR, vzorky byly měřeny v duplikátu.

Pokles exprese *JHE* (Obr. 26C) vůči kontrole byl statisticky významný u skupin PBS a bakterie, u těchto skupin byl dále pokles exprese *JHE* statisticky významný vůči skupině včel, které byly pouze uspany CO<sub>2</sub>. U skupin včel vystavených PBS a infikovaných bakteriemi došlo ke statisticky významnému poklesu exprese *VITELLOGENINU* vůči kontrole (Obr. 26 D).

U dospělých včel, ve kterých byla stanovena relativní exprese GOI, byla dále stanovena aktivita enzymů NOS a GSNOR (Obr. 27). U včel vystavených CO<sub>2</sub>, PBS a bakteriím byl pozorován nárůst specifické aktivity enzymů NOS a GSNOR vůči kontrolní skupině. Zvýšení specifické aktivity enzymů bylo pozorováno u všech tří ošetření, dokonce i u včel, které byly pouze uspany CO<sub>2</sub>. Lze tedy usoudit, že uspání včel působením CO<sub>2</sub> má podobný, avšak menší vliv na aktivitu NOS a GSNOR jako injekční aplikace PBS. Ke zvýšené aktivitě NOS a GSNOR tedy dochází již při pouhém uspání včel CO<sub>2</sub> (20% nárůst aktivity), který však není statisticky významný vůči kontrole. Injekce PBS zvýšilo aktivitu NOS a GSNOR o 30-40 %. K nejvyššímu nárůstu specifické aktivity NOS a GSNOR došlo po vystavení včel bakteriím. U včel vystavených bakteriím byl pozorován 60-70% nárůst aktivity, který je navíc statisticky významný vůči kontrole a skupině včel uspaných CO<sub>2</sub>.



Obr. 27 Vliv různých ošetření na specifickou aktivitu enzymů NOS (A; pkat·mg<sup>-1</sup>) a GSNOR (B; nkat·mg<sup>-1</sup>) v dospělých včelách. U skupin se statisticky významnými rozdíly jsou znázorněny p-hodnoty na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Kruskal-Wallisův test). Vzorky byly měřeny v technickém triplikátu. Hodnota n udává počet měřených vzorků v rámci jedné skupiny.

Souhrnně u včel (*A. mellifera carnica*) po infekci dochází k minimálnímu, statisticky nevýznamnému zvýšení exprese genů *NOS* a *GSNOR*, které je doprovázeno statisticky významným zvýšením aktivity *NOS* a *GSNOR*. Zvýšenou aktivitu *NOS* a *GSNOR* byla pozorována již při pouhém uspání včel  $\text{CO}_2$ . Exprese *NOS* a *GSNOR* je v rámci skupin podobná, následná aktivita enzymů je však odlišná, a stoupá v pořadí  $\text{CO}_2$ , PBS a bakterie.

#### **4.7 Analýza hladiny RSNOs v extraktech včel**

U včel, ve kterých byla stanovena relativní exprese genů a specifická aktivita enzymů, byly poslední experimenty zaměřeny na stanovení RSNOs, které měly přinést ucelený pohled na metabolismus RNS u včel. RSNOs byly stanoveny pomocí NO analyzátoru. Pro dané stanovení byly připraveny tři kalibrační řady ( $10\text{-}1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1000\text{-}100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $100\text{-}1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO).

Metodou však v analyzovaných vzorcích nebyly detekovány žádné RSNOs. Detekována také nebyla nejnižší kalibrační řada GSNO ( $100\text{-}1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Koncentrace RSNOs v připravených vzorcích včel musela být tedy nižší než  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako vzorky byly použity včely, které byly vystaveny  $\text{CO}_2$ , PBS a bakteriím, následně byla v těchto vzorcích stanovena relativní exprese GOI a specifická aktivita *NOS* a *GSNOR*. Vzorky byly připraveny podle kap. 3.3.5.

## 5 DISKUZE

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci s názvem: „Funkce oxidu dusnatého v imunitním systému hmyzu,“ která byla zpracována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v roce 2017.

### 5.1 Kinetické parametry včelí NOS

Kinetické parametry bylo možné stanovit po předchozí optimalizaci metody pro měření aktivity NOS dle původní metody podle Hevel a Marletta (1994) s využitím informací dostupných z literatury. Dané experimenty byly provedeny pro lepší porozumění zapojení NOS a GSNOR v imunitním systému včely medonosné (*A. mellifera carnica*). Podle získané  $K_m$  enzymu lze usuzovat fyziologické koncentrace substrátu daného enzymu. Hodnota  $V_{max}$  však není konstanta, neboť je závislá na koncentraci enzymu. Dále byla pozorována závislost aktivity NOS na koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů a byla potvrzena inhibice včelí NOS čtyřmi vybranými inhibitory živočišných NOS. V diplomové práci byla potvrzena inhibice včelí NOS již dříve popsáným inhibitorem NOS u včel (L-NAME) a navíc dalšími 3 inhibitory, které u hmyzu nebyly zatím popsány.

$K_m$  včelí NOS nebyla v literatuře zatím popsána a poprvé byla stanovena v této diplomové práci pro substrát L-arginin jako  $3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , konkrétně pro včelu medonosnou kraňskou (*A. mellifera carnica*).  $K_m$  byla doposud u hmyzu popsána pouze pro enzym NOS lokalizovaný u octomilky obecné (*D. melanogaster*) s hodnotou  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Colasanti a Venturini, 1998). V porovnání s tímto modelovým organismem je hodnota  $K_m$  NOS u včely medonosné kraňské (*A. mellifera carnica*) vyšší. Dále bylo stanoveno, že včelí NOS dosahuje nejvyšší aktivity při  $2 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů. V nepřítomnosti  $Ca^{2+}$  iontů je aktivita NOS 18% oproti reakci, v níž je  $2 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů.

Pro ověření, že byla skutečně měřena aktivita včelí NOS, byly použity známé inhibitory živočišných NOS o koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (7-nitroindazol, L-NAME, S-ethylisothiomočovina a aminoguanidin). Aktivita inhibované včelí NOS se pohybovala v rozmezí 5-12 %. Z výsledků však nelze říci, který inhibitor je nejsilnější (chybí  $IC_{50}$  pro dané inhibitory). Inhibice včelí NOS byla pozorována při použití S-ethylisothiomočoviny jako inhibitoru o koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (5,5% aktivita NOS). Inhibice NOS tímto inhibitorem nebyla u hmyzu zatím pospána. S-ethylisothiomočovina byla potvrzena jako kompetitivní inhibitor lidské NOS. Mechanismus inhibice spočívá ve vazbě inhibitoru na

hemovou doménu enzymu NOS (Raman *et al.*, 2001). Inhibitorem včelí NOS byl potvrzen také L-NAME (7,7% aktivita NOS). L-NAME byl dříve popsán jako inhibitor včelí NOS lokalizované v jejich mozku. Müller (1996) popisuje 30-50% inhibici NOS ve včelím mozku. L-NAME je kompetitivní inhibitor, který kompetuje s přirozeným substrátem L-argininem obsazením jeho vazebného místa (Pokk a Váli, 2002). Inhibici vykazoval také aminoguanidin (8,3% aktivita NOS), který byl u savců pospán jako nekompetitivní inhibitor iNOS (Farhad *et al.*, 2011). U hmyzu nebyla inhibice NOS aminoguanidinem popsána, nicméně diplomová práce potvrdila inhibiční účinek tohoto inhibitoru na včelí NOS. Inhibitor 7-nitroindazol také inhiboval včelí NOS, látka byla již dříve popsána jako inhibitor savčí nNOS (Schulz *et al.*, 1995). Inhibice 7-nitroindazolem je kompetitivní a mechanismus spočívá v interakci inhibitoru s vazebným místem pro L-arginin a BH<sub>4</sub> (Wegener a Volke, 2010). U hmyzu nebyla inhibice NOS 7-nitroindazolem popsána, nicméně diplomová práce potvrdila inhibiční účinek tohoto inhibitoru na včelí NOS. Nahrazením substrátu (L-argininu) jeho isomerem D-argininem vedlo k poklesu aktivity včelí NOS na 7 % v porovnání s L-argininem, čímž byla potvrzena substrátová specifita pouze pro L-arginin, nikoli pro jeho isomer D-arginin.

## 5.2 Kinetické parametry včelí GSNOR

Kinetika GSNOR u hmyzu nebyla literatuře zatím popsána, tudíž se jedná o vůbec první informace týkající se kinetiky daného enzymu u hmyzu, konkrétně u včely medonosné kraňské (*A. mellifera carnica*). Hodnota  $K_m$  včelí GSNOR pro substrát GSNO byla stanovena 184,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V literatuře je hodnota  $K_m$  popsána pouze pro savce, rostliny, houby a bakterie (Tab. 8) a pohybuje se v rozmezí 11-550  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U člověk a rostlin je  $K_m$  GSNOR nižší než u včel, naopak u hub je  $K_m$  až třikrát vyšší. Koncentrace substrátů by za fyziologických podmínek měla odpovídat hodnotě  $K_m$ , tudíž lze předpokládat, že např. u člověka a rostlin je fyziologická hladina RSNOs daleko nižší než u včel. Předpokládat lze také, že RSNOs jsou u člověka a rostlin odbourávány při koncentraci nižší než u včel.

Tab. 8 Porovnání hodnot  $K_m$  pro enzym GSNOR z různých organismů

Český název	Latinský název	Hodnota $K_m$	Citace
Včela medonosná	<i>A. mellifera</i>	184,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	DP Kubný, 2019
Člověk	<i>Homo sapiens</i>	11 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Staab <i>et al.</i> , 2008
Locika setá	<i>Lactuca sativa</i>	45 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tichá <i>et al.</i> , 2017
Brukev zelná	<i>Brassica oleracea</i>	53 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Tichá <i>et al.</i> , 2017
Kropidlák	<i>Aspergillus nidulans</i>	550 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Zhou <i>et al.</i> , 2016

V návaznosti na mou bakalářskou práci, ve které byla pozorována inhibice včelí GSNOR inhibitorem N6022, byla v diplomové práci stanovena  $IC_{50}$  tohoto kompetitivního inhibitoru lidské GSNOR jako  $82,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Inhibice GSNOR daným inhibitorem byla také popsána u rostlin ( $320 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Tichá *et al.*, 2017) a u člověka ( $IC_{50} = 8 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Green *et al.*, 2012).

### **5.3 Imunizace včel vede ke zvýšené aktivitě NOS a koncentraci $\text{NO}_2^-$**

Z doposud publikované literatury je známo, že po vpíchnutí LPS pod kutikulu hmyzu dochází k silné indukci exprese NOS v tukovém tělese (Imamura *et al.*, 2002), a že vystavení včel LPS vede ke zvýšené produkci NO (Kitta *et al.*, 2016; Negri *et al.*, 2017).

Úvodními experimenty měření aktivity NOS ve včelách (*A. mellifera carnica*) bylo potvrzeno, že aktivita enzymu roste v odpovědi na přítomnost bakteriálního LPS v cukerném roztoku, který byl použit pro krmení včel. Aktivita enzymu byla ještě vyšší při současném podávání LPS s AMK. Zvýšená aktivita NOS byla doprovázena zvýšenou koncentrací  $\text{NO}_2^-$ . Negri *et al.*, (2017) popisují podobné výsledky pro včelí larvy, u kterých byla pozorována zvýšená produkce NO v odpovědi na přítomnost bakteriálních LPS. Autoři rovněž popisují, že u larev LPS vyvolaná produkce NO byla rovněž zvýšena přidávkem L-argininu do krmného média. Důvodem zvýšené aktivity NOS je fakt, že L-arginin je přirozený substrát enzymu NOS. V diplomové práci byla sice použita směs AMK, nicméně L-arginin byl také součástí této směsi. Zvýšená aktivita NOS a koncentrace  $\text{NO}_2^-$  ve včelím zadečku oproti včelí hlavě a hrudi rovněž koreluje s dostupnou literaturou, neboť literatura popisuje prvotní iniciaci imunitního systému a zvýšenou aktivitu NOS u hmyzu, právě v jeho zadečku, střevě a tukovém tělese (Imamura *et al.*, 2002). Koncentrace  $\text{NO}_3^-$  nebyla u včel vystavených LPS a LPS s AMK zvýšena, neboť  $\text{NO}_3^-$  vznikají interakcí NO s oxyHb, který u hmyzu a včel není přítomen (Miranda *et al.*, 2001; de Sanctis *et al.*, 2005). Možným zdrojem  $\text{NO}_3^-$  u včel je rostlinný pyl,  $\text{NO}_3^-$  byly rovněž detekovány ve včelím medu (del Nozal *et al.*, 2000; Ghiani *et al.*, 2016).

Z výsledků je patrné, že přítomnost LPS vede ke zvýšené aktivitě NOS a ke zvýšené koncentraci  $\text{NO}_2^-$ . Přídavek AMK do cukerné výživy včel imunizovaných LPS vede k dalšímu nárůstu aktivity NOS a koncentrace  $\text{NO}_2^-$ . Koncentrace  $\text{NO}_3^-$  je ve včelách konstantní a nezávislá na přítomnosti LPS a AMK a pravděpodobně souvisí se včelí potravou.

## 5.4 Exprese a aktivita GSNOR a NOS včelích larev infikovaných bakterií *P. larvae*

Pro pochopení zapojení RNS v odpovědi imunitního systému včel na přítomnost patogenu byla stanovena exprese *NOS* a *GSNOR*, následně byla stanovena specifická aktivita enzymů, jež vznikají expresí studovaných genů. Do vyhodnocení relativní exprese GOI nebyl z důvodu špatné účinnosti přisedání primerů a širokého rozmezí hodnot Ct zahrnut HKG *AKTIN*. Problém byl pravděpodobně zapříčiněn špatně navrženými primery, popřípadě jejich degradací během skladování.

Úmrtnost sedmidenních včelích larev včely medonosné kraňské (*A. mellifera carnica*), které byly vystaveny různému počtu spor *P. larvae* se pohybovala mezi 65-75 %. Úmrtnost byla nejnižší u včelích larev, které nebyly vystaveny sporám *P. larvae* a sloužily jako kontrola. Tyhle výsledky potvrdily informace dostupné v literatuře, neboť vystavení včelích larev sporám *P. larvae* vede k jejich úhynu. Překvapivé bylo, že úmrtnost včelích larev se snižovala se zvyšujícím se množstvím spor *P. larvae*. Brødsgaard *et al.*, (1998) popisují přímou závislost mezi úmrtností včelích larev a počtem spor *P. larvae*. Autoři rovněž popisují, že nejvyšší úmrtnost je u larev starých 24-48 hodin ( $LD_{50} = 8,5$  spor *P. larvae*) Autoři také popisují, že čtyřdenní včelí larvy jsou již proti sporám *P. larvae* odolné. Výsledky s literaturou korelují v tom, že úmornost byla u všech larev vyšší než 50 %. Podle literatury a výsledků lze předpokládat, že k úmrtí larev dojde již během prvních 48 hodin. Neuhynulé larvy starší čtyř dnů jsou poté proti sporám *P. larvae* imunní a vyvíjí se běžným způsobem. Pozorovaný nesoulad mezi úmrtností včelích larev a množstvím spor *P. larvae* mohl být způsoben nejasnými rozdíly mezi zmraženými živými a mrtvými larvami, kdy jako mrtvé larvy byly považovány ty, které byly menší než 3 mm, hnědě zbarvené a potopené v mateří kašičce. Larvy, které byly větší než 3 mm a nebyly potopeny v roztoku mateří kašičky byly považovány za živé. Problém byl také v tom, že se jednalo o první takový experiment prováděný na Katedře Biochemie, tudíž krmení a podmínky nemusely být optimální, čemuž by mohla napovídat vysoká úmrtnost kontrolní skupiny. Kontrolní skupina sice nebyla vystavena sporám *P. larvae*, pravděpodobně však silný stresový faktor (podvýživa, špatná teplota a vlhkost prostředí) způsobil vysokou úmrtnost kontrolní skupiny, a tím pádem se již poté neprojevil vliv počtu spor *P. larvae*.



### 5.4.1 Spory *P. larvae* zvyšují expresi *NOS* a *GSNOR*

Relativní exprese *NOS* a *GSNOR* se zvyšovala v závislosti na počtu spor *P. larvae*. U hmyzu, konkrétně u bource morušového (*Bombyx mori*) byla popsána zvýšená exprese *NOS* v tukovém tělese v odpovědi na přítomnost bakteriálních LPS (Imamura *et al.*, 2002). U včelích larev (*A. mellifera carnica*) bylo v rámci diplomové práce dosaženo stejných výsledků, neboť i u nich došlo ke zvýšení exprese *NOS*. Zvýšená exprese *NOS* byla doprovázena zvýšenou expresí *GSNOR*. Závislost exprese *GSNOR* u hmyzu v odpovědi na přítomnost patogenů nebyla u hmyzu zatím popsána, avšak se předpokládá, že gen *GSNOR* je vysoce konzervován od bakterií až po člověka a je velmi důležitý v rámci imunitních odpovědí (Lui *et al.*, 2001).

Vitellogeninu odpovídající cDNA nebyla u sedmidenních včelích larev amplifikována. Piulachs *et al.*, (2003) zjistili, že k expresi *VITELLOGENINU* dochází až u dospělých včel, nikoli u larev. Dosažené výsledky korelují s dostupnou literaturou a potvrzují, že gen *VITELLOGENINU* není ve včelích larvách exprimován, avšak v dospělých včelách má vitellogenin antioxidační funkci a dále také potlačuje hladinu JH (Seehuus *et al.*, 2006). *JHE* by naopak měl být exprimován již ve včelích larvách (Mackert *et al.*, (2008). Výsledky v rámci diplomové práce s touto informací zcela korelují, nicméně relativní exprese *JHE* nebyla závislá na počtu spor *P. larvae* a byla ve všech skupinách podobná. Podle výsledků je patrné, že přítomnost spor *P. larvae* nemá přímý vliv na expresi *JHE*.

Pokud by exprese *JHE* korelovala s hladinou JH v hmyzí hemolymfě, vedla by snižující se hladina JH ke zvýšené hladině JH. Zvýšená hladina JH u hmyzího modelového organismu octomilky obecné (*D. melanogaster*) vede následně ke snížení hladiny vitellogeninu a také ke snížení exprese genů AMPs (Flatt *et al.*, 2008). Situace však odpovídá hladinám proteinů JHE, nikoli expresi *JHE*, navíc může být situace ve včelích larvách zcela odlišná. Bomtorin *et al.*, (2014) popisují, že exprese *JHE* u včel funguje jako klíčový regulátor hladiny JH. JH hraje klíčovou roli v určení kasty během larválního vývoje včel, u dospělých včel se poté JH podílí na přechodu včel ze stavu krmičky do stavu létavky. Exprese *JHE* se u včelích larev nezvýšila v odpovědi na přítomnost spor *P. larvae*, tudíž lze předpokládat zapojení *JHE* spíše v rámci larválního vývoje včel.

#### **5.4.2 Spory *P. larvae* zvyšují aktivitu NOS a GSNOR**

Zvýšená exprese *NOS* a *GSNOR* byla doprovázená zvýšenou aktivitou enzymů *NOS* a *GSNOR*. Homem (2015) ve své práci popisuje zapojení *GSNOR* v imunitní odpovědi octomilky obecné (*D. melanogaster*) a uvádí, že aktivita *GSNOR* se zvyšuje v odpovědi na přítomnost patogenů. Negri *et al.*, (2017) popsali, že u imunizovaných včelích larev dochází ke zvýšení produkce *NO* z důvodu zvýšené aktivity enzymu *NOS*. Podobných výsledků bylo dosaženo i rámci této DP.

Souhrnně se u včelích larev v odpovědi na přítomnost patogenu zvyšuje exprese a aktivita *NOS* a *GSNOR*. Exprese *JHE* je závislá spíše na larválním vývoji včel než na přítomnosti patogenů.

#### **5.5 Exprese a aktivita GSNOR a NOS v dospělých včelách infikovaných bakteriálními patogeny**

V experimentech bylo studováno zapojení *NOS* a *GSNOR* v imunitních odpovědích včely medonosné kraňské (*A. mellifera carnica*). Relativní exprese *NOS* a *GSNOR* se v odpovědi na přítomnost bakterií zvýšila jen minimálně a změny nebyly statisticky významné. Specifická aktivita *NOS* a *GSNOR* se v odpovědi na přítomnost bakterií signifikantně zvýšila. *VITELLOGENIN* byl u dospělých včel exprimován, na rozdíl od larev, u kterých gen exprimován nebyl. Relativní exprese *VITELLOGENINU* a *JHE* se v odpovědi na přítomnost bakterií signifikantně snížila.

##### **5.5.1 Bakterie minimálně zvyšují expresi včelí *NOS* a *GSNOR***

U dospělých včel (*A. mellifera carnica*) došlo po jejich vystavení bakteriím k minimálnímu, statisticky nevýznamnému zvýšení exprese genů *NOS* a *GSNOR*. Zvýšená exprese *NOS* podle literatury nastává u hmyzu v tukovém tělese v odpovědi na přítomnost bakteriálních LPS (Imamura *et al.*, 2002). Exprese *GSNOR* nebyla u hmyzu zatím charakterizována. Mnoho dostupné literatury popisuje zapojení *GSNOR* v odpovědi na přítomnost patogenů u savců, člověka a rostlin. Podle literatury by se exprese a aktivita *GSNOR* měla zvyšovat v odpovědi na přítomnost patogenů. Lui *et al.*, (2001) uvádí, že *GSNOR* je vysoce konzervován od bakterií až po člověka. U včel by tedy měly být pozorovány podobné výsledky, tj. že exprese a aktivita *NOS* a *GSNOR* by měla vzrůst v odpovědi na přítomnost patogenů. Získané výsledky týkající se exprese

*NOS* a *GSNOR* nekorelují s literaturou, neboť u dospělých včel došlo pouze k minimálnímu, statisticky nevýznamnému zvýšení exprese *NOS* a *GSNOR*.

### **5.5.2 Bakterie významně zvyšují aktivitu včelí *NOS* a *GSNOR***

U dospělých včel (*A. mellifera carnica*) došlo v odpovědi na přítomnost patogenů k minimálnímu, statisticky nevýznamnému zvýšení exprese *NOS* a *GSNOR*. Statisticky nevýznamné zvýšení exprese genů bylo doprovázeno statisticky významným nárůstem specifické aktivity *NOS* a *GSNOR*. Tyto výsledky se liší od očekávaných, neboť existuje dostatek vědeckých prací, které popisují, že po vystavení hmyzu patogenu dochází ke zvýšené expresi *NOS* a ke zvýšené aktivitě příslušného enzymu (Luckhart *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2002). Negri *et al.*, (2015) popisuje u včel, kterým bylo do hemocelu implantováno nylonové vlákno zvýšenou tvorbu NO, která rovněž nebyla doprovázena zvyšující se expresí *NOS*. Autoři předpokládají, že zvýšená tvorba NO je výsledkem aktivace enzymu *NOS*, nikoli však zvýšenou expresí *NOS*. Podle výsledků a literatury lze tedy usoudit, že u včel přítomnost patogenu nemusí vést ke zvýšené expresi *NOS*, avšak skrze určitý stimul může dojít ke zvýšení aktivity enzymu *NOS*. Exprese *GSNOR* u hmyzu nebyla zatím nikde popsána. Dostupná je pouze informace, že aktivita enzymu *GSNOR* u hmyzu vzrůstá v odpovědi na přítomnost patogenů (Homem, 2015).

Zvýšená aktivita *NOS* a *GSNOR* byla pozorována již při pouhým uspání včel CO<sub>2</sub> a stoupala v pořadí CO<sub>2</sub>, PBS a bakterie, poslední dvě skupiny byly navíc rovněž uspany CO<sub>2</sub>. Kontrolní skupina nebyla uspana CO<sub>2</sub>. Neexistuje jediný článek, ve kterém by byl popsán vliv CO<sub>2</sub> na aktivitu *NOS* u včel nebo u hmyzu, nicméně je podle výsledků možné, že CO<sub>2</sub> určitým způsobem zvyšuje aktivitu *NOS* u včel. CO<sub>2</sub> může např. narušovat homeostázu ve včelím hemocelu nebo zvyšovat koncentraci Ca<sup>2+</sup> iontů, což by mohlo následně vést ke zvýšené aktivitě *NOS*. Podobný mechanismus byl popsán již u rostlin, ve kterých CO<sub>2</sub> zvyšuje koncentraci cytosolárních Ca<sup>2+</sup> iontů tím, že aktivuje membránové a intracelulární kanály pro Ca<sup>2+</sup> ionty. Zvýšená koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů poté zvyšuje aktivitu *NOS* (Wang *et al.*, 2013). Vpichem PBS pod včelí kutikulu pravděpodobně došlo rovněž k narušení homeostázy ve včelím hemocelu, a tudíž k následnému zvýšení aktivity *NOS*.

Získané výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou, neboť aktivita včelí *NOS* se podle literatury zvyšuje v odpovědi na přítomnost bakteriálních LPS. Podle literatury by aktivita enzymu *GSNOR* u hmyzu měla rovněž vzrůst v odpovědi na přítomnost

patogenu (Homem, 2015; Negri *et al.*, 2017). Vliv PBS a CO<sub>2</sub> na aktivitu včelí NOS není v literatuře popsán.

### **5.5.3 Bakterie významně snižují expresi *JHE* a *VITELLOGENINU* u dospělých včel**

Ve vztahu vitellogeninu k JH se předpokládá, že vysoké hladiny JH vedou ke snížení koncentrace vitellogeninu (Pinto *et al.*, 2000; Barchuk, 2002). Na regulaci hladiny JH se podílí enzym JHE, který hydrolyzuje JH. Zvýšená hladina JHE vede k hydrolyze a poklesu hladiny JH. Pokles hladiny JH vede následně k nárůstu hladiny vitellogeninu. Experimenty provedené v rámci diplomové práce však byly zaměřeny pouze na expresi *JHE* a *VITELLOGENINU*, tudíž výsledná koncentrace JHE a vitellogeninu může být ve včelí hemolymfě odlišná.

Vitellogenin u dospělých včel ovlivňuje jejich vývoj, délku života a působí jako antioxidant, naopak ve včelích larvách není *VITELLOGENIN* exprimován (Piulachs *et al.*, 2003). Tato informace již byla v této práci potvrzena (kap. 5.4.1).

U dospělých včel došlo k poklesu exprese *VITELLOGENINU* u všech tří ošetřených skupin. Výsledky jsou odlišné od informací dostupných v literatuře, neboť podle literatury u hmyzu dochází ke zvýšení exprese *VITELLOGENINU* v odpovědi na přítomnost bakterií (Corona *et al.*, 2007; Nachappa *et al.*, 2012). U dospělých včel (*A. mellifera carnica*) byl pozorován opačný trend a pokud by exprese *VITELLOGENINU* odpovídala následné hladině vitellogeninu, mohlo u včel dojít ke snížení délky jejich života, a také k poklesu antioxidantní funkce, kterou vitellogenin zastává. Druhé vysvětlení poklesu hladiny vitellogeninu by mohlo být takové, že pro včely nebude důležité dožít se vysokého věku, ale přežít infekci, proto by se mohl protein vitellogenin odbourávat a produkovat AMPs. Pravděpodobné je také zapojení vlivu ročního období a vývojového stádia na expresi a hladinu vitellogeninu u včel. Tyto závěry však nelze potvrdit, díky chybějícím datům o hladině vitellogeninu u zkoumaných včel.

Pokles exprese *VITELLOGENINU* byl doprovázen poklesem exprese *JHE*. U hmyzu bylo popsáno, že hladina JHE klesá v odpovědi na přítomnost patogenu (Karlhofer *et al.*, 2012). Exprese *JHE* v odpovědi na přítomnost patogenu nebyla u včel ani u jiných druhů hmyzu zatím popsána.

V budoucích experimentech by bylo dobré se zaměřit na relativní expresi *VITELLOGENINU* a *JHE* a zároveň určit titr vitellogeninu a JHE v hemolymfě. Tyto

výsledky by následně mohly přinést ucelený pohled na zapojení vitellogeninu a JHE v odpovědi včel na přítomnost patogenu.

## **5.6 Hladina RSNOs u včel byla pod mezí detekce**

V rámci diplomové práce byla testována analýza RSNOs ve vztahu s pozorovanými změnami aktivity NOS a GSNOR. Pro dané stanovení byly připraveny kalibrační řady GSNO. Koncentrace GSNO nižší než  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  již nebyly detekovány. RSNOs nebyly rovněž detekovány ve včelích vzorcích, tudíž se předpokládá, že koncentrace RSNOs je ve včelách nižší, než  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Hladina RSNOs nebyla u hmyzu zatím dle dostupné literatury stanovena. Chemiluminiscenční analyzátor by měl být však schopen detekovat RSNOs o koncentraci až  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . V dalších měřeních by měla být věnována pozornost především lepší přípravě vzorků, pro lepší stanovení RSNOs ve včelách by bylo dobré nanášet větší množství vzorků, původně pouze  $10 \mu\text{l}$  (Planchet a Kaiser, 2006).

## 6 ZÁVĚR

Byla zpracována diplomová práce na téma biosyntézy a metabolismu reaktivních forem dusíku v imunitních odpovědích včel. V této práci byla studována problematika týkající se funkce NO a RNS ve včelách. V rámci dané práce bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1) Byla zpracována literární rešerše o funkci NO v imunitním systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou (*Apis mellifera*).
- 2) Byly zavedeny metody analýzy genové exprese a enzymové aktivity NO synthasy (NOS; EC 1.14.13.39) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR; EC 1.1.1.284) ve vzorcích včely medonosné (*A. mellifera carnica*).
- 3) Pro NOS a GSNOR byly stanoveny kinetické parametry. Hodnota  $K_m$  NOS lokalizované ve včelí hlavě byla stanovena  $3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro enzym GSNOR v extraktech celých těl včel byla hodnota  $K_m$  pro substrát GSNO stanovena  $184,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- 4) Bylo stanoveno, že včelí NOS dosahuje maximální aktivity při  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. V nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů byla aktivita NOS 18% vůči aktivitě enzymu při  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Byla potvrzena inhibice NOS 4 inhibitory o koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (S-ethylisothiomočovina, 7-nitroindazol, L-NAME a aminoguanidin). Při použití D-argininu místo L-argininu jako substrátu byla aktivita enzymu NOS pouze 7% vůči reakci v níž byl použit L-arginin. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro inhibitor N6022 byla stanovena  $82,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- 5) U dospělých včel imunizovaných bakteriálním LPS byla v porovnání s kontrolou popsána zvýšená aktivita NOS a zvýšená hladina  $\text{NO}_2^-$ . Vlivem infekce nebyly pozorovány změny hladin  $\text{NO}_3^-$ .
- 6) U infikovaných sedmidenních včelích larev byla pozorována zvyšující se exprese a aktivita NOS a GSNOR v závislosti na zvyšující se dávce spor *P. larvae*. U larev byl pozorován významný vliv počtu spor *P. larvae* na expresi a aktivitu NOS a GSNOR. Exprese *JHE* nebyla u včelích larev závislá na množství přidávaných spor *P. larvae*. Gen pro *VITELLOGENIN* nebyl u včelích larev amplifikován.

- 7) U dospělých včel byl pozorován minimální, statisticky nevýznamný nárůst exprese *NOS* a *GSNOR*, avšak aktivita *NOS* a *GSNOR* významně vzrostla v odpovědi na napadení včel patogenem. U včel lze pozorovat spojitost mezi imunitní reakcí, aktivitou *NOS* a *GSNOR*. Po vystavení včel bakteriím došlo ke snížení exprese *JHE* a *VITELLOGENINU*.
- 8) RSNOs nebyly ve vzorcích včel použitými metodami detekovány, tudíž jejich koncentrace je pravděpodobně nižší než  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Získané výsledky mohou být využity při dalším zkoumání zapojení RNS v imunitním systému včely medonosné. Tato práce je vůbec první, která se u včel zabývá enzymy *NOS* a *GSNOR* na molekulární úrovni, a navíc patří mezi několik málo prací, které studují biologickou funkci těchto enzymů a NO u včel.

## 7 LITERATURA

- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593-615.
- Ament S. A., Chan Q. W., Wheeler M. M., Nixon S. E., Johnson S. P., Rodriguez-Zas S. L., Foster L. J., Robinson, G. E. (2011): Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology* **214**, 3808-3821.
- Archer S. (1993): Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB Journal* **7**, 349-360.
- Barchuk A. R., Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (2002): Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* **2**, 1-8.
- Beckman J.S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1620-1624.
- Beckman J. S., Ischiropoulos H., Zhu L., van der Woerd M., Smith C., Chen J., Harrison J., Martin J. C., Tsai M. (1992): Kinetics of superoxide dismutase and iron catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**, 438-445.
- Beckman J. S., Koppenol W. H. (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology* **271**, 1424-1437.
- Beutler B. (2004): Innate immunity: an overview. *Biochemistry and Molecular Biology Journal* **40**, 845-859.
- Bicker G., Hähnlein I. (1995): NADPH-diaphorase expression in neurones and glial cells of the locust. *Neuroreport* **6**, 325-328.
- Blackney M. J., Cox R., Shepherd D., Parker J. D. (2014): Cloning and expression analysis of *Drosophila* extracellular Cu Zn superoxide dismutase. *Bioscience Reports* **34**, 851-863.
- Bogdan C. (2015): Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology* **36**, 161-178.
- Bomtorin A. D., Mackert A., Rosa G. C. C., Moda L. M., Martins J. R., Bitondi M. M. G., Hartfelder K., Simões Z. L. P. (2014): Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. *PLoS One* **9**, e86923. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086923>
- Bonini M. G., Radi R., Ferrer-Sueta G., Ferreira A. M., Augusto O. (1999): Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10802-10806.
- 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., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R., Snyder S. H. (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718.
- Bredt D. S., Snyder S. H. (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 175-195.
- Brødsgaard C. J., Ritter W., Hansen H. (1998): Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* larvae spores. *Apidologie* **29**, 569-578.
- Brutscher L. M., Daughenbaugh K. F., Flenniken M. L. (2015): Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 71-82.
- Bustin S. A., Nolan T. (2004): Pitfalls of quantitative Real-Time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**, 155-166.
- Carballal S., Bartesaghi S., Radi R. (2014): Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 768-780.
- Carver J., Doctor A., Zaman K., Gaston B. (2005): S-nitrosothiol formation. *Methods in Enzymology* **396**, 95-105.



- Carr A., McCall M. R., Frei B. (2000): Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **20**, 1716-1723.
- Carton Y., Frey F., Stanley D. W., Vass E., Nappi A. J. (2002): Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. *Journal of Parasitology* **88**, 405-407.
- Conte A., Ottaviani E. (1995): Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *Federation of European Biochemical Societies letters* **365**, 120-124.
- Chandok M. R., Ytterberg A. J., van Wijk K. J., Klessig D. F. (2003): The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**, 469-482.
- Choi S. K., Choi H. K., Kadonookuda 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.
- Clark K. D., Garczynski S. F., Arora A., Crim J. W., Strand M. R. (2004): Specific residues in plasmatocyte-spreading peptide are required for receptor binding and functional antagonism of insect human cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 33246-33252.
- Colasanti M., Venturini G. (1998): Nitric oxide in invertebrates. *Molecular Neurobiology* **17**, 157-174.
- Corona M., Velarde R. A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K. A., Robinson G. E. (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**, 7128-7133.
- Cui J., Abadie C., Carroll A., Lamade E., Tcherkez G. (2019): Responses to K deficiency and waterlogging interact via respiratory and nitrogen metabolism. *Plant, Cell and Environment* **42**, 647-658.
- Dacher M., Gauthier M. (2008): Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. *Physiology and Behavior* **95**, 200-207.
- del Nozal M. J., Bernal J. L., Diego J. C., Gómez L. A., Ruiz J. M., Higes M. (2000): Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *Journal of Chromatography A* **881**, 629-638.
- Dennis E. A., Cao J., Hsu Y. H., Magriotti V., Kokotos G. (2011): Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* **111**, 6130-6185.
- de Sanctis D., Dewilde S., Vonrhein C., Pesce A., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Ponassi M., Nardini M., Bolognesi M. (2005): Bishistidyl heme hexacoordination, a key structural property in *Drosophila melanogaster* hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 27222-27229.
- Dostert C., Jouanguy E., Irvin P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Hoffmann J. A., Imler J. L. (2005): The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunology* **6**, 946-953.
- Dröge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95.
- Dunn P. E. (1986): Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology* **31**, 321-339.
- El Chamy L., Leclerc V., Caldelari I., Reichhart J. M. (2008): Sensing of “danger signals” and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” of Toll. *Nature immunology* **9**, 1165-70.
- Elphick M. R., Green I. C., O’Shea M. (1993): Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. *Brain research* **619**, 344-346.
- 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.
- Feyereisen R. (1999): Insect P450 Enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**, 507-533.
- Flatt T., Heyland A., Rus F., Porpiglia E., Sherlock C., Yamamoto R., Garbuzov A., Palli S. R., Tatar M., Silverman N. (2008): Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 2712-2724.
- 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.
- Ford P. C., Wink D. A., Stanbury D. M. (1993): Autooxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *Federation of European Biochemical Societies letters* **326**, 1-3.
- Förstermann U., Sessa W. C. (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829-837.
- Förstermann U., Xia N., Li H. (2017): Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research* **120**, 713-735.
- Ghiani A., Bruschi M., Citterio S., Bolzacchini E., Ferrero L., Sangiorgi G., Asero R., Perrone M. G. (2016): Nitration of pollen aeroallergens by nitrate ion in conditions simulating the liquid water phase of atmospheric particles. *Science of the Total Environment* **573**, 1589-1597.
- Ghimire K., Altmann H. M., Straub A. C., Isenberg J. S. (2017): Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **312**, 254-262.
- Gibbs S. M., Becker A., Hardy R. W., Truman J. W. (2001): Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **21**, 7705-7714.
- 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., Jarosz J. (2001): Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apiacta* **36**, 12-24.
- Gray B., Carmichael A. J. (1992): Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochemical Journal* **281**, 795-802.
- Green L. S., Chun L. E., Patton A. K., Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012): Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-Nitrosoglutathione reductase. *Biochemistry* **51**, 2157-2168.
- Gregorc A., Ellis J. D. (2011): Cell death localization *in situ* in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**, 200-207.
- Griffith O. W., Stuehr D. J. (1995): Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology* **57**, 707-736.
- Gupta S., Goswami P., Biswas J., Joshi N., Sharma S., Nath C., Singh S. (2015): 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: Involvement of nitric oxide and mitochondria. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **778**, 22-36.
- Ha E. M., Oh C. T., Bae Y. S., Lee W. J. (2005): A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**, 847-850.
- Hemmens B., Mayer B. (1998): Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods in Molecular Biology* **100**, 1-32.
- Hess D. T., Stamler J. S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411-4418.
- Hevel J. M., Marletta M. A. (1994): Nitric-Oxide Synthase Assays. *Methods in Enzymology* **233**, 250-258.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **103**, 788-794.
- Hoffmann J. A. (1995): Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* **7**, 4-10.
- Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1994): The oxidation of alpha-tocopherol and trolox by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **314**, 153-158.

- Holscher C., Rose S. P. (1992): An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neuroscience Letters* **145**, 165-167.
- 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.
- 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.
- Hultmark D. (2003): *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* **15**, 12-19.
- Hwang J., Park Y., Kim Y., Hwang J., Lee D. (2013): An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and Imd pathways by blocking eicosanoid biosynthesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **83**, 151-169.
- Hyršl P., Dobes P., Wang Z., Hauling T., Wilhelmsson C., Theopold U. (2011): Clotting factors and eicosanoids protect against nematode infections. *Journal of Innate Immunity* **3**, 65-70.
- 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.
- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biologické funkce a význam S-nitrosace proteinů. *Chemické listy* **107**, 350-355.
- Jang I. H., Chosa N., Kim S. H., Nam H. J., Lemaitre B., Ochiai M., Kambris Z., Brun S., Hashimoto C., Ashida M., Brey P. T., Lee W. J. (2006): A Spätzle-processing enzyme required for toll signalling activation in *Drosophila* innate immunity. *Developmental Cell* **10**, 45-55.
- Karlhofer J., Schafellner C., Hoch G. (2012): Reduced activity of juvenile hormone esterase in microsporidia-infected *Lymantria dispar* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **11**, 126-128.
- Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S. (1995): Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 273-289.
- Kim G. S., Kim Y. (2010): Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* **56**, 559-566.
- Kitta R., Kuwamoto M., Yamahama Y., Mase K., Sawada H. (2016): Nitric oxide synthase during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: Gene expression, enzyme activity, and tissue distribution. *Development Growth and Regeneration* **58**, 750-756.
- Koppenol W. H., Moreno J. J., Pryor W. A., Ischiropoulos H., Beckman J. S. (1992): Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical Research in Toxicology* **5**, 834-842.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013): S-nitrosoglutathionreduktasa: klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické listy* **107**, 202-208.
- Kubienová L., Tichá T., Luhová L., Petřivalský M. (2016): Detection of S-Nitrosoglutathione Reductase Activity in Plants. In: *Plant Nitric Oxide*. (Gupta K. J. ed.), Springer, New York, U.S.A., 175-189.
- Kwong W. K., Moran N. A. (2016): Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 374-384.
- Lancaster J. R. (1994): Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8137-8141.
- Lancaster J. R. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? *Nitric Oxide* **19**, 68-72.
- Lander H. M., Milbank A. J., Tauras J. M., Hajjar D. P., Hempstead B. L., Schwartz G. D., Kraemer R. T., Mirza U. A., Chait B. T., Burk S. C., Quilliam C. (1996): Redox regulation of cell signalling. *Nature* **381**, 380-381.

- Lange M., Enkhbaatar P., Nakano Y., Traber D. L. (2009): Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Frontiers in Bioscience* **14**, 1979-1989.
- 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.
- Ligoxygakis P., Pelte N., Hoffmann J. A., Reichhart J. M. (2002): Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* **297**, 114-116.
- Lind M., Hayes A., Caprnda M., Petrovič D., Rodrigo L., Kruzliak P., Zulli A. (2017): Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine and Pharmacotherapy* **93**, 370-375.
- Lourenço A. P., Mackert A., dos Santos C. A., Simões Z. L. P. (2008): Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Luckhart S., Rosenberg R. (1999): Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* **232**, 25-35.
- 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 United States of America* **95**, 5700-5705.
- Lui 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.
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. (2002): Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* **30**, 1292-1305.
- Mackert A., do Nascimento A. M., Bitondi M. M., Hartfelder K., Simões Z. L. (2008): Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. - Expression analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 33-44.
- 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.
- McGettigan J., McLennan R. K., Broderick K. E., Kean L., Allan A. K., Cabrero P., Regulski M. R., Pollock V. P., Gould G. W., Davies S. A., Dow J. A. (2005): Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 741-754.
- 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.
- Medzhitov R., Janeway C. A. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298.
- Meunier J. (2015): Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**. <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2014.0102>
- Miller D. M., Buettner G. R., Aust S. D. (1990): Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine* **8**, 95-108.
- Ming M., Obata F., Kuranaga E., Miura M. (2014): Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 7558-7568.
- Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A. (2001): A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **5**, 62-71.
- Montfort W. R., Wales J. A., Weichsel A. (2017): Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor. *Antioxidants and Redox Signaling* **26**, 107-121.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods of Enzymology* **359**, 256-268.
- Müller U. (1994): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *The 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.
- Müller U. (1997): The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology* **51**, 363-381.

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Murad F. (1994): The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Progress in Hormone Research* **49**, 239-248.
- Nachappa P., Levy J., Tamborindeguy C. (2012): Transcriptome analyses of *Bactericera cockerelli* adults in response to “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 803-817.
- Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. (2000): Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric oxide* **4**, 423-430.
- Nathan C. F., Hibbs J. B. (1991): Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology* **3**, 65-70.
- Natsopoulou M. E., McMahon D. P., Paxton R. J. (2016): Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **70**, 1019-1031.
- Negri P., Maggi M. D., Corea-Aragunde N., Brasesco 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., Maggi M. D., Ramirez L., De Feudis L., Szawarski N., Quintana S., Eguaras M. J., Lamattina L. (2015): Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie* **46**, 542-557.
- Negri P., Maggi M. D., Ramirez L., Szawarski N., De Feudis L., Lamattina L., Eguaras M. J. (2016): Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie* **47**, 379-388.
- Negri P., Quintana S., Maggi M. D., Szawarski N., Lamattina L., Eguaras M. J. (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.
- Nighorn A., Gibson N. J., Rivers D. M., Hildebrand J. G., 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.
- Nikolić T. V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D. P. (2015): Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **90**, 181-194.
- Padmaja S., Huie R. E. (1993): The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **195**, 539-544.
- Paoli P. P., Donley D., Stabler D., Saseendranath A., Nicolson S. W., Simpson S. J., Wright G. A. (2014): Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids* **46**, 1449-1458.
- Parker J. D., Parker K. M., Keller L. (2004): Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects. *Insect Molecular Biology* **13**, 587-594.
- Parker J. S., Mizuguchi K., Gay N. J. (2001): A family of proteins related to Spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome. *Proteins* **45**, 71-80.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2002-2007.
- Pfaffl M. W. (2004): Quantification strategies in real-time PCR In: *A-Z of quantitative PCR*. (Bustin S. A. ed.), International University Line, USA, 87-112.
- Piazza M., Guillemette J. G., Dieckmann T. (2015): Dynamics of nitric oxide synthase-calmodulin interactions at physiological calcium concentrations. *Biochemistry* **54**, 1989-2000.
- Pinto L., Bitondi M., Simões Z. (2000): Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology* **46**, 153-160.

- Piulachs M. D., Guidugli K. R., Barchuk A. R., Cruz J., Simões Z. L., Bellés X. (2003): The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 459-465.
- Planchet E., Kaiser W. M. (2006): Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3043-3055.
- 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.
- Radi R. (2013): Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 26464-26472.
- 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.
- 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 United States of America* **92**, 9072-9076.
- Ribeiro J. M., Nussenzveig R. H. (1993): Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *Federation of European Biochemical Societies letters* **330**, 165-168.
- Rivero A. (2006): Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology* **22**, 219-225.
- Royet J., Reichhart J. M., Hoffmann J.A. (2005): Sensing and signalling during infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology* **17**, 11-17.
- Rosales C. (2011): Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *Invertebrate Survival Journal* **8**, 109-131.
- Rosenfeld R. J., Bonaventura J., Szymczyna B. R., MacCoss M. J., Arvai A. S., Yates J. R., Tainer J. A., Getzoff E. D. (2010): Nitric-oxide synthase forms N-NO-pterin and S-NO-cys: implications for activity, allostery, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 31581-31589.
- Sadekuzzaman M., Kim Y. (2018): Nitric oxide mediates antimicrobial peptide gene expression by activating eicosanoid signalling. *PLoS ONE* **13**: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193282>.
- Sadekuzzaman M., Stanley D., Kim Y. (2018): Nitric oxide mediates insect cellular immunity via phospholipase A<sub>2</sub> activation. *Journal of Innate Immunity* **10**, 70-81.
- Salter M., Knowles R. G. (1998): Assay of NOS activity by the measurement of conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by NO. *Methods in Molecular Biology* **100**, 61-65.
- 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.
- Seehuus S. C., Krekling T., Amdam G. V. (2006): Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Experimental Gerontology* **41**, 1117-1125.
- Shrestha S., Kim Y. (2007): An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A<sub>2</sub>. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 64-70.
- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: 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.
- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992): Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **89**, 7674-7677.
- Suzuki T., Mower H. F., Friesen M. D., Gilbert I., Sawa T., Ohshima H. (2004): Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 671-681.

- Tang C. H., Seeley E. J., Huang X., Wolters P. J., Liu L. (2013): Increased susceptibility to *Klebsiella pneumonia* and mortality in GSNOR-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **442**, 122-126.
- Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J. S., Flores-Santana W., Switzer C. H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C. A., Harris C. C., Roberts D. D., Wink D. A. (2009): The chemical biology of nitric oxide. Implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 18-31.
- Tichá T., Činčalová L., Kopečný D., Sedlářová M., Kopečná M., Luhová L., Petřivalský M. (2017): Characterization of S-nitrosoglutathione reductase from *Brassica* and *Lactuca spp.* and its modulation during plant development. *Nitric oxide* **68**, 68-76.
- Tojo S., Naganuma F., Arakawa K., Yokoo S. (2000): Involvement of both granular cells and plasmotocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 1129-1135.
- Tsakas S., Marmaras V. J. (2010): Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Survival Journal* **7**, 228-238.
- Tsikas D. (2007): Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B* **851**, 51-70.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44-84.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.
- Vanha-Aho L. M., Valanne S., Rämetsä M. (2016): Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunology Letters* **170**, 42-51.
- Wang H., Niu Y., Chai R., Liu M., Zhang Y. (2013): Cross-talk between nitric oxide and Ca<sup>2+</sup> in elevated CO<sub>2</sub>-induced lateral root formation. *Plant Signaling and Behavior* **8**, e23106. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.23106>
- Wareham L. K., Buys E. S., Sappington R. M. (2018): The nitric oxide-guanylate cyclase pathway and glaucoma. *Nitric oxide* **77**, 75-87.
- Wegener G., Volke V. (2010): Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals* **3**, 273-299.
- Weiske J., Wiesner A. (1999): Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran estigmene acraea hemocyte line. *Nitric oxide* **3**, 123-131.
- Werner T., Borge-Renberg K., Mellroth P., Steiner H., Hultmark D. (2003): Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 26319-26322.
- Wink D. A., Ford P. C. (1995): Nitric oxide reactions important to biological systems: A survey of some kinetics investigations. *Methods* **7**, 14-20.
- Wink D. A., Kasprzak K. S., Maragos C. M., Elespuru R. K., Misra M., Dunams T. M., Cebula T. A., Koch W. H., Andrews A. W., Allen J.S. (1991): DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**, 1001-1003.
- Wink D. A., Mitchell J. B. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 434-456.
- 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.
- Yuan H., Gerencser A. A., Liot G., Lipton S. A., Ellisman M., Perkins G. A., Bossy-Wetzel E. (2007): Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death and Differentiation* **14**, 462-471.
- Zhu X., Dong J., Shen K., Bai Y., Chao J., Yao H. (2016): Neuronal nitric oxide synthase contributes to pentylentetrazole-kindling-induced hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin* **121**, 138-147.

- Zhou Y., Zhou S., Yu H., Li J., Xia Y., Li B., Wang X.; Wang P. (2016): Cloning and characterization of filamentous fungal S-nitrosoglutathione reductase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 928-937.
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* **32**, 103-103.
- 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.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid hydrochlorid
AMK	aminokyselina/y
AMPs	antimikrobiální peptidy
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
BP	bakalářská práce
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
COX	cyklooxygenasa
CYP	cytochrom P450
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-2DA	diacetát 4,5-diaminofluoresceinu
DAMPs	molekulární vzorky spojené s poškozením
DmNOS	NO synthasa charakterizovaná u octomilky obecné
dsDNA	dvouvláknová DNA
EC <sub>50</sub>	střední účinná koncentrace
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EPOX	epoxygenasa
eNOS	endoteliální NO synthasa
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GOI	gen zájmu (studovaný gen)
GSH	glutathion
Hb	hemoglobin

HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
HKG	housekeeping gen
Hsp90	heat shock protein 90
IC <sub>50</sub>	inhibiční konstanta 50 (koncentrace inhibitoru, při níž enzym dosahuje 50% aktivity vůči reakci neinhibované)
IKK	IκB kinasy
iNOS	inducibilní NO synthasa
JAK	Janusovy kinasy
JH	juvenilní hormon
JHE	esterasa juvenilního hormonu
L-NAME	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginine-methylester
L-NNA	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginin
LOX	lipoxygenasa
LPS	lipopolysacharidy
metHb	methemoglobin
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitrotetrazoliová modř
NED	N-(1-naftyl)etylendiamin
nNOS	neuronální NO synthasa
oxyHb	oxyhemoglobin
Q-Q graf	kvantil-kvantil graf
PAMPs	molekulární vzory spojené s patogenem
PGRP	protein rozpoznávajícího peptidoglykany
PIAS	proteinový inhibitor aktivované STAT
PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa 2

PRRs	receptory rozpoznávající patogen
PSH	protein Persephone
PSP	plasmocyte-spreading peptid
PVPP	polyvinylpyrrolidon
RSNOs	S-nitrosothioly
SOCS	supresor cytokinové signalizace
SOD	superoxiddismutasa
SPE	Spaetzle zpracující enzym
ssDNA	jednovláknová DNA
STAT	převodníky signálu a aktivátory transkripčních proteinů (STAT)
TAB 2/3	proteiny vázající se na TAK
TAK	kinasa aktivovaná transformujícím růstovým faktorem 1
TLRs	Toll podobné receptory