

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha NADPH-oxidas a duálních oxidas v imunitě
hmyzu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Adam Kiška**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.**
Rok: 2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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 S., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za cenné rady a odborné vedení jak při psaní, tak při práci v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu Katedry biochemie za vstřícný přístup a ochotu kdykoliv poradit.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adam Kiška
Název práce	Úloha NADPH-oxidasy a duálních oxidas v imunitě hmyzu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Bakalářská práce je v teoretické části zaměřena na charakterizaci enzymové rodiny NADPH-oxidasy (Nox) a duálních oxidas (Duox). V úvodu práce je stručně popsána duální role reaktivních forem kyslíku (ROS). Následující kapitoly se zabývají převážně molekulárními vlastnostmi Nox/Duox a jejich funkci v interakci střevního epitelu hmyzu s mikroby. V poslední části jsou shrnuty metody pro stanovení aktivity Nox/Duox v biologických systémech.

V experimentální části práce byla zaváděna fluorimetrická analýza pro stanovení aktivity Nox/Duox ve vzorcích včel medonosných nakažených různými patogeny. Pro detekci tvorby ROS ve střevech včel byla využita histochemická metoda s diaminobenzidinem. V neposlední řadě bylo zpracováno bioinformatické srovnání Nox/Duox octomilek a včel.

Klíčová slova	Duální oxidasy, NADPH-oxidasy, octomilka obecná, reaktivní formy kyslíku, včela medonosná
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Adam Kiška
Title	Role of NADPH-oxidases and dual oxidases in insect immunity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2021

Abstract

In the theoretical part, the thesis is focused on the characterization of NADPH-oxidases (Nox) and dual oxidases (Duox) protein family. At the beginning of the work there is a short description of the dual role of reactive oxygen species (ROS). Next chapters deal with the molecular properties of Nox/Duox and their function in the interaction of the gut epithelium with microbes. The last part summarizes the methods of measuring Nox/Duox activity in biological systems.

In the experimental part of the thesis, the fluorimetric assay for measurement of Nox/Duox activity in honeybees infected with different pathogens was introduced. For the detection of ROS production in the intestines of honeybees, a histochemical assay with diaminobenzidine was used. Last a bioinformatic comparison of Nox/Duox of fruit flies and honeybees was compiled.

Keywords	Dual oxidases, fruit fly, honeybee, NADPH-oxidases, reactive oxygen species
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	11
2.1 Molekulární vlastnosti Nox/Duox	11
2.1.1 Struktura a geny Nox/Duox	12
2.1.2 Lokalizace Nox/Duox	15
2.1.3 Mechanismy katalýzy Nox/Duox	16
2.1.4 Mechanismy regulace exprese a aktivity Nox/Duox	19
2.2 Funkce Nox/Duox v interakci střevního epitelu hmyzu s mikroby	21
2.3 Specifické znalosti o Duox u modelových organismů hmyzu	24
2.4 Přehled metod stanovení aktivity Duox	25
2.4.1 Stanovení aktivity Duox a kvantifikace produktu H ₂ O ₂	25
2.4.1.1 Metoda s AR + HRP	26
2.4.1.2 Metoda s HVA	27
2.4.1.3 Metoda se skopoletinem	27
2.4.2 Využití rhodaminové próby R19S pro histochemickou detekci Duox	28
2.4.3 Ověření uracilu jako induktoru Duox ve střevě <i>Drosophila</i>	29
3 Experimentální část	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Chemikálie	30
3.1.2 Přístroje a vybavení	30
3.1.3 Biologický materiál	30
3.2 Metody	31
3.2.1 Příprava biologických vzorků pro Bradfordovu metodu a fluorimetrii	31
3.2.2 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou	31
3.2.2.1 Příprava pracovního roztoku Bradfordova činidla	31
3.2.2.2 Příprava standardů BSA (hovězí sérový albumin)	32
3.2.2.3 Postup měření	32
3.2.3 Fluorimetrické stanovení aktivity Duox pomocí AR	32
3.2.3.1 Příprava zásobních roztoků	32
3.2.3.2 Příprava standardů H ₂ O ₂ pro kalibrační křivku metody s AR	33
3.2.3.3 Příprava reakčního činidla	33
3.2.3.4 Úprava biologických vzorků před měřením	33
3.2.3.5 Postup měření	33
3.2.4 Histochemická detekce produkce H ₂ O ₂ metodou s DAB	34
3.2.4.1 Příprava zásobních roztoků	34
3.2.4.2 Izolace střev včel	34

3.2.4.3 Příprava vzorků pro histochemickou detekci Duox	35
3.2.5 Bioinformatické porovnání Nox/Duox octomilek a včel	36
3.2.5.1 Srovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí	36
3.2.5.2 Teoretické stanovení pI a M _w	36
3.2.5.3 Předpokládaná místa fosforylace	36
3.2.5.4 Předpokládaná místa N-glykosylace	36
3.2.5.5 Předpokládaná 3D struktura	37
4 Výsledky a diskuze	38
4.1 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou	38
4.1.1 Určení kalibrační přímky metody	38
4.1.2 Stanovení celkového obsahu proteinů biologických vzorků	39
4.2 Stanovení obsahu H ₂ O ₂ fluorimetrickou metodou s AR	39
4.2.1 Určení kalibrační přímky	39
4.2.2 Stanovení aktivity Nox/Duox	40
4.3 Histochemická detekce aktivity Duox	43
4.4 Bioinformatická analýza	48
4.4.1 Srovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí	48
4.4.2 Teoretické stanovení pI a M _w	49
4.4.3 Predikce fosforylačních míst Nox/Duox	50
4.4.4 Predikce N-glykosylačních míst Nox/Duox	51
4.4.5 Predikce 3D struktury Nox/Duox	52
5 Závěr	54
6 Literatura	55
7 Seznam použitých zkratk	60

Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši shrnující aktuální poznatky o vlastnostech, funkci a významu NADPH-oxidasy (Nox) a duálních oxidas (Duox) v metabolismu reaktivních forem kyslíku (ROS)
- Zpracovat souhrn spektrofotometrických a histochemických metod stanovení aktivity Nox/Duox ve vzorcích střev včel a octomilek
- Srovnání orthologních Nox a Duox včel a octomilek pomocí *in silico* metod

1 Úvod

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou skupinou chemicky reaktivních iontů, radikálů a molekul vzniklých z kyslíku. V průběhu 90. let minulého století se ukázalo, že v podstatě všechny živočišné a rostlinné buňky vytvářejí ROS. Tehdy ještě převládal názor, že se jedná o vedlejší produkt buněčného dýchání a metabolismu. Také se mělo za to, že ROS vykazují pouze pro buňky toxické vlastnosti – např. poškození DNA nebo oxidaci lipidů (poškození membrán). S příchodem nového století se však změnil i názor na ROS. Bylo zjištěno, že většina vzniká kontrolovaným způsobem enzymy. Rovněž došlo k objevu antioxidantních systémů a jejich role v udržování rovnováhy ROS (Griendling a Harrison, 1999).

Dnes už víme, že v organismu mají ROS široké spektrum fyziologických funkcí – účastní se např. biosyntézy hormonů, fungují také jako mikrobicidní nebo signální molekuly. Právě jejich duální role – možnost fungovat jako signální nebo obranné molekuly, z nich dělá ideální nástroj v interakci živočichů s mikrobiálními buňkami. Při nízké koncentraci jsou i jejich negativní vlastnosti (vysoká reaktivita s biologickými strukturami, čímž dochází k jejich narušení) minimální a ROS tak mohou fungovat např. jako signál pro další enzymy. Při vysoké koncentraci pak jejich cílené užití funguje převážně jako nástroj k eliminaci mikroorganismů, nadprodukce však obecně může vést k buněčnému stárnutí a smrti.

Důležitost ROS ve vrozené imunitě byla poprvé pozorována ve fagocytech (buňka schopná fagocytózy – pohlcování pevných částic z okolí). Po jejich aktivaci v nich totiž dochází k masivnímu úbytku kyslíku. To je způsobeno funkcí fagocytické NADPH-oxidasy (Nox; EC 1.6.3.1) – enzymu přeměňujícího kyslík na reaktivní superoxid. Tato oxidasa spolu s dalším členem této enzymové skupiny, duální oxidasou (Duox; EC 1.6.3.1), hraje velmi důležitou roli v interakci živočichů s mikroorganismy. Jedinci, kteří nemají funkční oxidasu, mají sníženou obranyschopnost a jsou náchylní ke zvýšenému počtu mikrobiálních infekcí – trpí tzv. chronickou granulomatosní chorobou (CGD) (Rada a Leto, 2008).

V posledních 90 letech bylo o funkci ROS ve vrozené imunitě zjištěno velké množství informací – mezi nejvýznamnější se řadí právě eliminace mikrobů ve fagocytech (Segal *et al.*, 2000). I přes všechny tyto objevy však zůstává mnoho principů ohledně všech funkcí ROS-závislé eliminace mikroorganismů v organismu předmětem zájmu výzkumů a diskuzí a předpokládá se, že objevů mnoha dalších nových rolí Nox a Duox v imunitě

bude přibývat. Studium těchto enzymů na modelových organismech (v tomto případě octomilky obecné – *Drosophila melanogaster*) přispívá k pochopení funkcí imunity nejen patogeny velmi ohrožených živočichů (jako je např. včela medonosná – *Apis mellifera*), ale také imunity člověka.

2 Současný stav řešené problematiky

Hmyz (v této práci se zaměřením na octomilky a včely) má oproti člověku jednodušší imunitní systém. Jelikož se jedná o živočichy ze skupiny bezobratlých (*Invertebrata*), jejich imunita se omezuje pouze na vrozené složky – nespecifické a neadaptivní mechanismy. Tento imunitní systém se dá rozdělit na buněčnou a humorální složku. K buněčné se řadí přímé interakce hemocytů (struktury analogické fagocytům), zatímco do humorální složky patří interakce látek vyskytujících se v hemolymfě – především antimikrobiální peptidy (AMP) (Bergin *et al.*, 2005). V poslední době se však pozornost vědců zaměřuje i na imunitní procesy v trávicí soustavě, kde dochází k vzájemnému působení epitelových buněk s patogenními i symbiotickými mikroorganismy. Z důvodů funkční podobnosti se savčími Nox/Duox, hemocytů s fagocyty a obdobně uspořádané trávicí soustavě je hmyz ideální modelový organismus pro zkoumání vrozené imunity živočichů (Browne *et al.*, 2014).

2.1 Molekulární vlastnosti Nox/Duox

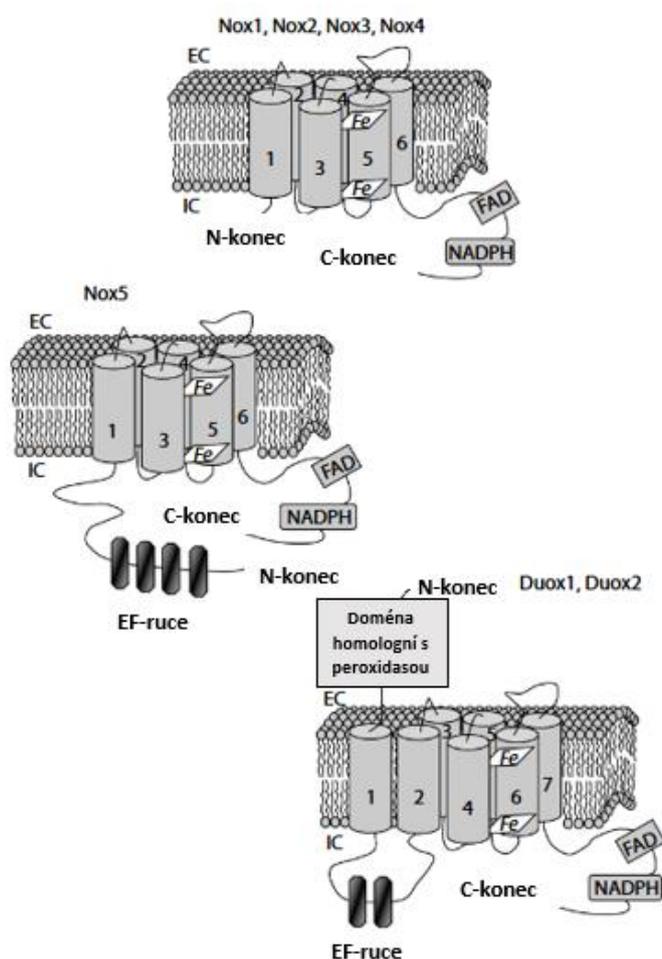
V posledních třiceti letech došlo k objevům dalších homologů Nox, čímž se ustanovila Nox/Duox rodina těchto enzymů. V průběhu 90. let se začaly tvořit první genové databáze, a právě při výzkumu genů bylo zjištěno, že Nox2 je sice hlavní představitel Nox/Duox rodiny, ale že u většiny živočichů existuje také dalších 6 homologních enzymů: Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 a Duox2 (Rada a Leto, 2008). Členové této enzymové rodiny existují už od rozdělení živočišné a rostlinné říše (Kawahara a Lambeth, 2007).

Rodina Nox/Duox je však nejvíce prozkoumaná u lidí, u kterých např. genetická porucha Nox2 způsobuje CGD. Takto postižený člověk má z důvodu defektů Nox2 oslabené fagocyty a je poté ve větší míře náchylný k určitým bakteriálním infekcím. Je-li totiž porušena tvorba superoxidu, nevznikají ani další typy ROS a z nich odvozené mikrobicidní látky.

Enzymy z Nox/Duox rodiny jsou elektrogenní (transportující elektrony), ovlivňují membránový potenciál, indukují apoptosu, regulují produkci cytokinů, ovlivňují genovou expresi a podporují tvorbu neutrofilních extracelulárních pastí (NET). NET jsou mimobuněčná vlákna tvořená DNA, na která jsou navázané proteiny. Tyto proteiny (např. myeloperoksidasa MPO; EC 1.11.2.2) jsou schopny eliminovat bakterie, houbová vlákna, ale i degradovat mikrobiální toxiny (Rada a Leto, 2008).

2.1.1 Struktura a geny Nox/Duox

Všechny Nox/Duox jsou schopny oxidovat NAD(P)H a přenášet elektrony přes membránu. Hlavní rozdíl je v různých podjednotkách a způsobu aktivace jednotlivých enzymů. Celá rodina Nox/Duox sdílí většinu základních strukturních a funkčních vlastností, které byly poprvé popsány u Nox2 (Obr. 1). Jedná se o vazebná místa pro NAD(P)H a FAD na jejich C-koncové doméně a 2 hemové skupiny v membránách. Struktury Nox1, Nox3 a Nox4 obsahují 6 transmembránových helixů a C-koncovou flavodoménu. Jsou tedy velmi podobné Nox2, na rozdíl od Nox5 – ta má navíc v cytosolu na N-terminálním konci 4 domény EF-rukou. EF-ruce jsou struktury zachytávající vápenaté ionty, které fungují jako aktivátor enzymu. Duox1 a Duox2 mají navíc extracelulární N-koncovou doménu, která v závislosti na typu tkáně váže další enzym homologní peroxidase (Rada a Leto, 2008). Proto se tento typ enzymu z rodiny Nox/Duox nazývá „duální“ – jedná se o 2 spojené enzymy.



Obr. 1: Schémata struktur enzymů z rodiny Nox/Duox; EC – extracelulární prostor; IC – intracelulární prostor (upraveno dle Rada a Leto, 2008).

Prvním objeveným enzymem z této skupiny byl Nox2 (ve starší literatuře zvaný také phox). Nejdůležitější součástí proteinového komplexu Nox2 je flavocytochrom b558. Jedná se o heterodimer zakotvený v membráně, který je tvořen větším 65kDa glykoproteinem gp91phox (podle nového názvosloví Nox2) a menším 22kDa proteinem p22phox. Nox2 obsahuje celou soustavu proteinových složek pro přenos elektronů. K C-konci proteinu (v cytoplasmě) jsou připojena vazebná místa pro FAD a NAD(P)H. Na hydrofobní (membránový) N-konec Nox2 je napojeno 6 transmembránových helixů. Na třetím a čtvrtém helixu se dále nachází hemová prostetická skupina připojená k histidinovému residuu. Elektrony z NAD(P)H tedy v celém komplexu přecházejí nejdříve přes FAD, poté postupně přes obě hemové skupiny a nakonec na molekulu kyslíku (intra- nebo extracelulárního). Ke komplexu dále patří 4 cytoplasmatické komponenty – p47phox, p67phox, p40phox a Rac1 nebo Rac2 (EC 3.6.5.2) (Geiszt a Leto, 2004; Lambeth, 2004).

Menší podjednotka flavocytochromu (p22phox) obecně plní větší množství rolí. V první řadě váže podjednotku p47phox, funguje tedy jako vazebné místo pro cytosolické regulační podjednotky. Dále funguje jako maturační faktor potřebný pro správnou glykosylaci, hraje důležitou roli ve stabilizaci celého cytochromového heterodimeru a při vnitrobuněčném cílení proteinů (Nauseef, 2004).

Jako první nový, a zároveň nejbližší, homolog Nox2 byl objeven Nox1. Dohromady sdílejí 56% shodu v sekvenci aminokyselin (564 aminokyselin). Molekulová hmotnost Nox1 se pohybuje kolem 65 kDa. Kromě strukturních podobností fungují i na velmi podobném principu – Nox1 vyžaduje k úplné aktivitě p22phox a Rac1. Jsou si tak podobné, že Nox1 je v buněčných modelech schopen částečně zastoupit Nox2 v tvorbě ROS, ačkoliv podjednotky Nox2 (p47phox a p67phox) s Nox1 vedou k menší produkci superoxidu (Rada a Leto, 2008). Nox1 má však další cytosolické podjednotky schopné indukovat vyšší produkci superoxidu. Jedná se o Nox organizer 1 (Noxo1, homolog p47phox) a Nox aktivátor 1 (Noxa1, homolog p67phox) (Geiszt *et al.*, 2003a). Hlavní rozdíl mezi Noxo1 a p47phox je, že Noxo1 chybí hyperfosforovatelná autoinhibiční oblast (AIR), který se váže k p22phox a membránovým fosfolipidům. Nejvýraznější odlišností mezi Nox2 a Nox1 je tedy absence schopnosti kontrolovat aktivitu enzymu Nox1. Nox1 tedy vykazuje konstitutivní aktivitu, která může být dále zvýšena phorbol 12-myristát 13-acetátem (PMA).

Stejně jako Nox1 je i Nox3 multikomponentní oxidasa strukturou podobná Nox2 (taktéž 65 kDa). U Nox3 byla zjištěna vysoká základní aktivita, která může být dále

zvýšena jedním nebo oběma podpůrnými cytosolickými podjednotkami patřícími k Nox1 nebo Nox2. Enzymu Nox3 nebyla přiřazena žádná specifická role ve vrozené imunitě, ačkoliv během pokusů s mutantními myši bylo zjištěno, že zřejmě hraje roli ve vnímání gravitace a rovnováhy. Při mutacích v Noxo1 byl zjištěn podobný efekt, předpokládá se tedy, že se může jednat o fyziologického partnera Nox3 (Rada a Leto, 2008).

Nox4 sdílí s Nox2 39% homologii, molekulová hmotnost je 67kDa. Ke své stabilizaci a schopnosti produkovat ROS potřebuje podjednotku p22phox, ale její aktivita není ovlivněna žádným z cytosolických partnerů Nox1 nebo Nox2 (Noxo1, Noxa1, p47phox, p67phox a Rac) (Rada a Leto, 2008). Nox4 vykazuje vysokou konstitutivní aktivitu. V lidských embryonálních ledvinových buňkách HEK293 byla Nox4 nalezena v intracelulárních kompartmentech, což znamená, že vyprodukovaný superoxid je ihned dismutován a zachycen jako extracelulární peroxid vodíku.

Posledním a nejunikátnějším členem Nox skupiny Nox/Duox je Nox5. Molekulová hmotnost je vyšší – 86 kDa. U lidského enzymu Nox5 se navíc rozlišuje 5 isoform (Bánfi *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001). Na rozdíl od všech ostatních Nox enzymů obsahuje cytoplasmatické domény obsahující 4 motivy EF-rukou. Ty jsou schopny zachytit zvýšenou koncentraci intracelulárních vápenatých iontů, které poté aktivují Nox5.

Duox1 a Duox2 jsou největšími z celé rodiny Nox/Duox – jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 180 kDa. S Nox2 sdílejí 50% shodu v sekvenci aminokyselin a mezi sebou 83% homologii v sekvenci aminokyselin. Na C-koncích mají struktury podobné Nox, zatímco k N-koncům mají připojené domény podobné peroxidasám. Cytosolické úseky Duox obsahují 2 proteinové motivy EF-rukou, které po zachycení vápenatých iontů ovlivňují aktivitu, a tedy i uvolňování H₂O₂. Duox1 i Duox2 mají 2 stavy N-glykosylace – částečnou, kdy vytváří superoxid, a úplnou, kdy jsou schopné generovat H₂O₂ (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005).

Zpočátku byly pokusy o expresi aktivních Duox v heterologních systémech neúspěšné, protože se nedařilo přenést získané proteiny do plasmatické membrány. Tento jev byl objasněn objevem esenciálních maturačních faktorů – Duoxa1 a Duoxa2. Duox ke své aktivitě nevyžadují p22phox, ačkoliv jsou schopny spolu interagovat (De Dekeen *et al.*, 2002; Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005).

Všechny 4 lidské geny kódující složky Duox (Duox1/2 a Duoxa1/2) se nachází v těsné blízkosti na chromosomu 15. Tento objev podporuje domněnku o tom, že Duox a jejich odpovídající maturační faktory jsou nejspíše koordinovány stejnými promotorovými sekvencemi (Rada a Leto, 2008).

Naopak geny kódující hlavní složky lidského enzymu Nox2 se nacházejí na odlišných chromosomech. Největší glykoprotein Nox2 (g91phox) je kódován genem *CYBB* a nachází se na chromosomu X, stejně jako Nox1. Menší protein p22phox je kódován genem *CYBA* vyskytující se na chromosomu 16 (Rada a Leto, 2008). Další geny *NCF1*, *NCF2* a *NCF4* kódují p47phox, p67phox a p40phox. Mutace v nich jsou obecně spojené s rozvojem CGD (Segal *et al.*, 1978). Gen pro Nox3 se nachází na chromosomu 6, Nox4 na chromosomu 11 a Nox5 na chromosomu 15.

Nejdůkladnější zprávu o výzkumu v oblasti genů Nox/Duox vydali Kawahara a Lambeth (2007). Zkoumali aminokyselinové sekvence regulačních podjednotek enzymů z Nox/Duox rodiny (p47phox, NOXO1, p67phox, p22phox a NOXR) u 32 různých druhů rostlin, živočichů a hub. Ve svém výzkumu se snažili určit molekulární evoluci podjednotek Nox/Duox, převážně pak vývoj jejich biochemických a fyziologických funkcí. Nejranější geny podobné těm, které dnes kódují Nox2, p47phox a p22phox, se začaly objevovat ještě před příchodem živočichů (Kawahara a Lambeth, 2007). Z detailních analýz aminokyselinových sekvencí také přišli s evolučním modelem, podle kterého p40phox v raných obratlovcích původně reguloval Nox2 i Nox1. U savců následně regulace Nox1 přestala být závislá na podjednotce p40phox (Kawahara a Lambeth, 2007).

U oddělení prvoústých (*Ecdysozoa*), mezi něž se řadí i včely a octomilky, se vyskytuje pouze Nox5 a jeden typ Duox. Orthologní gen pro Nox2 nebyl v genomu včel ani octomilek nalezen. Taktéž u prvoústých nebyly zjištěny žádné geny pro regulační podjednotky p47phox, p67phox a p22phox, i když jsou široce rozšířené u zbytku živočichů (Kawahara a Lambeth, 2007).

2.1.2 Lokalizace Nox/Duox

Enzymy z rodiny Nox/Duox se nacházejí v membránách buněk – obvykle v plasmatické membráně, kdy se ROS vylučují do extracelulárního prostoru, nebo také v membránách semiautonomních organel. U hmyzu se Nox i Duox nachází jak v hemocytech, tak i v epitelových buňkách střev, ačkoliv každý enzym v jiné části trávicího traktu (Dutta *et al.*, 2015).

Nox1 se u lidí nachází v plasmatické membráně epitelových buněk střev, hladké svaloviny cév, děloze, placentě, prostatě, buňkách endotelu a osteoklastech (Bedard a Krause, 2005).

Pro Nox2 je charakteristický výskyt ve fagocytujících buňkách – monocytech a makrofázích (Snelgrove *et al.*, 2014). V lidských buňkách byly nalezeny převážně v endotelu cév nebo kardiomyocytech (Snelgrove *et al.*, 2006).

Enzym Nox3 je z celé rodiny Nox/Duox prozkoumaný nejméně. Byl nalezen v ledvinách plodů (v malém množství i u dospělých), játrech, plicích a slinivce (Chakraborti *et al.*, 2013).

Nox4 byla poprvé popsána v ledvinách, kde je také nejvíce zastoupená (Geiszt *et al.*, 2000). Byla ale také nalezena v dalších lidských tkáních a buňkách: játrech, vaječnicích, osteoklastech, fibroblastech, buňkách plodu, hepatocytech, aortě a plicích (Nada *et al.*, 2012; Park a Lee, 2013). Široká distribuce Nox4 naznačuje pravděpodobné velké množství funkcí od vnímání kyslíku a jeho metabolitů až po fibrotické procesy.

Nejčastějším místem exprese enzymu Nox5 jsou pachytenní spermatocyty ve varlatech, slezina a lymfatické uzliny. Ve slezině a lymfatických uzlinách se Nox5 vyskytují převážně v oblastech se zvýšeným množstvím lymfocytů a nejspíš plní signální funkci. (Rada a Leto, 2008)

Duox byly objeveny ve štítné žláze, kde sloužily jako primární zdroj peroxidu vodíku (Dupuy *et al.*, 1999). Ten je důležitý pro syntézu hormonů štítné žlázy. Duox se také nacházejí v epitelových buňkách dýchacích cest, kanálech slinných žláz a v zažívacím traktu živočichů (Gerson *et al.*, 2000). Duox lokalizované mimo štítnou žlázu na sliznicích plní převážně imunitní funkci – peroxid vodíku může sloužit jako substrát pro laktoperoxidasu (LPO; EC 2.7.11.24) nebo MPO (Geiszt *et al.*, 2003b).

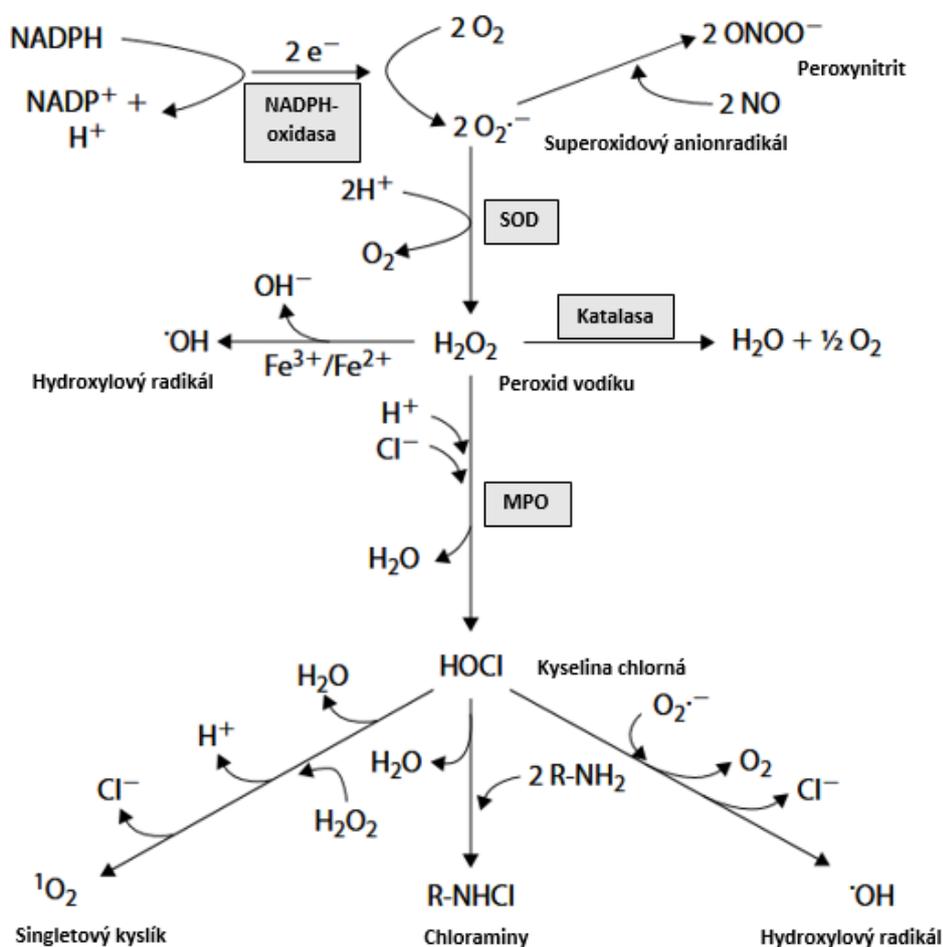
2.1.3 Mechanismy katalýzy Nox/Duox

Rodina Nox/Duox může být dělena také podle typu ROS, který je enzymy produkován. Nox1, Nox2, Nox3 a Nox5 produkují primárně superoxidový anionradikál, kdežto hlavní detekovaný produkt Nox4, Duox1 a Duox2 je peroxid vodíku. K Duox jsou dále navázané enzymy homologní s peroxidasami – jsou schopny převést H_2O_2 na jiné produkty, které mají vyšší mikrobicidní aktivitu.

Nejvíce je aktivace Nox/Duox patrná v neutrofilních granulocytech po pohlcení bakterie. Tento děj je obvykle spojen s velkým úbytkem molekulárního kyslíku, který je obecně známý jako tzv. respirační (někdy též oxidativní) vzplanutí. To je potřebné k tvorbě ROS, které mohou být následně přeměněny na další bakteriocidní látky (Obr. 2). V následujících reakcích ale může být kyslík také redukován až na vodu přijetím 4 elektronů a 4 protonů: $O_2 > O_2^{\cdot-} > H_2O_2 > \cdot OH > H_2O$. Meziistupně této redukční řady

jsou obecně více reaktivní než kyslík. Kyslík může také být excitovaný absorbováním energie, přičemž jeden nespárovaný elektron změní spin a O_2 se přemění na vysoce reaktivní singletový kyslík 1O_2 .

Respirační vzplanutí je spojeno s přímou redukcí molekulárního kyslíku v proteinovém komplexu Nox/Duox jedním elektronem a výslednou produkcí superoxidových aniontradikálů do lumenu fagosomu, kde může být přeměněn na široké spektrum vysoce reaktivních mikrobicidních ROS. Při reakci je oxidováno NAD(P)H z cytoplasmy na NAD(P)⁺, přičemž se uvolní dva elektrony a jeden proton. Proton zůstává v cytoplasmě a elektrony posléze přechází plasmatickou membránou fagocytu a spojí se s dvěma molekulami kyslíku, čímž dojde ke vzniku dvou superoxidových aniontradikálů v extracelulárním nebo intrafagosomálním prostoru. Superoxidy obvykle předávají jeden elektron a redukují jiné molekuly nebo struktury, např. cytochrom C (Rada a Leto, 2008).



Obr. 2: Schéma znázorňující kyslíkové metabolity fagocytů (upraveno dle Rada a Leto, 2008).

Dva superoxidy mohou ovšem reagovat také samy se sebou za vzniku kyslíku a peroxidu vodíku, přičemž spotřebují 2 protony. Tato spontánně probíhající reakce, nazývaná dismutace, tedy vede ke zvýšení pH. Dismutace může také být katalyzovaná enzymaticky pomocí superoxid dismutasy (SOD; EC 1.15.1.1). Předpokládá se, že superoxid je pouze slabě toxický. Velmi pomalu totiž reaguje s různými biologickými strukturami a není schopný procházet přes membrány. Po respiračním vzplanutí tak vzniká velké množství peroxidu vodíku po dismutaci (spontánní i pomocí SOD) vzniklého superoxidu. Peroxid vodík se obecně považuje za toxický, rychle totiž reaguje s velkým množstvím biologicky důležitých struktur (ačkoliv jeho deriváty jsou však obvykle ještě mnohem více reaktivní). Neutrofile jsou vystaveny vysokým koncentracím peroxidu vodíku, musely si tedy vyvinout obranné mechanismy. Katalasy (EC 1.11.1.6) přeměňují peroxid vodíku na vodu a kyslík. Dalším antioxidačním systémem je např. glutathionový cyklus.

V neutrofilech se pH udržuje v neutrální oblasti (6,5-7,0), což je ideální hodnota pro neutrofilní proteasy (např. elastasy; EC 3.4.21.37 nebo cathepsin G; EC 3.4.21.20). To je možné díky alkalizaci způsobené enzymy z rodiny Nox/Duox. V neutrofilech postižených CGD nebo po použití difenyljodonium chloridu (DPI; flavoenzymový inhibitor všech Nox/Duox) pH rychle klesá na 5,0-5,5. Udržení neutrálního pH je tedy důležité pro co nejvyšší účinnost eliminace mikroorganismů. Kromě aktivity Nox/Duox je pH a složení iontů ve fagosomu ovlivněno i dalšími iontovými kanály a transportéry: H⁺-ATPasa (EC 7.1.2.2), Na⁺/H⁺-antiportem a přenašečem chloridových aniontů aniontů ClC-3 (Rada a Leto, 2008).

Přenosem elektronů zároveň depolarizuje fagosomální membrána. Tato depolarizace generovaná Nox2 pohání přemístění protonů a draselných iontů do fagosomu. Protony zajišťují neutrální pH potřebné pro optimální fungování proteas a oxidas. Draselné ionty aktivují latentní proteasy granulového matrixu. Nox/Duox se tedy na mikrobicidní aktivitě podílejí nejen přímo tvorbou ROS, ale i nepřímo udržováním neutrálního pH a spouštěním proteas v neutrofilech, podílejících se na eliminaci bakterií (Rada a Leto, 2008).

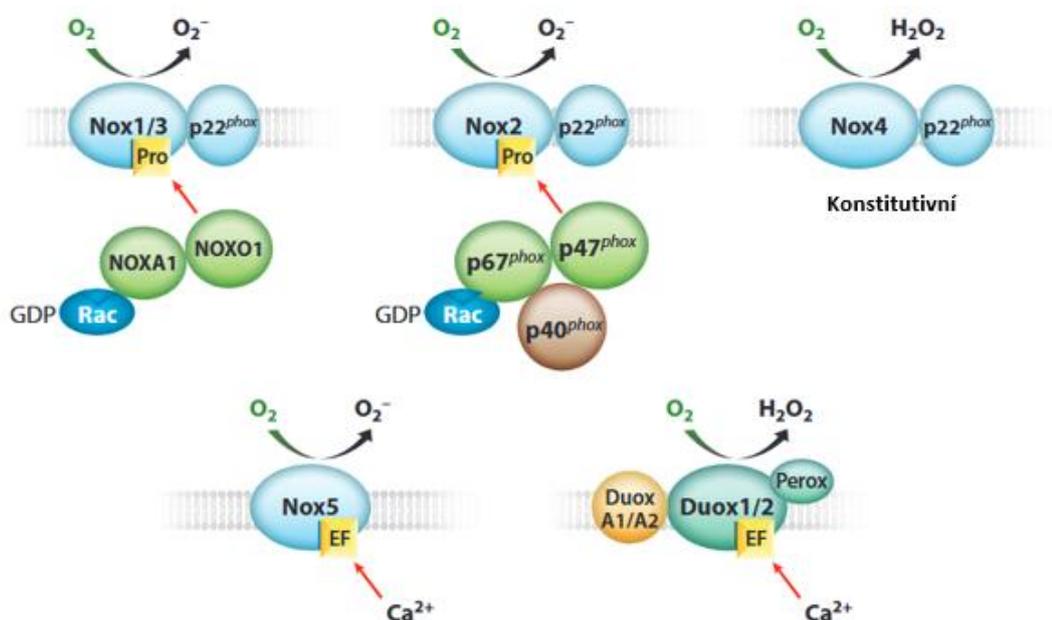
Neschopnost většiny ROS působit mimo přímé okolí přispívá k selektivě jejich reakcí. Superoxid má pouze limitovanou schopnost procházet lipidovými membránami, zatímco peroxid vodíku může dále fungovat jako signál až na vzdálenost ekvivalentní několika buňkám (Lambeth a Neish, 2014). Tato selektivita může být dále podpořena vytvořením komplexu mezi Nox/Duox a jejím „cílem“. Některé receptory a signální

proteiny mohou interagovat s Nox/Duox, čímž se limituje specificita signalizace pomocí ROS pouze na efektorový protein (Kim *et al.*, 2007). Rozdílná subcelulární lokalizace, různá intenzita aktivačního signálu a vývojové stádium buňky tedy pravděpodobně rozhodují o buněčné odpovědi na vytvořený ROS.

Bylo také zjištěno, že H_2O_2 hraje důležitou roli v přenosu signálů v buňce i mezi nimi, jelikož se jedná o nenabitou molekulu, která je schopná volně procházet plasmatickými membránami. V porovnání s ostatními ROS je i velmi stabilní – poločas rozpadu H_2O_2 je více než 1 ms (např. superoxidový anionradikál a singletový kyslík 1-4 μs a hydroxylový radikál pouze 1 ns). Všechny tyto vlastnosti dělají z H_2O_2 ideálního druhého posla, což bylo následně potvrzeno v mnoha studiích (Sundaresan *et al.*, 1995; Ushio-Fukai *et al.*, 1998).

2.1.4 Mechanismy regulace exprese a aktivity Nox/Duox

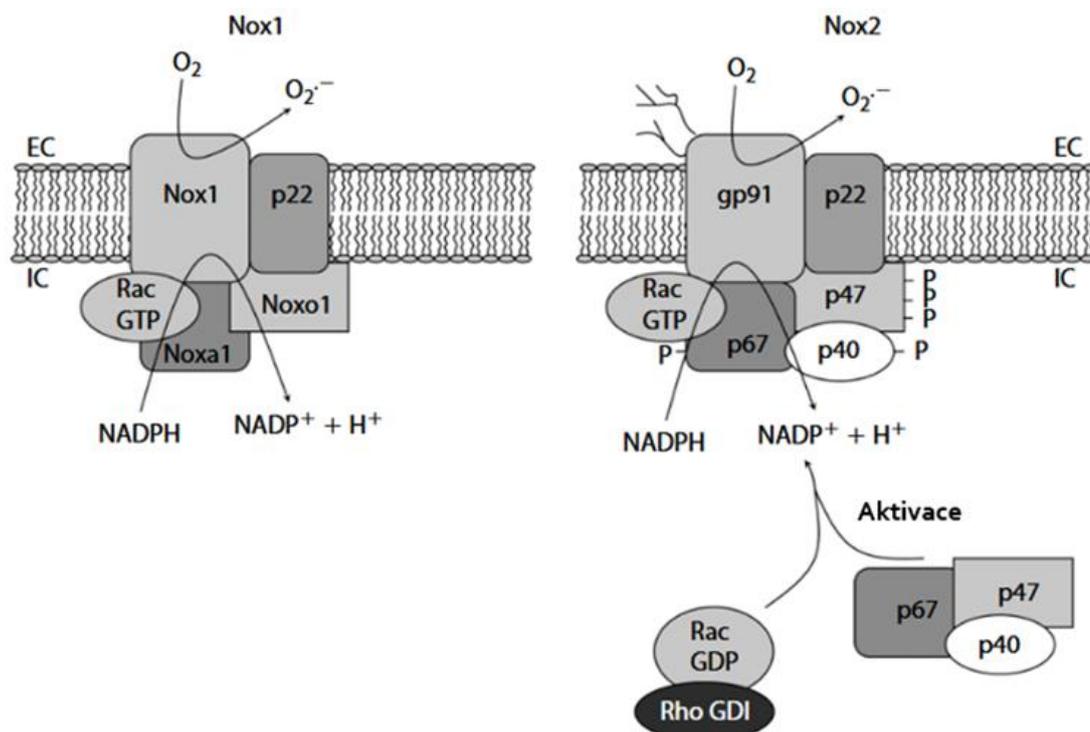
Enzymy z rodiny Nox/Duox se dají dělit také podle typu regulace exprese (Obr. 3). V první skupině jsou ty, které ke své funkci potřebují podjednotku p22phox (Nox1-4). Podskupina Nox mající p22phox se dá dále rozčlenit na skupiny s vazebnou oblastí bohatou na prolin (PRR), kterou obsahují Nox1, Nox2 a Nox3, a na konstitutivně aktivní Nox4, který neobsahuje PRR. V druhé skupině jsou pak ty enzymy, které jsou regulovány vápenatými ionty pomocí specifických domén EF-rukou (Nox5, Duox1 a Duox2).



Obr. 3: Schéma struktur Nox1-5 a Duox1/2 a způsobů jejich aktivace (upraveno dle Lambeth a Neisch, 2014).

V neaktivovaných neutrofilech jsou všechny 3 cytosolické podjednotky Nox2 uloženy v jednom komplexu (Obr. 4). Největší doména p47phox se váže s doménou p67phox pomocí C-koncové PRR na p47phox a C-koncové doméně Src homologie 3 (SH3) na p67phox (Kami *et al.*, 2002). V neaktivované buňce se komplex p47phox-p67phox neváže k flavocytochromu b558, protože jsou SH3 domény p47phox (bis-SH3 domény) navázány na AIR, což zabraňuje vazbě bis-SH3 domény s PRR p22phox. Po aktivaci buňky dojde na p47phox k vysokému stupni fosforylace serinových zbytků AIR, což uvolní bis-SH3 a může dojít k vazbě na p22phox (Groemping *et al.*, 2003). Kromě toho obsahuje p47phox další oblast schopnou vazby na membránu – PX doménu. PX doména se váže na „hlavy“ fosfatidylinositolů tvořících membránu (Karathanassis *et al.*, 2002). Jakmile se p47phox na membráně spojí s p22phox, gp91phox i p67phox, dojde k aktivaci interakcí p67phox s flavocytochromem b558. Podjednotka p67phox je posléze také fosforylována. Současně dochází k translokaci Rac-GTP na membránu, kde interaguje s N-terminální oblastí tetra-tryptofanového opakování na p67phox (Lapouge *et al.*, 2000). V neaktivních buňkách se Rac nachází v cytoplasmickém komplexu s guaninnukleotidovým disociačním inhibitorem. Tento komplex se po aktivaci rozpadne, dojde k přeměně z Rac-GDP na Rac-GTP (Vignais, 2002). Rac je posléze nezávisle na všech třech ostatních komponentech přemístěn k membráně. Aktivační doména p67phox je konformačně regulovaná vazbou Rac (Sarfstein *et al.*, 2004). Spojení všech podjednotek na membráně umožňuje proud elektronů skrz flavocytochrom (Rada a Leto, 2008). Po aktivaci p67phox tedy dojde ke spuštění přenosu atomu vodíku z NAD(P)H na FAD v Nox2. Následný přenos elektronů přes dvě hemové skupiny umožní redukci kyslíku za vzniku superoxidového anionradikálu. Vazba p40phox je uskutečněna skrz Phox/Bem 1 (PB1) doménu na partnerskou PB1 doménu p67phox, což usnadňuje spojení p67phox-p47phox na membráně pomocí vazby PX domén na lipidy (Wilson *et al.*, 2003).

Skupina regulovaná vápenatými ionty je tvořena Nox5 a Duox 1 a 2 (obsahují N-koncovou doménu homologní s peroxidasami).



Obr. 4: Schéma aktivace Nox1 a Nox2 pomocí jejich cytosolických podjednotek; EC – extracelulární prostor; IC – intracelulární prostor (upraveno dle Rada a Leto, 2008).

2.2 Funkce Nox/Duox v interakci střevního epitelu hmyzu s mikroby

Trávicí trakt všech živočichů je osídlen bakteriemi, které můžeme rozdělit na autochtonní a allochtonní. Autochtonní bakterie se ve střevech vyskytují přirozeně a jsou často komensální nebo symbiotické. Pro allochtonní bakterie není trávicí trakt přirozené prostředí a rozmnoží se pouze v pro ně příznivých podmínkách (jedná se většinou o oportunistické patogeny). Hostitelské organismy tedy musí udržovat homeostázu – eliminovat patogeny a zároveň ponechat symbionty (Lee *et al.*, 2013).

Z důvodů podobnosti s trávicím traktem živočichů a jednoduchému složení mikrobioty jsou octomilky ideálním modelem ke studiu interakcí (nejen) hmyzího epitelu s mikroby. Mikrobiota ve střevech octomilek obvykle sestává z 5 až 30 druhů bakterií, převážně z rodů *Acetobacter* a *Lactobacillus* (Broderick a Lemaitre, 2014).

Ve střevech octomilek jsou ROS produkovány Nox i Duox v reakci na bakterie (Lee *et al.*, 2013). Ve vysoké koncentraci ROS fungují jako mikrobicidní molekuly převážně proti patogenům. Dlouhodobá expozice vyšším koncentracím ROS ale může působit negativně i proti samotnému hostiteli, což může vést k patologickým stavům. Naopak nízké koncentrace ROS pak slouží jako signální molekuly aktivující střevní kmenové buňky (ISC) a tím i obnovu střevního epitelu (Patel *et al.*, 2013). ISC se vyskytují ve střevech savců i hmyzu, kde z nich vznikají enterocyty. Ty kromě absorpce živin také

interagují se střevní mikrobiotou (Jiang a Edgar, 2012). Jak komensální, tak i patogenní bakterie mohou způsobit antimikrobiální odpovědi, ale také vyvolat obměnu epitelu (Buchon *et al.*, 2013).

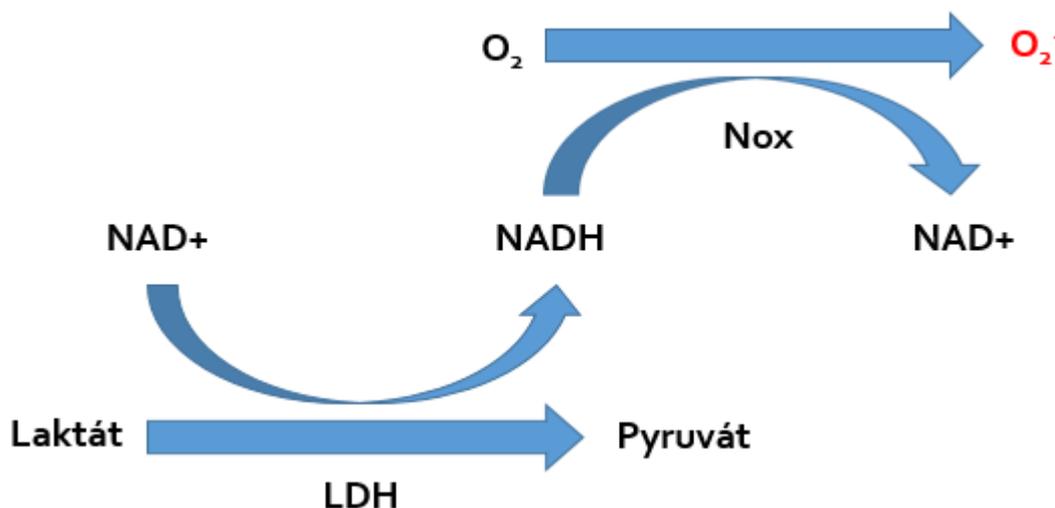
Kromě mikrobicidní funkce tedy mají ROS také funkci při proliferaci ISC (Buchon *et al.*, 2009). Ta může probíhat buď přímo – menší množství H₂O₂ slouží jako signální molekula mezi enterocyty a ISC bez způsobení většího poškození nebo využití stresové signalizace. K tomuto typu signalizace obnovy buněk střevního epitelu dochází především při styku se symbionty – po nedestruktivním poškození se aktivují cytokiny, které podporují tvorbu nových střevních buněk. K nepřímé obnově dochází při poškození epitelu bakteriemi a ROS (nebo jejich metabolity) při jejich eliminaci. Způsobeným poškozením dochází ke spuštění stresových odpovědí, což pak pravděpodobně aktivuje ISC. V tomto případě jsou ROS zaznamenány Jun N-terminálními kinasami (JNK; EC 2.7.11.24), což jsou enzymy, které mají funkci v zaznamenávání stresových podnětů. JNK poté indukují pro-proliferativní cytokiny z Leptin/IL-6 skupiny (Buchon *et al.*, 2009). Tyto cytokiny aktivují JAK/STAT signály v ISC, čímž spouští jejich proliferaci a urychlují regeneraci střevního epitelu.

Změny ve složení přirozené mikrobioty se obecně nazývají komensální dysbiososa. U lidí bývají spojené s mnoha patologickými stavy, jako jsou např. chronické a idiopatické střevní záněty nebo rakovina (Clemente *et al.*, 2012). Dysbiososa ve střevech octomilek se projevuje podobně – narušením homeostázy, zánětem a zkrácenou délkou života (Clark *et al.*, 2015). Ke změně ve složení střevní mikrobioty dochází i přirozeným procesem stárnutí. Bylo zjištěno, že přes 95 % všech bakterií v trávicím traktu dospělých zdravých octomilek tvoří bakterie z rodu *Lactobacillus* (Iatsenko *et al.*, 2018). Ve střevech octomilek jsou procesy stárnutí spojeny především se zvýšeným počtem mikroorganismů, intenzivnější imunitní reakcí, vyšší koncentrací ROS, dysplasií (porucha, při které dochází k expanzi nezralých buněk na úkor zralých; pravděpodobně způsobená chronickým drážděním), úbytkem kompartmentalizace nebo prasknutím membrán (Li *et al.*, 2016). Bohužel je zatím velice obtížné určit přesné vztahy a kauzalitu mezi imunitní dysfunkcí, dysbiosou a dysplasií.

Komensální a symbiotické střevní bakterie jsou hostitelském organismu v mnoha ohledech prospěšné – např. pomáhají v trávení nebo produkují některé vitaminy. Komensální bakterie jsou však schopny také podpořit obnovu epitelových buněk ve střevech octomilek i myši (Jones *et al.*, 2013). Tento specifický efekt je nejsilnější u symbiotických bakterií rodu *Lactobacillus*, které stimulují tvorbu ROS pomocí Nox.

Funkce Nox ve střevním epitelu octomilek byla objevena v roce 2018 při studiích Iatsenka *et al.* (2018). Bylo zjištěno, že kyselina mléčná tvořená bakteriemi rodu *Lactobacillus*, kromě zvýšení acidity, nepřímo aktivuje funkci Nox ve střevech. Laktát je pomocí laktátdehydrogenasy (LDH; EC 1.1.1.27) oxidován na pyruvát za redukce NAD⁺ na NADH, který slouží jako substrát pro Nox (Obr. 5). S přibývajícím věkem roste populace bakterií rodu *Lactobacillus*, a tedy i množství NADH ve střevech. ROS zde ovšem neslouží jako hlavní mikrobicidní molekuly. Populace symbiotických bakterií je redukována pomocí AMP. Indukce tvorby ROS pomocí kyseliny mléčné také nespouštělo Duox (Iatsenko *et al.*, 2018). Důvodem může být i fakt, že enzymy Nox a Duox jsou exprimovány v různých oblastech trávicího traktu octomilek a mají rozdílné funkce.

Duox slouží především k eliminaci patogenů - jsou aktivovány uracilem, který uvolňuje patogenní bakterie (např. *Erwinia carotovora*) (Lee *et al.*, 2013). Role Nox a Duox je odlišná nejen v imunitě, ale i při regeneraci epitelu. ROS generované Duox indukují regeneraci k opravě akutního poškození způsobeného infekcí. Oproti tomu ROS vytvořené Nox slouží k zajištění základní obnovy buněk v reakci na přirozenou mikrobiotu (Iatsenko *et al.* 2018).



Obr. 5: Schéma zobrazující mechanismus tvorby ROS oxidací laktátu (upraveno dle Iatsenko *et al.*, 2018).

2.3 Specifické znalosti o Duox u modelových organismů hmyzu

Obecně se dají imunitní odpovědi hmyzu dělit podle reakce na mikrobiální signály – tento jev se nazývá „molekulární vzory asociované s mikroby“ (MAMP). Ke kontrole množství bakterií se využívají 2 rozdílné dráhy. První z nich je signální dráha „immune deficiency“ (IMD), která k eliminaci bakterie využívá AMP. Ty se vytváří jako reakce na peptidoglykan v buněčné stěně G⁺ bakterie. Druhá dráha je pak spouštění tvorby mikrobicidních ROS pomocí enzymů z Nox/Duox rodiny – ve střevech hmyzu především Duox. Spouštěčem tvorby (elicitem) ROS u octomilek a včel je bakteriální uracil, který slouží jako ligand aktivující Duox (Lee *et al.*, 2013; Azzouz-Olden *et al.*, 2018). Obě tyto dráhy mohou být aktivní současně a eliminovat tak širokou škálu patogenů.

Při genetických analýzách byly objeveny 2 dráhy regulující funkci Duox po indukci patogeny. První z nich je zaměřena na enzymovou aktivitu a zahrnuje signalizaci zprostředkovanou Gαq-PLCβ-Ca²⁺ (EC 3.1.4.11). Druhá dráha ovlivňuje genovou expresi Duox pomocí aktivace MEKK1-MKK3-p38 MAPK signální dráhy (Ha *et al.*, 2009). Uracil je schopen aktivovat obě dráhy, což poté vede k produkci velkého množství ROS (Lee *et al.*, 2013).

Uracil uvolněný allochtonními bakteriemi spouští zánětlivé procesy nutné k eliminaci patogenů a přežití hosta. Naopak absence uvolňování uracilu umožňuje symbiotickým bakteriím dobře kolonizovat střeva. Přítomnost komensálních bakterií však není schopna inhibovat účinek uracilu, a tudíž i aktivaci Duox a vznik ROS. Chronická aktivace Duox při dlouhodobém vystavení uracilu vede k patogenezi. Tento stav se může vyskytnout během přemnožení i jinak prospěšných autochtonních bakterií, kdy nadměrné množství jednoho nebo více komensálních a symbiotických druhů vede k narušení rovnováhy mikrobioty. Dlouhé trvání takové situace následně vede k dysfunkcím a nemocem (Lee *et al.*, 2013).

Chmiel *et al.* (2019) se zabývali vlivem neonikotinoidových insekticidů na včely a další opylovače, kteří jsou vystaveni pouze subletálními koncentracemi těchto chemikálií. Předpokládá se, že neúmyslné vystavení včel medonosných (*A. mellifera*) neonikotinoidům přispívá k snižování jejich populací. Neonikotinoidy interferují s imunitními drahami ve střevech hmyzu, ale mechanismus interakcí nebyl znám. Chmiel *et al.* na modelovém organismu *D. melanogaster* zkoumali hypotézu, že imidacloprid (běžný neonikotinoid) může ovlivnit funkci Duox. Výsledky ukázaly, že vystavení subletálními dávkami imidaclopridu skutečně redukuje produkci H₂O₂ pomocí inhibice

transkripce genu *Duox*, což je nejspíš způsobeno reakcí imidaclopridu ve střevech s prvky IMD dráhy. Snížená produkce ROS následně vedla k omezení regulace mikroorganismů – došlo k masivnímu úbytku rodů *Lactobacillus* a *Acetobacter*, které jsou důležité k postupné obnově epitelových buněk ve střevech. Předběžné podávání probiotických bakterií naopak vedlo k omezení škodlivých efektů imidaclopridu (Chmiel *et al.*, 2019).

2.4 Přehled metod stanovení aktivity Duox

Při biochemických studiích na hmyzu je v první řadě nutné připravit vzorky. Postup jejich přípravy se liší v závislosti na požadované metodě.

Při měření aktivity enzymů se obvykle jedná o zamražení hmyzu při odběru vzorků. Zamražené vzorky se následně rozdělí na jednotlivé tělní části (hlava, hrud' a zadeček), které se poté homogenizují v tekutém dusíku. Dále se provádí extrakce požadovaných látek vhodným extrakčním pufrem. V následujícím kroku se centrifugací oddělí nerozpustné části; případně lze také využít ultracentrifugace k separaci membránové frakce. V získaném extraktu se Bradfordovou metodou stanovuje celkový obsah proteinů.

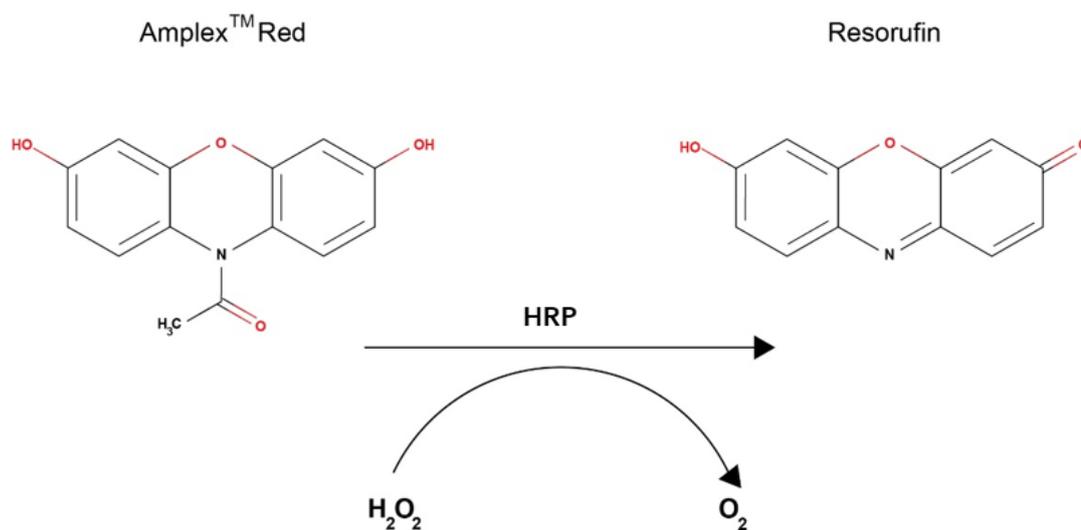
Postup pro (imuno)histochemické metody začíná uspáním hmyzu pomocí přístroje s CO₂. Poté se hmyz rozdělí na jednotlivé tělní části, které mohou být dále rozpitvány např. na mozek a žlázy z hlavy nebo střevo a tukové těleso ze zadečku. Připravený preparát může být dále zafixován formaldehydem a zalit do vosku. Následně se z něj připraví tenké řezy na vibratomu. Posléze je vzorek inkubován se značenými protilátkami nebo různými činidly. Takto zpracovaný vzorek je připravený na mikroskopická pozorování. Vyhodnocení výsledků se provádí formou analýzy obrazu (např. v programech ImageJ nebo podobných nástrojích).

2.4.1 Stanovení aktivity Duox a kvantifikace produktu H₂O₂

Ke kvantifikaci produkce H₂O₂ se dají využít oxidovatelné próby jako např. skopoletin, kyselina homovanilová (HVA) nebo AmplexRed (AR; N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin) v přítomnosti křenové peroxidasy (HRP; EC 1.11.1.7). Oxidace skopoletinu vede ke snížení fluorescence, naopak oxidace HVA a AR fluorescenci zvyšuje – tyto metody jsou tedy obecně senzitivnější. Všechny próby byly původně vyvinuty k měření aktivity Nox2, ale dají se využít i k detekci extracelulárního H₂O₂ produkovaného dalšími Nox a Duox. Přesná detekce H₂O₂ pomocí těchto metod vyžaduje přidavek SOD, protože superoxid může reagovat s próbou, což následně může ovlivnit reakci próby s H₂O₂ a vést ke snížení fluorescenčního signálu (Nauseef, 2014).

2.4.1.1 Metoda s AR + HRP

Dias *et al.* (2013) provedl měření Duox-zprostředkované produkce H_2O_2 po kultivaci tkání při 25 °C na 60 min v Tyrodově roztoku (používá se jako náhrada fyziologického prostředí) s AR a HRP. Aktivita Duox je závislá na přítomnosti vápenatých iontů, tvorba H_2O_2 byla tedy zjišťována po preinkubaci vzorků s ionomycinem (ionofor pro Ca^{2+} – zvyšuje jejich intracelulární koncentrace) a bez něj, s BAPTA/AM (chelátor intracelulárních Ca^{2+}) nebo obojím po dobu 10 min při 28 °C. Inhibice aktivity Duox byla dosažena preinkubací s DPI, jako nespécifického inhibitoru flavoproteinů. Fluorescence nespécifické (H_2O_2 -nezávislé) oxidace AR byla určena při absenci HRP – použito jako blank. Oxidace AR peroxidem vodíku v přítomnosti HRP probíhá ve stechiometrii 1:1. Tato reakce je nevratná a tvoří se při ní resorufin (Obr. 6). Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány a následně byl sebrán supernatant. Poté lze měřit fluorescenci (excitace při 530 nm a emise při 590 nm) pomocí mikrodestičkového spektrofotometru. Spodní hranice detekce H_2O_2 je 5 pmol, limit kvantifikace je 30 pmol. Porovnáním naměřených výsledků se standardní křivkou definovaných koncentrací H_2O_2 v přítomnosti AR a HRP je možno vypočítat koncentrace vzniklého H_2O_2 (Nauseef, 2014). Hlavními problémy této metody jsou její nekompatibilita s redukčními činidly (např. DTT, merkaptoethanol) a nutnost zachování úzkého rozmezí pH 7-8.



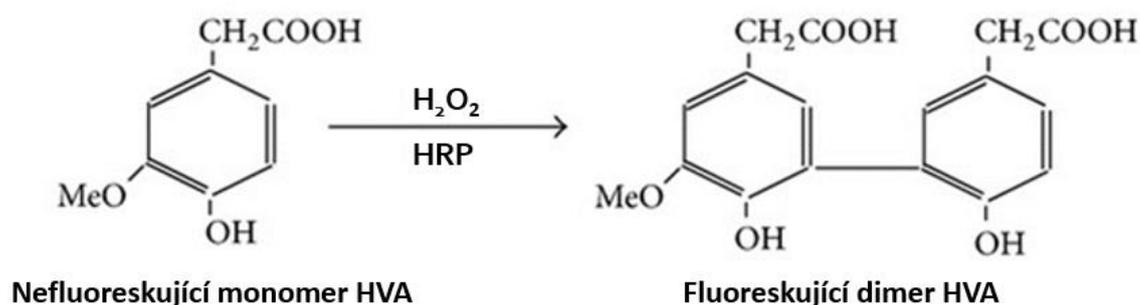
Obr. 6: Schéma oxidace AR na resorufin po oxidaci pomocí H_2O_2 katalyzované HRP (upraveno dle Karakuzu *et al.*, 2019).

2.4.1.2 Metoda s HVA

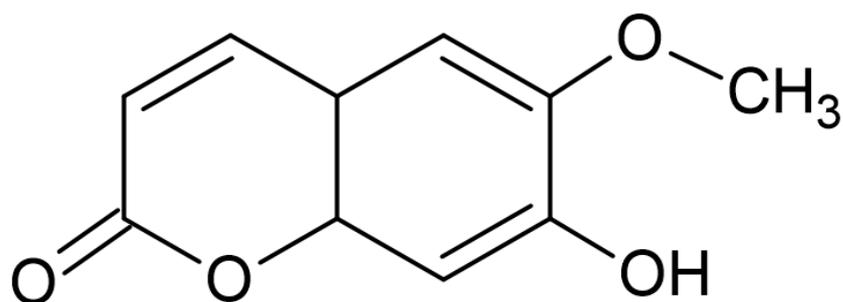
Martyn *et al.* (2006) provedli měření produkce H_2O_2 lidských buněčných kultur HEK transfekovaných kosmidy nesoucími gen pro Nox4. Do každé jamky destičky bylo umístěno 1-3 x 10^5 buněk. Následující den byly buňky jednou promyty PBS pufrem. Poté bylo do každé jamky přidáno 1-2 ml roztoku HVA (HVA, HRP v PBS s Ca^{2+} a Mg^{2+}), ze kterého se po oxidaci pomocí H_2O_2 stává fluoreskující dimer HVA (Obr. 7). Následně byly buňky inkubovány při 37 °C po dobu 30-120 min. V dalším kroku byl přidán HVA stop pufr (glycin, NaOH, EDTA v PBS, pH 12) do roztoku HVA. Fluorescence je měřena po excitaci při 312 nm, emise při 420 nm. Koncentrace H_2O_2 jsou z naměřených hodnot vypočítány podle kalibrační křivky.

2.4.1.3 Metoda se skopoletinem

Při výzkumu Ginabreda *et al.* (2008) byly vzorky frakcí z požadované tkáně inkubovány při 30 °C v Na-fosfátovém pufru (pH 7,4) obsahujícím azid sodný, EGTA, FAD a $CaCl_2$. Reakce byla započata přidávkem NADPH. Poté byly každých 20 min sbírány poměrné části (aliquoty), které byly následně smíchány s HCl. Tímto došlo k zastavení reakce a odstranění zbývajícího NADPH. Hodnoty koncentrací vzniklého H_2O_2 byly z aliquotů odečteny z úbytku fluorescence skopoletinu (Obr. 8) za přítomnosti HRP ve fosfátovém pufru (pH 7,8). Vlnové délky použité pro fluorimetrické měření byly 360 nm pro excitaci a 460 nm pro emisi. Specifická aktivita byla následně vyjádřena podle kalibrační křivky na mg proteinu – nmol H_2O_2 /h na mg proteinu.



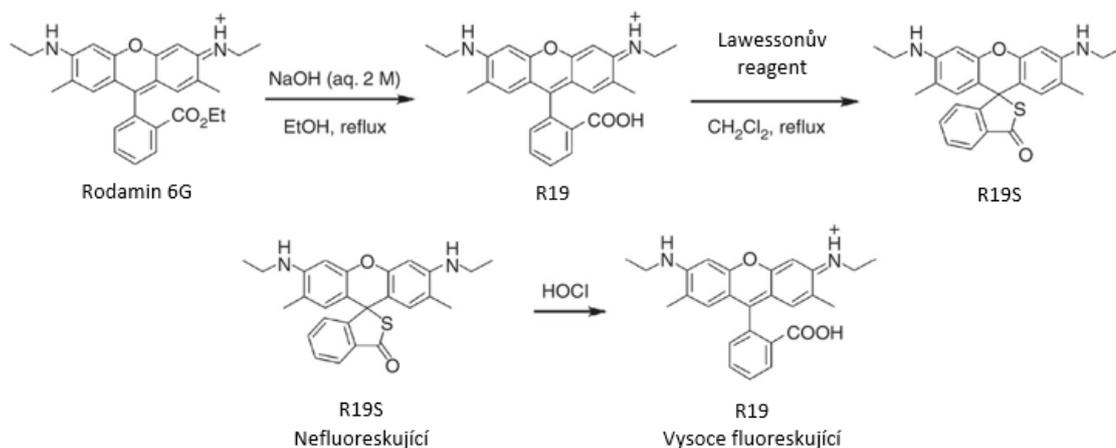
Obr. 7: Schéma mechanismu produkce fluoreskujícího dimeru HVA po oxidaci pomocí H_2O_2 katalyzované HRP (upraveno dle Paital, 2014).



Obr. 8: Vzorec skopoletinu.

2.4.2 Využití rhodaminové próby R19S pro histochemickou detekci Duox

Chen *et al.* (2016) využil rhodaminovou próbu R19S (Obr. 9) pro histochemickou detekci kys. chlorné HOCl jako jednoho z produktů aktivity Duox ve střevech octomilek. V prvním kroku byly po dobu 2 h při 25 °C dehydratovány 4-5 d staré samičí mušky v prázdných plastových dózách. Dále byly mušky přeneseny do plastových dóz na kultivaci obsahujících filtrační papír nasáklý roztokem *Ecc15* (*E. carotovora carotovora* 15) pro orální infekci. Zde byly mušky 30 min při 25 °C. Následně byly mušky přeneseny do plastové dózy na kultivaci obsahujících filtrační papír nasáklý roztokem *Ecc15* s R19S po dobu 1 h při 25 °C. Po anestezii s komerčně dostupnou anestetickou CO₂ stanicí byly z mušek v PBS pufru se rychle odpitvána (ideálně za méně než 30 s) střeva, která byla následně zafixována v 4% paraformaldehydu (10 min při 25 °C). Každý vzorek střev byl následně promyt v roztoku PBS vychlazeném na ledu a umístěn na podložní sklíčko s pufrém. Poté bylo pomocí konfokální mikroskopie (excitace při 514 nm a emise při 530-603 nm) možné pozorovat signál fluorescenční próby odpovídající produkci HOCl ve střevech.



Obr. 9: Schéma syntézy R19S a reakce nefluoreskující próby R19S s HOCl za vzniku vysoce fluoreskující R19 (upraveno dle Chen *et al.*, 2016).

2.4.3 Ověření uracilu jako induktoru Duox ve střevě *Drosophila*

Postup probíhal podobně jako v předchozí metodě. Mušky byly krmeny 5% roztokem sacharózy obsahujícím různé stimuly (živé bakteriální kultury o koncentracích 5×10^8 buněk, bakteriální supernatant – z kultur v pozdních exponenciálních fázích; cca 5×10^7 bakterií) nebo chemikáliím – uracil) po dobu 30 min bez R19S a 60 min s R19S o koncentraci $10 \mu\text{M}$ (Lee *et al.*, 2013).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Lachema (Česká republika): hydroxid draselný, hydroxid sodný.

Lach-Ner (Česká republika): ethanol, formaldehyd, glycerol, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina fosforečná, kyselina octová, peroxid vodíku.

Penta (Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid vápenatý.

Roth (Německo): diaminobenzidin.

Serva (Německo): křenová peroxidasa.

Sigma-Aldrich (Německo): dihydrát fosforečnanu disodného, hovězí sérový albumin, uracil.

Thermo Scientific (USA): difenyljodonium chlorid, NADPH.

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr InoLab pH level1 (Inolab, Německo)

Digitální předvážky (Radwag®, Polsko)

Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Inkubační lázeň Dry Bath Incubator (Major Science, USA)

Inkubovaná třepačka TS-100 (BioSan, Lotyšsko)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)

Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)

Mikroskop Olympus BX50 (Olympus, Japonsko)

Vortex mixer (Stuart, UK)

3.1.3 Biologický materiál

Všechny včely byly poskytnuty z chovů Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. Živé včely byly použity k histochemické detekci. Zamražené včely byly využity ke stanovení změn v aktivitě Nox/Duox po inokulaci různými patogeny (Tab. 1). Včely byly inokulovány patogeny buď orálně, nebo injekčně do hemolymfy. V případě orální infekce byly jako

kontrola použity včely krmeny cukrem, inokulace proběhla patogeny *Paenibacillus larvae* (G+ bakterie) a *Ascospaera apis* (houbový patogen). V případě imunizace injekcí bylo do zadečku kontrolní skupiny včel injektováno 5 μ l sterilního PBS pufru, do druhé skupiny bylo injektováno 5 μ l směsi obsahující 10^5 teplem usmrcených bakteriálních buněk *Escherichia coli* (G- bakterie) a *P. larvae* v 0,01M PBS pufru (pH 7,0) v poměru 1:1.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava biologických vzorků pro Bradfordovu metodu a fluorimetrii

Nejprve bylo z každé skupiny zamražených včel naváženo množství o hmotnosti cca 1 g. Toto množství bylo poté rozetřeno v třecí misce uložené na ledu. Následně byl do třecí misky přidán zásobní pufr ve dvojnásobném množství k hmotnosti včel. Dále bylo pipetou sebráno co možná největší množství uvolněné tekutiny do 1,5ml mikrozkušavek Eppendorf, které byly do centrifugace uloženy na ledu. Následně byly vzorky zcentrifugovány 10 min při 16000 RCF a 4 °C. Posléze byl odebrán supernatant, který sloužil jako biologický vzorek pro Bradfordovu metodu a fluorimetrii. Takto připravené vzorky byly po celou dobu práce uchovávány na ledu a po dokončení experimentu uchovávány v mrazáku při -20 °C.

3.2.2 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou

Ke stanovení obsahu proteinů byla použita modifikovaná metoda s měřením při 590 a 450 nm podle Zora a Selinger (1996).

3.2.2.1 Příprava pracovního roztoku Bradfordova činidla

Zásobní roztok Coomasie Blue byl připraven předem na Katedře biochemie rozpuštěním 50 mg Coomasie Blue G250 v 25 ml 100% methanolu, 50 ml 85% kys. fosforečné a doplněn ddH₂O na 100 ml. Při přípravě pracovního roztoku Bradfordova činidla byl zásobní roztok Coomasie Blue naředěn ddH₂O v poměru 1:4 – byly použity 4 ml Coomasie Blue a 16 ml ddH₂O. Výsledný pracovník roztok má hnědomodrou barvu a je stabilní cca týden při 4 °C.

Tab. 1: Parametry zamražených vzorků včel.

Vzorek	Patogen	Typ inokulace	Tělní části	Rok zamražení
1	Kontrola	orálně	celé tělo	2015
2	<i>P. larvae</i>	orálně	celé tělo	2015
3	<i>A. apis</i>	orálně	celé tělo	2015
4	Kontrola	injekčně	hlava + hrud'	2018
5	<i>E. coli</i> + <i>P. larvae</i>	injekčně	hlava + hrud'	2018

3.2.2.2 Příprava standardů BSA (hovězí sérový albumin)

Byl přichystán zásobní roztok BSA o koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($= 2000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Postupným ředěním byla připravena kalibrační řada standardů BSA o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 a $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.2.2.3 Postup měření

Do jednotlivých jamek 96jamkové průhledné mikrodestičky bylo postupně pipetováno $45 \text{ } \mu\text{l}$ ddH₂O, $5 \text{ } \mu\text{l}$ standardu nebo biologického vzorku a $200 \text{ } \mu\text{l}$ pracovního roztoku Bradfordova činidla. Následně byla destička mírně protřepána pro promíchání vzorků a ponechána v klidu cca 15 min, během kterých se vyvíjelo zbarvení. Poté byla změřena na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS absorbance při 590 a 450 nm.

3.2.3 Fluorimetrické stanovení aktivity Duox pomocí AR

Při experimentu byla použita modifikovaná metoda dle Diase *et al.* (2013) – AR reaguje s peroxidem vodíku v přítomnosti HRP ve stechiometrii 1:1 za tvorby resorufinu, který lze stanovit měřením fluorescence (excitační maximum při 563 nm, emisní maximum při 587 nm).

3.2.3.1 Příprava zásobních roztoků

K fluorimetrickému stanovení aktivity Duox pomocí AR byly připraveny následující roztoky:

- **Zásobní 50mM K-fosfátový pufr** (pH = 7,0): bylo naváženo 1,74 g směsi pufru, doplněno H₂O na objem 200 ml a upraveno na pH 7,0;
- **10mM AR** – připraveno na Katedře biochemie; 1,3 mg AR bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO a zamraženo při -20°C ;
- **Křenová peroxidasa** ($20 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$): navážka 0,2 mg HRP (aktivita $1000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) bylo rozpuštěno v 10 ml zásobního pufru a zamraženo;

- **Zásobní roztok H₂O₂:** byl připraven postupným ředěním 30% peroxidu zásobním pufrům na koncentraci 100 μM, ze které byly připraveny standardy.

3.2.3.2 Příprava standardů H₂O₂ pro kalibrační křivku metody s AR

K fluorimetrickým měřením obvykle stačí menší koncentrace peroxidu, jelikož je tato metoda velmi citlivá – jako detekční limit kvantifikace H₂O₂ pomocí AR uvádí Zhou *et al.* (1997) 5 pmol a výrobce spektrofotometru Synergy HT (BioTek) dokonce 400 fmol H₂O₂ v jedné jamce mikroadestičky. Standardy pro kalibrační křivku tedy byly připraveny ze zásobního 100μM roztoku H₂O₂ v rozsahu 0,1-0,5-0,75-1-2,5-5-10 μM.

3.2.3.3 Příprava reakčního činidla

Reakční činidlo bylo připraveno čerstvé před každým experimentem smícháním 50 μl zásobního roztoku 10mM AR, 100 μl zásobního roztoku HRP o aktivitě 20 U·ml⁻¹ a 4,85 ml zásobního K-fosfátového pufru o pH 7. Celkem tedy bylo připraveno 5 ml reakčního činidla, což teoreticky vystačí na 100 vzorků.

3.2.3.4 Úprava biologických vzorků před měřením

Získané biologické vzorky byly následně smíchány s látkami ovlivňujícími aktivitu Nox/Duox (Tab. 2). Jako kontrola sloužila část biologického Vzorku 2, který byl denaturovaný při 95 °C po dobu 10 min v inkubační lázni Dry Bath. Vzorek použitý při měření byl následně připraven smícháním 150 μl zásobního pufru, 30 μl biologického vzorku a 10 μl 10mM CaCl₂, 1mM NADPH nebo 1mM DPI. Poté byly připravené vzorky inkubovány v třepačce 30 min při 30 °C a 300 RPM.

3.2.3.5 Postup měření

Do jednotlivých jamek 96jamkové černé mikroadestičky bylo podle experimentu nejprve pipetováno 50 μl biologického vzorku, standardu nebo blanku (zásobní pufr). V dalším kroku bylo pipetováno 50 μl reakčního činidla. Poté se takto připravené vzorky nechaly inkubovat 10 min ve tmě při laboratorní teplotě. Pro měření fluorescence byl použit spektrofotometr Synergy HT. V programu GEN5 byla nastavena excitace při 560 nm a emise při 587 nm.

Tab. 2: Přehled vzorků využitých k fluorimetrickému stanovení aktivity Nox (jednotlivé složky vzorku byly přidávány v pořadí zleva doprava).

Provedení	Pufr	Ca ²⁺	NADPH	DPI	Biologický vzorek	Objem biol. vzorku/objem vzorku (μl)
1	+	-	-	-	+	30/180
2	+	+	-	-	+	30/190
3	+	+	+	-	+	30/200
4	+	+	+	+	+	30/210

3.2.4 Histochemická detekce produkce H₂O₂ metodou s DAB

Byla využita metoda s 3,3'-diaminobenzidinem (DAB), který po oxidaci peroxidem vodíku v přítomnosti proteinů obsahujících hemovou skupinu (jako např. peroxidasy) vytváří tmavě hnědě zbarvený precipitát.

3.2.4.1 Příprava zásobních roztoků

K histochemické detekci produkce H₂O₂ pomocí DAB byly připraveny následující roztoky:

- **10x PBS pufr** (pH = 7,4): 10x koncentrovaný; 16,1 g NaCl, 0,4 g KCl, 3,5 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,5 g KH₂PO₄ v 200 ml H₂O; před použitím byl pufr 10x naředěn;
- **0,5 % DAB**: 25,3 mg DAB v 5 ml PBS pufr;
- **DPI**: použit stejný roztok jako pro fluorimetrii (viz kapitola 3.2.3.1);
- **Uracil**: 0,11 mg v 1 ml H₂O;
- **Fixační roztok**: 5% formaldehyd, 5% kys. octová, 70% ethanol ve 100 ml; bylo smícháno 13,51 ml 37% formaldehydu, 6,25 ml 80% kys. octové, 72,92 ml 96% ethanolu a dopněno na objem 100 ml 7,22 ml ddH₂O.

3.2.4.2 Izolace střev včel

Střeva byla izolována z uspaných včel *A. mellifera* tak, že byl nejprve odstřižen zadeček od hrudi (Obr. 10). Poté byla opatrně narušena kutikula zadečku tak, aby bylo možné pinzetou vypreparovat střevo (Obr. 10).



Obr. 10: Rozstřižená včela před izolací střev ze zadečku; 1 – hlava a hrud'; 2 – zadeček; 3 – vypreparované střevo.

3.2.4.3 Příprava vzorků pro histochemickou detekci Duox

Po odebrání byly vzorky střev rozděleny do 5 zkumavek a promyty v PBS pufru. Ke zkumavce K (kontrola) byl přidán 1 ml PBS pufru – sloužila jako negativní kontrola, jelikož se zde nevyvíjelo zbarvení. Vzorky ve zkumavkách 1-4 byly inkubovány s 0,5% roztokem DAB v PBS pufru, případně s přídavkem 20 μ l 1mM uracilu nebo 100 μ l 1mM DPI (Tab. 3) tak, aby byl celkový objem 1 ml. Následně byly vzorky inkubovány 19 h při pokojové teplotě. Po inkubaci byly všechny vzorky promyty v PBS pufru. Poté byly vzorky inkubovány v 1 ml fixačního roztoku a nakonec 2x propláchnuty v 70% ethanolu. Následně byly vzorky střev přeneseny do kapky glycerolu na podložním sklíčku, překryty krycím sklíčkem a pozorovány pod mikroskopem.

Tab. 3: Přehled vzorků pro histochemickou detekci s DAB a látkami ovlivňujícími aktivitu Duox.

Vzorek	DAB v PBS	uracil	DPI
K (kontrola)	-	-	-
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	+	+

3.2.5 Bioinformatické porovnání Nox/Duox octomilek a včel

3.2.5.1 Srovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

Požadované geny pro Nox a Duox octomilek byly nalezeny v databázi Flybase (<http://flybase.org/>, 22. 4. 2021) (Larkin *et al.*, 2021). Jejich FASTA formát (textový formát nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí reprezentovaný jejich jednopísmennými zkratkami) byl vložen do vyhledávače BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) pro nukleotidy na stránce NCBI, kde byl jako hledaný organismus nastavený *A. mellifera* a vyhledávání bylo optimalizované pro jakkoliv podobné sekvence (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, 22. 4. 2021) (Altschul *et al.*, 1990).

Aminokyselinové sekvence Nox a Duox octomilek nalezené na UniProt ve FASTA formátu byly taktéž podrobeny BLASTu – pro porovnání na stránkách NCBI i UniProt (<https://www.uniprot.org/>, 22. 4. 2021) (UniProt, 2019).

3.2.5.2 Teoretické stanovení pI a M_w

Pomocí bioinformatických metod lze také teoreticky stanovit isoelektrický bod proteinů a spočítat jejich molekulovou hmotnost na serveru ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/, 29. 4. 2021) (Wilkins *et al.* 1998; Gasteiger, 2003). Opět byly do vyhledávače zadány FASTA formáty Nox a Duox včel i octomilek.

3.2.5.3 Předpokládaná místa fosforylace

Aminokyselinové sekvence Nox a Duox včel i octomilek byly ve FASTA formátu vloženy do vyhledávače v programu GPS 5.0 („Group-based Prediction System“) (<http://gps.biocuckoo.cn/citation.php>, 29. 4. 2021) (Wang *et al.*, 2020). Pro srovnání byl využit internetový nástroj NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, 29. 4. 2021) (Blom *et al.*, 1999; Blom *et al.*, 2004). Oba tyto nástroje slouží k vyhodnocení nejpravděpodobnějších míst fosforylace na základě jejich primární struktury a známé specificity kinas.

3.2.5.4 Předpokládaná místa N-glykosylace

Aminokyselinové sekvence Nox a Duox včel i octomilek byly vloženy ve formátu FASTA na server NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, 25. 5. 2021), který pomocí umělých neuronových sítí předpovídá teoretická místa N-glykosylace proteinů (Gupta a Brunak, 2001).

3.2.5.5 Předpokládaná 3D struktura

Aminokyselinové sekvence Nox a Duox včel i octomilek byly ve FASTA formátu získaném na UniProt poslány na server iTasser, který provozuje Zhang Lab Michiganské univerzity (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, 22. 4. 2021) (Yang a Zhang, 2015). Program iTasser počítačově modeluje předpokládanou 3D strukturu proteinů do 1500 aminokyselin. Jelikož je Duox octomilek tvořená 1537 aminokyselinami, bylo prvních 37 náležících k společné doméně nutno vynechat.

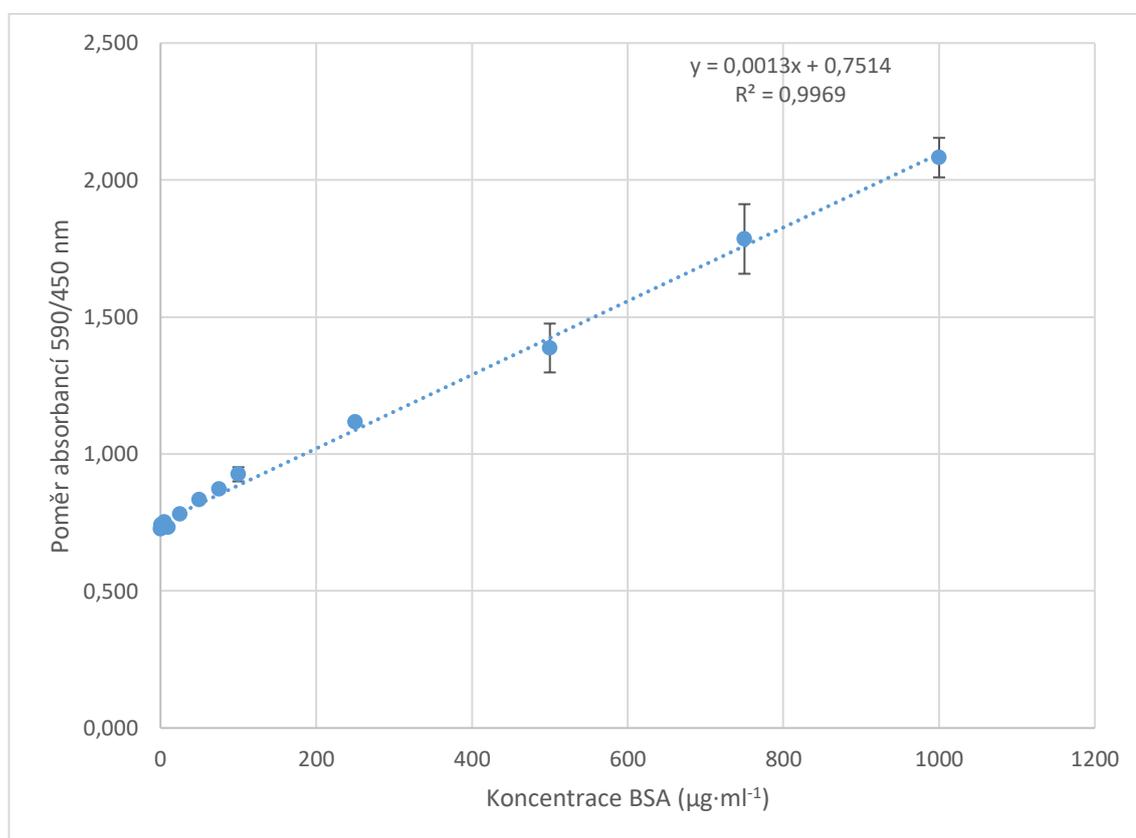
4 Výsledky a diskuze

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo ověřit tvorbu ROS pomocí enzymů z rodiny Nox/Duox ve vzorcích včel. Toho bylo dosaženo pomocí fluorimetrické metody s AR a histochemicky pomocí DAB. Dále byla zpracováno srovnání Nox a Duox octomilek a včel pomocí základních bioinformatických nástrojů.

4.1 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou

4.1.1 Určení kalibrační přímky metody

Z naměřených výsledků závislosti poměru absorbancí 590/450 nm na koncentraci standardu BSA byla určena lineární regresí kalibrační přímka (Obr. 11). Do grafu byl zanesen pouze průměr naměřených hodnot pro technické replikáty standardů z důvodu přehlednosti.



Obr. 11: Kalibrační přímka stanovení obsahu proteinů Bradfordovou metodou. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku (SD) technických triplikátů měření.

4.1.2 Stanovení celkového obsahu proteinů biologických vzorků

V nezředěných vzorcích byl naměřený poměr absorbance mimo kalibrační křivku, všechny biologické vzorky byly proto před měřením 50x zředěny. Naměřené hodnoty biologických vzorků byly nejprve zprůměrovány a z nich pak byla vypočtena koncentrace proteinů. Výsledky pak byly přepočteny na reálné hodnoty (Tab. 4).

4.2 Stanovení obsahu H₂O₂ fluorimetrickou metodou s AR

Nejprve bylo testováno nastavení citlivosti fotonásobiče destičkového fluorimetru pro detekci fluorescence produktu. Při prvním měření standardů byla nastavena automaticky podle standardu s nejvyšší koncentrací H₂O₂ (10 μM) na S = 76. Tato hodnota se však při měření biologických vzorků ukázala jako příliš vysoká (fluorescence byla vyšší než je detekční limit přístroje). Citlivost tedy byla postupným testováním nastavena na S = 60. Tato hodnota byla použita při měření všech uváděných výsledků.

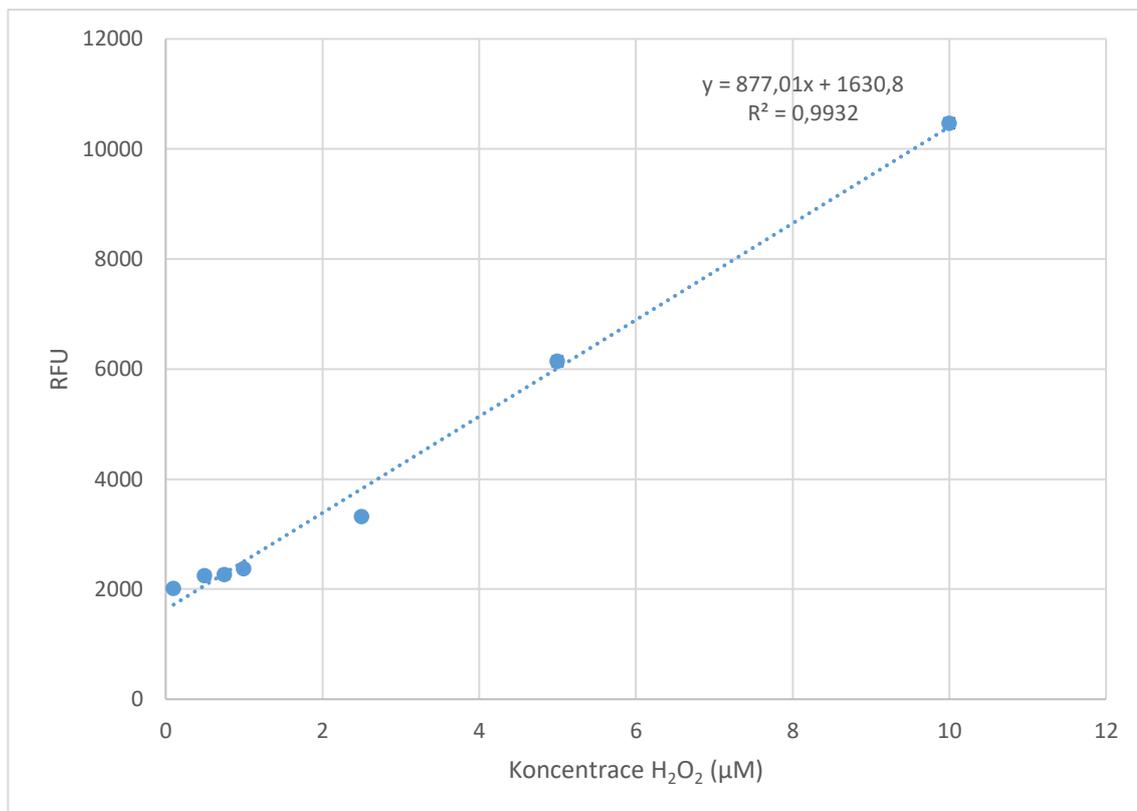
4.2.1 Určení kalibrační přímky

Z naměřených výsledků závislosti RFU na koncentraci H₂O₂ byla určena lineární regresní kalibrační přímka (Obr. 12). Do grafu byl zanesen pouze průměr naměřených hodnot z důvodu přehlednosti. Pro určení rovnice kalibrační přímky byla pro standard H₂O₂ o koncentraci 0,1 μM vynechána vychýlená hodnota RFU 2915 z naměřených hodnot: 2915, 2036 a 1991. Pravděpodobně byla způsobena chybou při pipetování.

Tab. 4: Výsledky spektrofotometrie biologických vzorků a vypočtená koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Odchylky reprezentují SD.

Vzorek	Průměrný poměr A 590/450	Koncentrace proteinů v 50x zředěném vzorku (μg·ml ⁻¹)	Koncentrace proteinů v nezředěném vzorku (μg·ml ⁻¹)
1	1,169 ± 0,032	321	16062
2	1,099 ± 0,003	267	13369
3	1,285 ± 0,058	410	20523
4	1,573 ± 0,109	632	31600
5	1,347* ± 0,054	458	22908

*Byla vynechána vychýlená hodnota 0,815 z naměřených hodnot: 0,815; 1,293; 1,401. Pravděpodobně byla způsobena chybou při pipetování.



Obr. 12: Kalibrační přímka stanovení obsahu H₂O₂ fluorimetrickou metodou s AR. Chybové úsečky reprezentují SD technických triplikátů měření.

Poměrně vysokou fluorescenci vykazoval také blank, jehož průměrná RFU byla 1959, což je hodnota blízká nejnižší koncentraci standardu 0,1 µM. Po přepočtení z rovnice kalibrační přímky vychází, že blank obsahuje H₂O₂ o koncentraci 0,37 µM. Pravděpodobným důvodem vysoké fluorescence blanku byla fotooxidace AR působením světla nebo excitačního záření ve fluorimetru. Pro další výsledky tedy byla koncentrace 0,1 µM brána jako spodní limit stanovení H₂O₂ pomocí AR na spektrofotometru Synergy HT, ačkoliv se uvádí detekční limit až 400 fmol H₂O₂ v jamce mikrodestičky.

4.2.2 Stanovení aktivity Nox/Duox

Všechny biologické vzorky musely být před měřením zředěny – vzorek 1 byl zředěný 10x, všechny ostatní vzorky byly zředěny 20x. Naměřené hodnoty biologických vzorků byly nejprve zprůměrovány a z nich pak byla vypočtena koncentrace H₂O₂ (Tab. 5-8). Následně byla z hodnot naměřených při Bradfordově metodě a fluorimetrii stanovena míra aktivity Nox/Duox – jako koncentrace vytvořeného H₂O₂ na µg proteinu za jednotku času (Tab. 9).

Tab. 5: Naměřená RFU biologických vzorků (n = 3) a vypočtené koncentrace vyprodukovaného H₂O₂ jednotlivých vzorků inkubovaných v třepačce 30 min při 30 °C a 300 RPM v Provedení 1 – pouze v K-fosfátovém pufru.

Vzorek	Průměrná RFU	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v zředěném vzorku	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v nezředěném vzorku
Denaturace	651 ± 9	-	-
1	3037 ± 187	1,60	16,03
2	3155 ± 125	1,74	34,76
3	9560 ± 199	9,04	180,83
4	5032 ± 227	3,88	77,56
5	4209 ± 522*	2,94	58,80

*Bylo počítáno s naměřenými hodnotami: 3471, 4585 a 4571. Vychýlená hodnota 3471 byla započítána do průměru, ale v případě možnosti dalšího měření by bylo lepší experiment zopakovat.

Tab. 6: Naměřená RFU biologických vzorků (n = 3) a vypočtené koncentrace vyprodukovaného H₂O₂ jednotlivých vzorků inkubovaných v třepačce 30 min při 30 °C a 300 RPM v Provedení 2 – K-fosfátovém pufru s Ca²⁺.

Vzorek	Průměrná RFU	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v zředěném vzorku	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v nezředěném vzorku
Denaturace	642 ± 13	-	-
1	2836 ± 130	1,37	13,74
2	3487 ± 72	2,12	42,33
3	8694 ± 177	8,05	161,08
4	4589 ± 27	3,37	67,46
5	4159 ± 70	2,88	57,66

Tab. 7: Naměřená RFU biologických vzorků (n = 3) a vypočtené koncentrace vyprodukovaného H₂O₂ jednotlivých vzorků inkubovaných v třepačce 30 min při 30 °C a 300 RPM v Provedení 3 – K-fosfátovém pufru s Ca²⁺ a NADPH.

Vzorek	Průměrná RFU	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v zředěném vzorku	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v nezředěném vzorku
Denaturace	655 ± 17	-	-
1	3010 ± 172	1,57	15,73
2	4381 ± 95	3,14	62,72
3	9011 ± 97	8,42	168,31
4	4673 ± 165	3,47	69,38
5	4008 ± 159	2,71	54,21

Tab. 8: Naměřená RFU biologických vzorků inkubovaných v třepačce 30 min při 30 °C a 300 RPM v Provedení 4 – K-fosfátovém pufru s Ca²⁺, NADPH a DPI.

Vzorek	Průměrná RFU	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v zředěném vzorku	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM) v nezředěném vzorku
Denaturace	591 ± 9	-	-
1	3022 ± 181	1,59	15,86
2	3032 ± 45	1,60	31,95
3	8281 ± 90	7,58	151,66
4	4469 ± 120	3,24	64,72
5	3831 ± 298	2,51	50,18

Tab. 9: Vypočtená aktivita Nox/Duox (koncentrace vyprodukovaného H₂O₂/μg proteinu jednotlivých vzorků po 30min inkubaci) v jednotlivých Provedeních 1-4.

Vzorek	Provedení 1 - μM H ₂ O ₂ /μg proteinu	Provedení 2 - μM H ₂ O ₂ /μg proteinu	Provedení 3 - μM H ₂ O ₂ /μg proteinu	Provedení 4 - μM H ₂ O ₂ /μg proteinu
Denaturace	-	-	-	-
1. Kontrola (orální)	0,12	0,11	0,13	0,14
2. <i>P. larvae</i>	0,33	0,40	0,63	0,33
3. <i>A. apis</i>	1,06	0,99	1,09	1,03
4. Kontrola (injekční)	0,30	0,27	0,29	0,29
5. <i>E. coli</i> + <i>P. larvae</i>	0,31	0,32	0,32	0,31

Výsledky ukazují, že tvorba H₂O₂ je závislá na enzymech – kontrola s denaturovanými proteiny vykazovala pouze minimální fluorescenci a neobsahovala tedy vyprodukovaný H₂O₂. Zajímavé ovšem je, že RFU kontroly bylo o mnoho menší než RFU blanku, což může být vysvětleno přítomností zhašečů (látek schopných absorbovat energii z fluoroforu).

Při Provedení 1, které neobsahovalo žádné látky ovlivňující aktivitu Nox/Duox je z výsledků Vzorků 1-3 patrné, že orálně podávané patogeny zvyšují aktivitu Nox/Duox. Vzorek 2 byl orálně infikován *P. larvae*, která by jakožto G⁺ bakterie neměla signifikantně zvýšit aktivitu Nox/Duox a měla by být eliminována především pomocí AMP. Imunita je však komplexní systém, do kterého je zapojeno mnoho faktorů. Z hlediska výsledků byl největším překvapením Vzorek 3, který byl orálně infikován *A. apis*, houbovým včelím patogenem. Oproti Vzorku 1 v něm byla tvorba H₂O₂ na μg proteinu zvýšena 9x. Jako vysvětlení se nabízí vyšší infekčnost oproti *P. larvae*, který pro dospělé včely není vůbec infekční (je zde použit jako modelový zástupce G⁺ patogenů). Dalším vysvětlením může být, že *A. apis* uvolňuje uracil, který funguje jako elicitor Duox. Vzorky 4 a 5 bohužel s prvními třemi nelze srovnávat, jelikož byly inokulovány patogeny injekčně do hemolymfy (ke zkoumání aktivity hemocytů), byly jinak staré a neobsahovaly zadeček. V tom je u hmyzu uložena trávicí soustava, ve které se tvoří část ROS pomocí Nox i Duox. Nebylo tak možno ověřit, že uracil uvolněný G⁻ bakterie indukuje aktivitu Duox ve střevech. Dá se však aspoň zhodnotit, do jaké míry ovlivňují patogeny tvorbu ROS v hlavě a hrudi. Ta však byla u obou vzorků (kontrolního i infikovaného) velmi podobná ve všech Provedeních, ovšem vyšší než u kontrolního Vzorku 1. Může to být způsobeno právě aktivovanými hemocyty, ale také pouze menším stářím vzorků nebo z důvodu delšího vystavení patogenům. Pro ověření ovlivnění Nox/Duox patogeny jsou tedy vhodné především Vzorky 1-3.

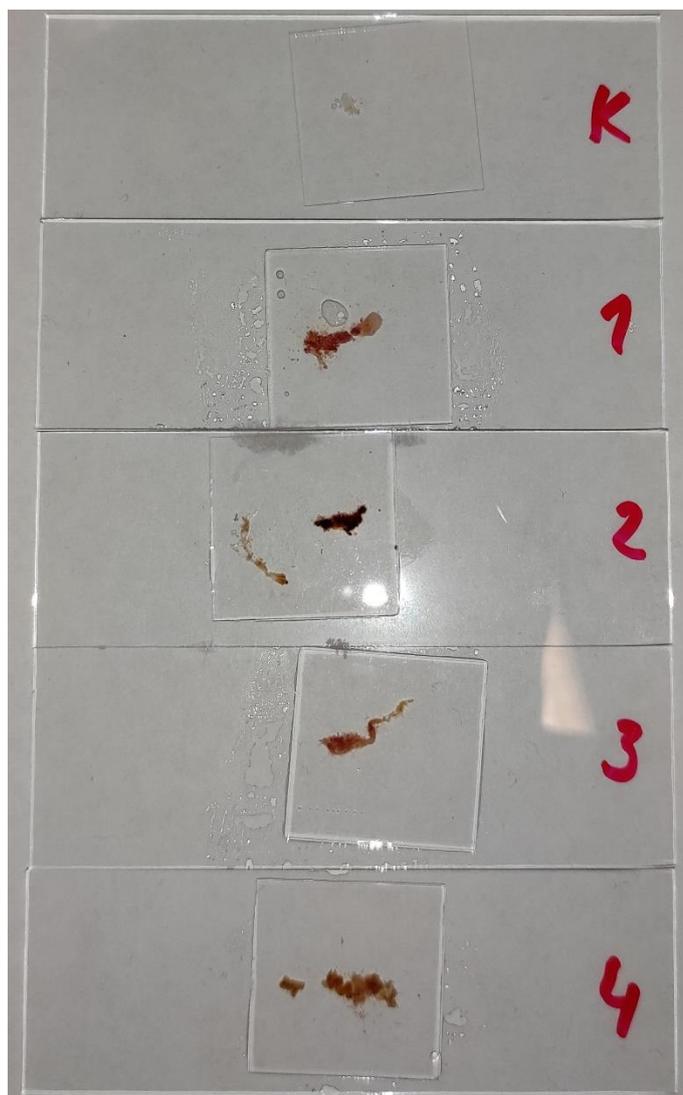
Při Provedení 2 – přidání Ca^{2+} byly výsledky překvapivé. Ačkoliv jsou Ca^{2+} esenciální k funkci Duox, zvýšení jejich koncentrace vedlo ke zvýšení koncentrace H_2O_2 na μg proteinu pouze u Vzorku 2. U Vzorku 3 byla dokonce mírně snižená. Dá se tedy předpokládat, že koncentrace Ca^{2+} ve vzorcích byla dostatečná k funkci Nox/Duox a naopak zvýšení jejich koncentrace mohlo vést k indukci antioxidantních systémů. Tato skutečnost byla objevena jak u živočichů, tak i u rostlin (Ben Amor *et al.*, 2010; Sánchez-Virosta *et al.*, 2019).

Při Provedení 3 – přidání Ca^{2+} a NADPH, které funguje jako substrát Nox/Duox, došlo ke znatelnému zvýšení aktivity Nox/Duox opět pouze u Vzorku 2, kde se koncentrace H_2O_2 na μg proteinu zvýšila 2x oproti Provedení 1.

Při Provedení 4 byl kromě Ca^{2+} a NADPH přidán také inhibitor Nox/Duox DPI. Opět se jeho vliv významně projevil pouze u Vzorku 2, kde koncentrace H_2O_2 na μg proteinu klesla na původní hodnotu zjištěnou při Provedení 1. DPI obecně inhibuje všechny flavoenzymy – je tedy možné, že se nevázálo pouze na Nox/Duox – k ověření by byla třeba izolace membránové frakce pomocí ultracentrifugace. V experimentu DPI pracuje antagonisticky k NADPH, které jakožto substrát zvyšuje rychlost enzymové katalýzy. V budoucnu by tedy bylo vhodné provést pokus, při kterém by byl vzorek inkubován pouze s DPI.

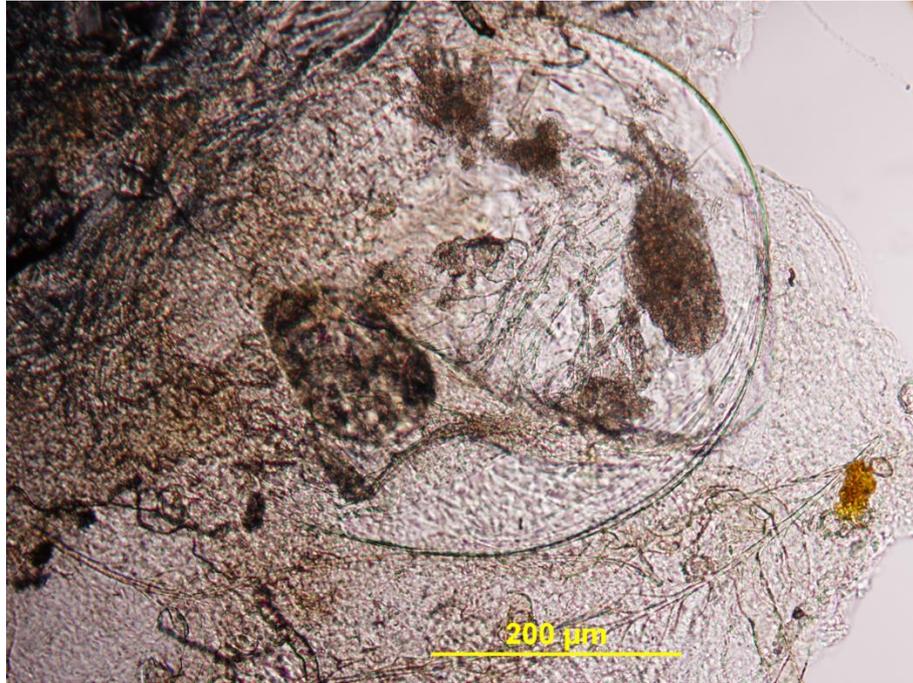
4.3 Histochemická detekce aktivity Duox

Při histochemické detekci aktivity Duox byly vzorky střev včel inkubovány s DAB. Hnědé zbarvení se po reakci H_2O_2 s DAB vyvíjelo ve všech nekontrolních Vzorcích 1-4 (Obr. 13). Nejtmavší zbarvení bylo patrné ve vzorku 2, který obsahoval elicitor Duox – uracil. Naopak ovlivnění zbarvení inhibicí Duox pomocí DPI ve Vzorku 3 tak zřejmě nebylo. Ve vzorku 4 společně s uracilem však DPI zabránilo vytvoření stejně tmavého zbarvení jako ve vzorku 2.

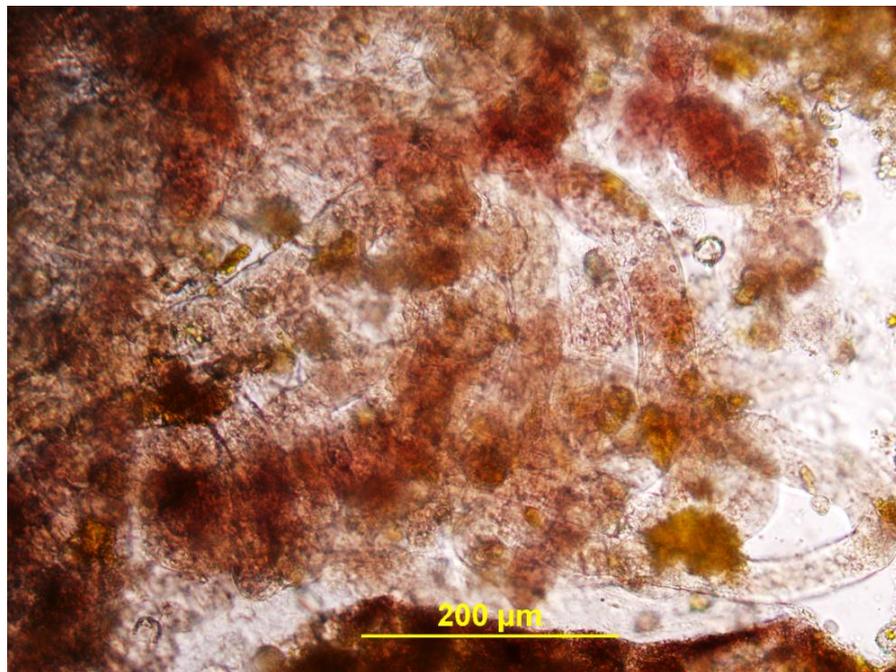


Obr. 13: Vzorčky střev včel po 19h inkubaci s DAB a látkami ovlivňujícími aktivitu Duox připravené k mikroskopii; K – kontrola (bez DAB); 1 – DAB; 2 – DAB + uracil; 3 – DAB + DPI; 4 – DAB + uracil + DPI.

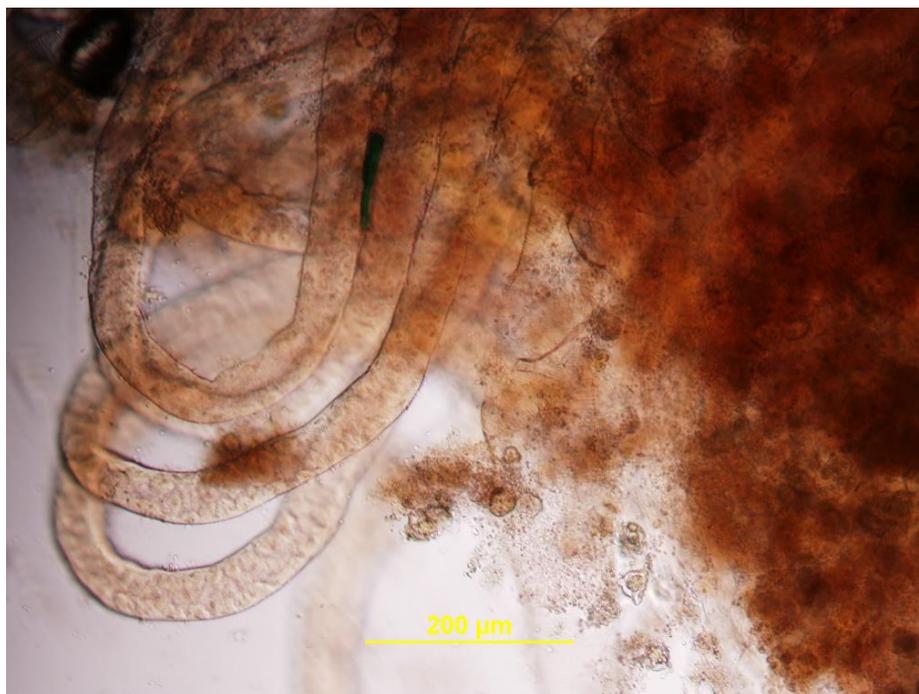
Všechny vzorky střev včel inkubované s DAB byly poté mikroskopicky pozorovány a snímány (Obr. 14-19). Tento experiment sloužil pouze jako ověření tvorby H_2O_2 ve střevech pomocí metody s DAB, a také k ověření funkce uracilu jako elicitoru Duox a DPI jako inhibitoru Nox/Duox.



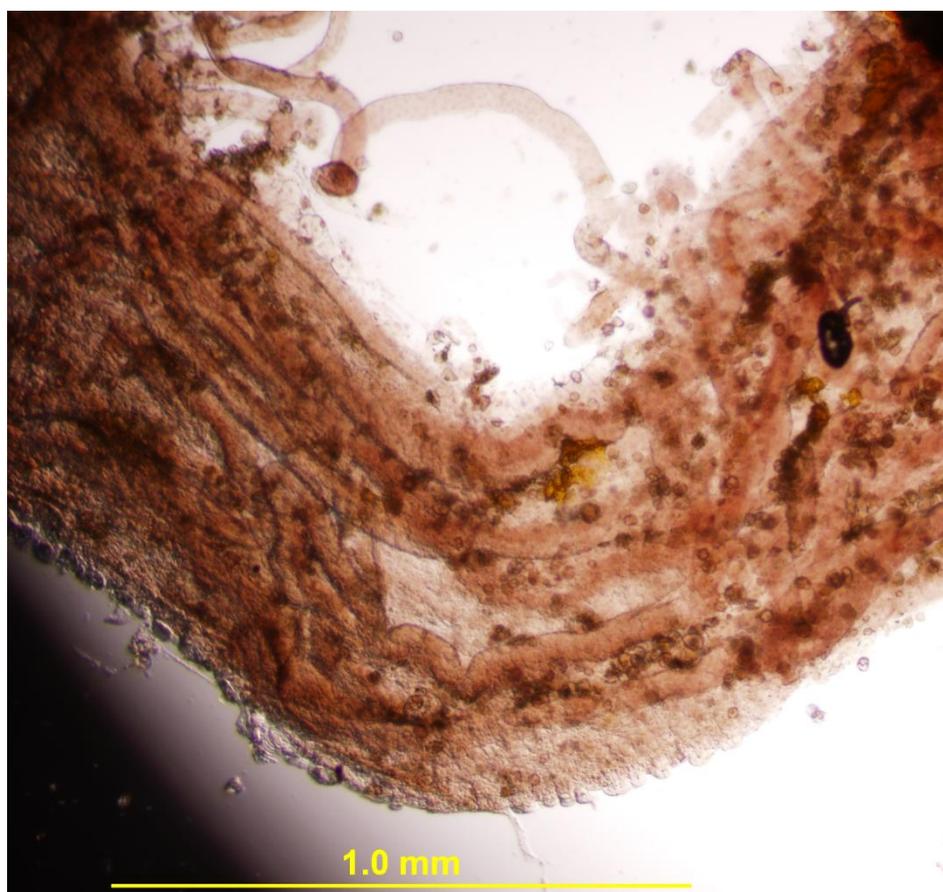
Obr. 14: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h pouze v PBS pufru (negativní kontrola); zvětšení: 10x10; měřítko: 200 μm.



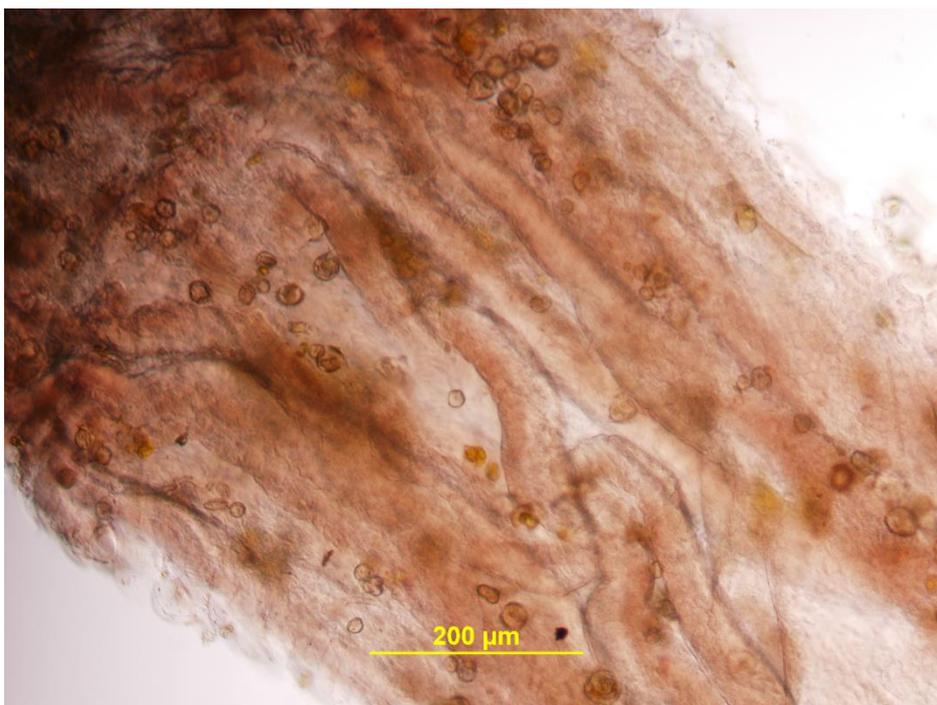
Obr. 15: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h s DAB (Vzorek 1); zvětšení: 10x10; měřítko: 200 μm.



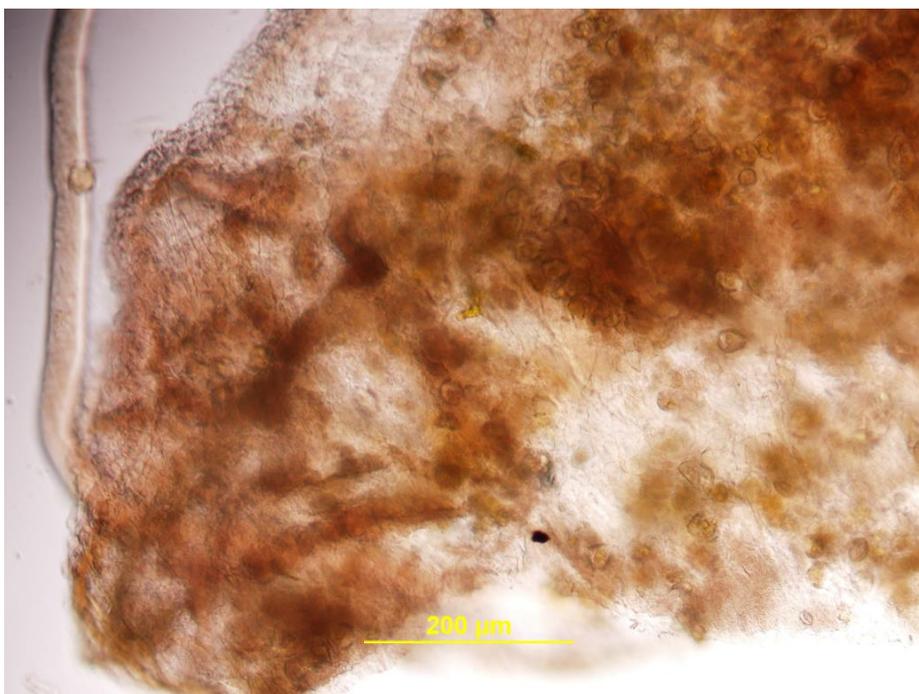
Obr. 16: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h s DAB a uracilem (Vzorek 2); zvětšení: 10x10; měřítko: 200 μm .



Obr. 17: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h s DAB a DPI (Vzorek 3); zvětšení: 4x10; měřítko: 1 mm.



Obr. 18: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h s DAB a DPI (Vzorek 3); zvětšení: 10x10; měřítko: 200 μm .



Obr. 19: Mikroskopický snímek střeva včely inkubovaného 19 h s DAB, uracilem i DPI (Vzorek 4); zvětšení: 10x10; měřítko: 200 μm .

4.4 Bioinformatická analýza

4.4.1 Srovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

Po hledání pomocí BLASTu se výsledky dají seřadit podle několika kategorií. Patří mezi ně: Skóre – vyjadřuje kvalitu srovnání mezi sekvencemi, dále Hodnota E – označuje statistickou významnost srovnání (čím menší Hodnota E, tím signifikantnější shoda) a procentuální Shoda porovnávaných sekvencí. Skóre se počítá pomocí logaritmů pravděpodobnosti přiřazení nukleotidů nebo aminokyselin. Dále se dá dělit na Maximální – hodnota fragmentu s nejvyšší shodou, a Totální – hodnota celé sekvence. Při analýze vypočítaných homologních sekvencí by měly být upřednostňovány výsledky označené jako tzv. TPA („Third Party Annotation“) – shody přiřazené při výzkumu – nad shodami přiřazenými algoritmem označenými „Predicted“. Pod označením Shoda se označuje stejný nukleotid nebo aminokyselina. Pozitiva označují funkčně podobné aminokyseliny (např. threonin a serin).

Databáze na UniProt a NCBI nabízí každá jiné informace o hledané sekvenci. BLAST NCBI má však výhodu hledání homologních nukleotidových sekvencí (Tab. 10 a 12). Dalšími výhodami jsou především možnost hledání přímo zvoleného organismu a v neposlední řadě označení TPA. Obzvláště u málo prozkoumaných proteinů u nemodelových organismů (jako jsou Nox/Duox včel) je výhodné využít srovnání pomocí obou databází (Tab. 11, 13 a 14).

Tab. 10: Nalezený včelí homolog ke genu *Duox* octomilek v databázi NCBI; označení genu na Flybase: CG3131; délka řetězce: 14279 nukleotidů.

Gen	Maximální Skóre	Totální Skóre	Pokrytí (%)	Hodnota E	Shoda (%)	Délka řetězce	Označení
<i>Duox</i>	857	1203	24	0,0	67,07	4449	BR000285.1

Tab. 11: Nalezené včelí homologní proteiny k *Duox* octomilek v databázích UniProt a NCBI; označení hledaného proteinu na UniProt: Q9VQH2; délka řetězce: 1537.

Databáze	Označení proteinu	Shoda (%)	Pozitiva (%)	Pokrytí (%)	Délka řetězce
UniProt	A0A7M7L1F4	76,5	86,9	-	1314
	A0A7M7MG50	75,7	86,8	-	1466
	A0A7M7L500	75,2	86,3	-	1510
	A0A7M7KZ50	75,2	86,3	-	1618
NCBI	Duox Isoforma X4 (XP_026295249.1)	76,5	-	85	1314
	TPA: Duox (FAA00352.1)	75,8	-	95	1482
	Duox Isoforma X3 (XP_006560555.2)	75,8	-	94	1466
	Duox Isoforma X2 (XP_026295242.1)	75,5	-	96	1510
	Duox Isoforma X1 (XP_026295241.1)	75,5	-	96	1618

Tab. 12: Nalezený včelí homolog ke genu *Nox* octomilek v databázi NCBI; označení genu na Flybase: CG34399; délka řetězce: 9217 nukleotidů.

Gen	Maximální Skóre	Totální Skóre	Pokrytí (%)	Hodnota E	Shoda (%)	Délka řetězce	Označení
<i>Nox</i>	137	602	10	$8 \cdot 10^{-30}$	74,5	2199	BR000281.1

Tab. 13: Nalezené včelí homologní proteiny k isoformě B *Nox* octomilek v databázích UniProt a NCBI; označení hledaného proteinu na UniProt: A0A0B4LFI7; délka řetězce: 1282.

Databáze	Označení proteinu	Shoda (%)	Pozitiva (%)	Pokrytí (%)	Délka řetězce
UniProt	A0A7M7IIF0	58,2	72,2	-	1033
	A0A7M7IY5	56,7	71,2	-	1084
NCBI	TPA: NADPH-oxidasa (FAA00348.1)	65,3	-	54	732
	Nox5 isoforma X2 (XP_016771540.2)	58,2	-	82	1033
	Nox5 isoforma X1 (XP_016771539.2)	56,7	-	86	1084

Tab. 14: Nalezené včelí homologní proteiny k isoformě C *Nox* octomilek v databázích UniProt a NCBI; označení hledaného proteinu na UniProt: A8DWJ8; délka řetězce: 1340.

Databáze	Označení proteinu	Shoda (%)	Pozitiva (%)	Pokrytí (%)	Délka řetězce
UniProt	A0A7M7IIF0	56,1	70,2	-	1033
	A0A7M7IY5	54,7	69,3	-	1084
NCBI	TPA: NADPH-oxidasa (FAA00348.1)	65,3	-	52	732
	Nox5 isoforma X2 (XP_016771540.2)	56,2	-	83	1033
	Nox5 isoforma X1 (XP_016771539.2)	54,9	-	87	1084

4.4.2 Teoretické stanovení pI a M_w

Při stanovování isoelektrického bodu a molekulové hmotnosti *Nox*/*Duox* včel a octomilek na serveru ExPASy byla využita průměrná izotopová hmotnost. Hodnota isoelektrického bodu je u všech srovnávaných *Nox*/*Duox* velmi podobná – pohybuje se v rozmezí pH 8,76-9,00 (Tab. 15). Molekulové hodnoty *Duox* octomilek i včel jsou taktéž velmi podobné, stejně jako isoformy *Nox* octomilek (Tab. 15). Jedinou výjimku tvoří *Nox* včel, která je oproti homologním enzymům octomilek téměř poloviční.

Tab. 15: Srovnání pI a M_w *Nox* a *Duox* octomilek a včel pomocí serveru ExPASy.

Organismus	Enzym	pI	M_w (Da)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Duox</i>	8,77	177690
	<i>Nox</i> isoforma B	8,76	145777
	<i>Nox</i> isoforma C	8,92	151571
<i>A. mellifera</i>	<i>Duox</i>	8,78	171279
	<i>Nox</i>	9,00	85695

4.4.3 Predikce fosforylačních míst Nox/Duox

Bioinformatické programy stanovují místa fosforylace především podle primární struktury proteinů a specifické fosforylace známých kinas. Ve výsledcích tedy bylo velké množství nalezených potenciálně fosforylovatelných oblastí. Bylo tedy nutné srovnat nalezené sekvence se známými oblastmi. Bohužel zatím neexistuje literatura zabývající se fosforylací Nox/Duox hmyzu. Na UniProt je však údaj o fosforylaci Duox octomilek na serinu 826 a tyrosinu 1105. Tato informace byla testována pomocí nástrojů NetPhos 3.1 a GPS 5.0 a (Tab. 16; Obr. 20).

Bioinformaticky se podařilo ověřit serin 826 jako předpokládané fosforylační místo Duox octomilky, avšak ani jeden z použitých nástrojů nevyhodnotil tyrosin 1105 jako pravděpodobné místo fosforylace. K potvrzení míst fosforylace bude třeba využít experimentální biochemické metody.

Tab. 16: Výsledky předpokládaných fosforylací na aminokyselinách 826 a 1105 Duox octomilek podle serveru NetPhos 3.1.

Pořadí v sekvenci	Aminokyselina	Kontext	Kinasa	Skóre	Predikce fosforylace
826	S	RRRRSDASS	nespecifikovaná	0,997	ANO
			PKA	0,890	ANO
			PKG	0,610	ANO
			RSK	0,599	ANO
1105	Y	PIQQYIPLD	INSR	0,436	-
			EGFR	0,350	-
			SRC	0,310	-
			nespecifikovaná	0,046	-

Predicted sites					
Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
13	S	AGC	APHQRAESKINRVPRP	2,677	1,925
114	T	AGC	AGANRPSTRRLSRLF	2,034	1,925
118	S	AGC	RPSTRRLSRLFMRGK	3,525	1,925
826	S	AGC	PGERRRRSDASSDGE	3,535	1,925
1510	T	AGC	SCGFRPLTKSVMSAC	2,31	1,925
1515	S	AGC	PLTKSVMSACDEVNK	1,946	1,925

Obr. 20: Výsledky předpokládaných míst fosforylace Duox octomilek podle programu GPS 5.0.

4.4.4 Predikce N-glykosylačních míst Nox/Duox

Stejně jako u fosforylace zatím neexistuje žádná literatura zabývající se glykosylací Nox/Duox octomilek a včel. Opět se ale na UniProt nachází údaj o glykosylaci Duox octomilek – nachází se na asparaginech 133, 233, 577 a 606. Tato informace tedy byla ověřena pomocí serveru NetNGlyc. Jako úspěšné byly brány veškeré výsledky s potenciálem glykosylace překonávajícím práh 0,5 (označené +).

Server NetNGlyc predikoval stejná místa N-glykosylace, jako jsou ta uvedená na UniProt (Tab. 17). Byly tedy ověřeny i další Nox a Duox octomilek a včel (Tab. 18-21). Označení PRO-X1 znamená, že se za potenciálně glykosylovaným asparaginem nachází prolin, a je tedy vysoce nepravděpodobné, že zde bude ke glykosylaci reálně docházet. K potvrzení míst N-glykosylace ale bude třeba, stejně jako u fosforylace, využít experimentální biochemické metody.

Tab. 17: Předpokládaná místa N-glykosylace Duox octomilek pomocí serveru NetNGlyc.

Pořadí v sekvenci	Kontext	Potenciál	Rozhodnutí	Predikce N-glykosylace
133	NRTA	0,5597	6/9	+
233	NGTL	0,7450	9/9	++
577	NSTD	0,6124	8/9	+
606	NATE	0,6328	9/9	++
1521	NKTR	0,4681	5/9	-

Tab. 18: Předpokládaná místa N-glykosylace Duox včel pomocí serveru NetNGlyc.

Pořadí v sekvenci	Kontext	Potenciál	Rozhodnutí	Predikce N-glykosylace
73	NRTA	0,5536	5/9	+
173	NGSL	0,5836	7/9	+
247	NPTM	0,6301	8/9	+ (PRO-X1)
353	NSTI	0,6651	9/9	++
436	NPSL	0,5897	8/9	+ (PRO-X1)
518	NATG	0,5702	6/9	+
547	NSTM	0,5113	5/9	+

Tab. 19: Předpokládaná místa N-glykosylace isoformy B Nox octomilek pomocí serveru NetNGlyc.

Pořadí v sekvenci	Kontext	Potenciál	Rozhodnutí	Predikce N-glykosylace
173	NCSS	0,6179	9/9	++
477	NLSI	0,7322	9/9	++
619	NFSI	0,5708	9/9	++
657	NPTG	0,6866	9/9	++ (PRO-X1)
990	NNSV	0,4152	6/9	-
1002	NKSL	0,5434	6/9	+

Tab. 20: Předpokládaná místa N-glykosylace isoformy C Nox octomilek pomocí serveru NetNGlyc.

Pořadí v sekvenci	Kontext	Potenciál	Rozhodnutí	Predikce N-glykosylace
173	NCSS	0,6174	9/9	++
477	NLSI	0,7336	9/9	++
619	NFSI	0,5732	9/9	++
657	NPTG	0,6883	9/9	++ (PRO-X1)
990	NNSV	0,4193	6/9	-
1002	NKSL	0,5482	6/9	+
1108	NRTG	0,4031	7/9	-

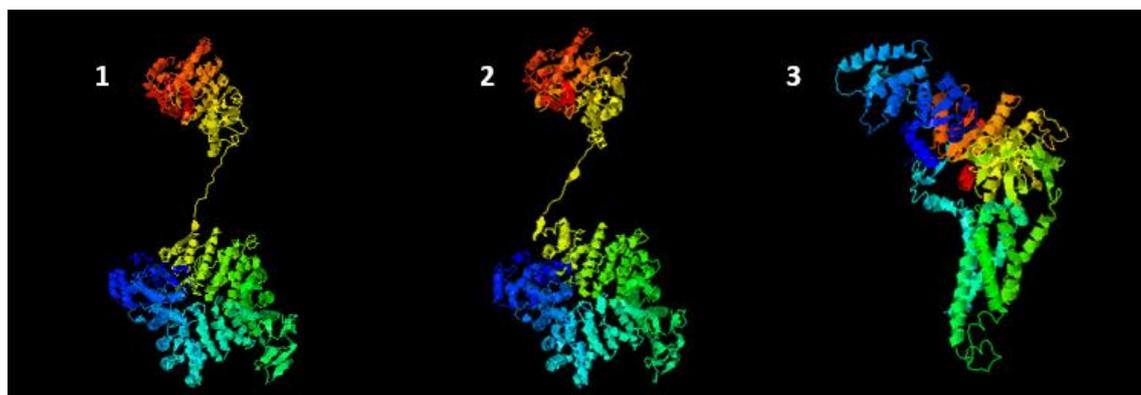
Tab. 21: Předpokládaná místa N-glykosylace Nox včel pomocí serveru NetNGlyc.

Pořadí v sekvenci	Kontext	Potenciál	Rozhodnutí	Predikce N-glykosylace
157	NLSI	0,7129	9/9	++
212	NVSL	0,7738	9/9	+++
243	NCSF	0,6607	9/9	++
313	NYTL	0,6512	9/9	++
336	NPTG	0,7414	9/9	++ (PRO-X1)
514	NVSE	0,5476	6/9	+

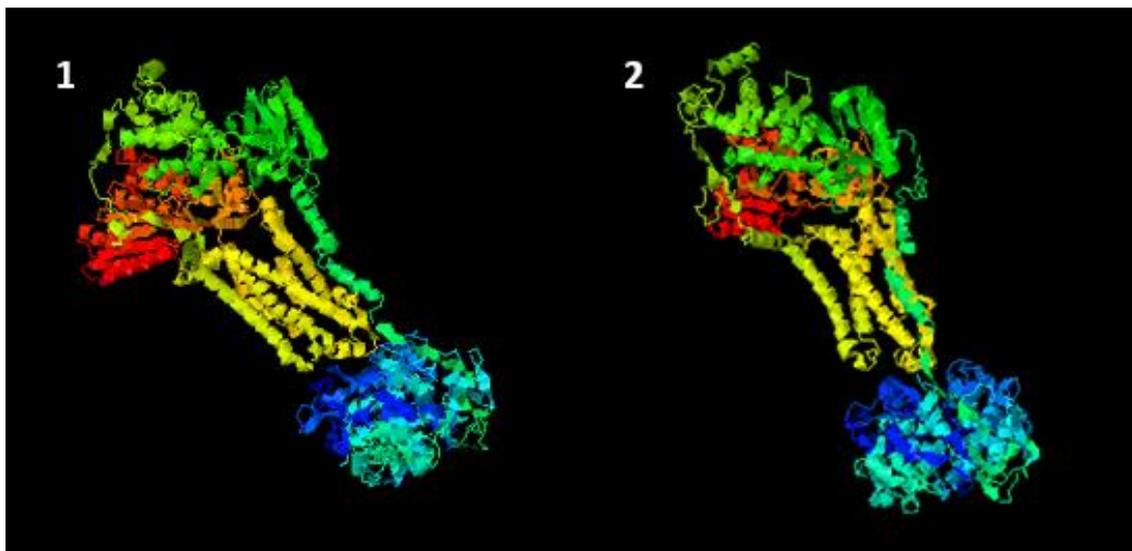
4.4.5 Predikce 3D struktury Nox/Duox

Pomocí internetového nástroje iTasser byly z FASTA formátu vytvořeny 3D modely enzymů Nox/Duox octomilek i včel. Byly použity pouze modely označené jako nejpravděpodobněji vystihující reálnou strukturu proteinů. Nox octomilek má 2 isoformy B a C, jejichž struktura je téměř identická (Obr. 21). Naopak Nox včel má strukturu odlišnou – je také tvořen polovičním počtem aminokyselin (viz kapitola 4.4.1) (Obr. 21).

Naopak 3D struktury enzymů Duox octomilek a včel jsou vzhledově téměř identické (Obr. 22).



Obr. 21: Předpokládané 3D struktury enzymů Nox; 1 – isoforma B octomilek; 2 – isoforma C octomilek; 3 – včel. Vytvořeno serverem iTasser.



Obr. 22: Předpokládané 3D struktury enzymů Duox: 1 – octomylek; 2 – včel. Vytvořeno serverem iTasser.

5 Závěr

Byla testována metoda fluorimetrické analýzy aktivity Duox s využitím činidla AR s těmito závěry:

- Teplotní citlivost aktivity Nox/Duox ukazuje na souvislost s proteiny;
- Nejvyšší tvorbu ROS vykazoval vzorek infikovaný houbovým patogenem *A. apis*, ale ovlivnění aktivity Nox/Duox pomocí Ca^{2+} , NADPH a DPI bylo pozorováno u vzorků včel infikovaných G⁺ bakterií *P. larvae*.

Dále byla histochemicky ověřena aktivita Nox/Duox ve střevech včel:

- DAB je využitelné k ověření tvorby ROS ve střevech včel při různých podmínkách;
- Uracil indukuje zvýšenou koncentraci H_2O_2 ve střevech včel, pravděpodobně indukcí Duox, jak bylo prokázáno u jiných druhů hmyzu;
- DPI není schopno zabránit barvení pomocí DAB, ale je schopno eliminovat indukcí Duox uracilem.

Bylo provedeno bioinformatické srovnání Nox a Duox octomilek a včel:

- Duox octomilek i včel jsou homologní enzymy s podobnou velikostí, pI i strukturou;
- Nox octomilek a včel vykazují nižší stupeň podobnosti, hlavně ve velikosti a struktuře.

Další práce by měla být zaměřena na rozšíření fluorimetrických metod stanovení H_2O_2 o metodu s HVA a skopoletinem a jejich srovnání s metodou s AR. Příprava vzorků by měla zahrnovat izolaci membránové frakce pomocí ultracentrifugace. Dále na využití rhodaminové próby R19S k histochemické detekci ROS ve střevech včel. Všechny pokusy by měly být rozšířeny o další druhy včelích patogenních i symbiotických mikroorganismů.

6 Literatura

- ALTSCHUL, Stephen F., Warren GISH, Webb MILLER, Eugene W. MYERS a David J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* [online]. **215**(3), 403-410. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- AMEZIANE-EL-HASSANI, Rabii, Stanislas MORAND, Jean-Luc BOUCHER, et al., 2005. Dual Oxidase-2 Has an Intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(34), 30046-30054. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M500516200.
- AZZOUZ-OLDEN, Farida, Arthur HUNT a Gloria DEGRANDI-HOFFMAN, 2018. Transcriptional response of honey bee (*Apis mellifera*) to differential nutritional status and *Nosema* infection. *BMC Genomics* [online]. **19**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-5007-0.
- BÁNFI, Botond, Gergely MOLNÁR, Andres MATURANA, Klaus STEGER, Balázs HEGEDŰS, Nicolas DEMAUREX a Karl-Heinz KRAUSE, 2001. A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(40), 37594-37601. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M103034200.
- BEDARD, Karen a Karl-Heinz KRAUSE, 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* [online]. **87**(1), 245-313. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- BEN AMOR, Nader, Wided MEGDICHE, Ana JIMÉNEZ, Francisca SEVILLA a Chedly ABDELLY, 2010. The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. **32**(3), 453-461. ISSN 0137-5881. Dostupné z: doi:10.1007/s11738-009-0420-2.
- BERGIN, David, Emer P. REEVES, Julie RENWICK, Frans B. WIJNTJES a Kevin KAVANAGH, 2005. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infection and Immunity* [online]. **73**(7), 4161-4170. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005.
- BLOM, Nikolaj, Steen GAMMELTOFT a Søren BRUNAK, 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* [online]. **294**(5), 1351-1362. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1999.3310.
- BLOM, Nikolaj, Thomas SICHERITZ-PONTÉN, Ramneek GUPTA, Steen GAMMELTOFT a Søren BRUNAK, 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *PROTEOMICS* [online]. **4**(6), 1633-1649. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200300771.
- BRODERICK, Nichole A. a Bruno LEMAITRE, 2014. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes* [online]. **3**(4), 307-321. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.4161/gmic.19896.
- BROWNE, Niall, Michelle HEELAN a Kevin KAVANAGH, 2014. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* [online]. **4**(7), 597-603. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.25906.
- BUCHON, N., N. A. BRODERICK, S. CHAKRABARTI a B. LEMAITRE, 2009. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development* [online]. **23**(19), 2333-2344. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1827009.
- BUCHON, Nicolas, Nichole A. BRODERICK a Bruno LEMAITRE, 2013. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **11**(9), 615-626. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3074.
- CLARK, Rebecca I., Anna SALAZAR, Ryuichi YAMADA, et al., 2015. Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Reports* [online]. **12**(10), 1656-1667. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.08.004.

- CLEMENTE, Jose C., Luke K. URSELL, Laura Wegener PARFREY a Rob KNIGHT, 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* [online]. **148**(6), 1258-1270. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.01.035.
- DIAS, Felipe A., Ana Caroline P. GANDARA, Fernanda G. QUEIROZ-BARROS, Raquel L.L. OLIVEIRA, Marcos H.F. SORGINE, Glória R.C. BRAZ a Pedro L. OLIVEIRA, 2013. Ovarian Dual Oxidase (Duox) Activity Is Essential for Insect Eggshell Hardening and Waterproofing. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(49), 35058-35067. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.522201.
- DUPUY, Corinne, Renée OHAYON, Alexander VALENT, Marie-Sophie NOËL-HUDSON, Danielle DÈME a Alain VIRION, 1999. Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(52), 37265-37269. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.52.37265.
- DUTTA, Devanjali, Adam J. DOBSON, Philip L. HOUTZ, et al., 2015. Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult Drosophila Midgut. *Cell Reports* [online]. **12**(2), 346-358. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.06.009.
- GASTEIGER, E., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* [online]. **31**(13), 3784-3788. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkg563.
- GEISZT, M., J. B. KOPP, P. VARNAI a T. L. LETO, 2000. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **97**(14), 8010-8014. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.130135897.
- GEISZT, Miklós, Kristen LEKSTROM, Jassir WITTA a Thomas L. LETO, 2003a. Proteins Homologous to p47 and p67 Support Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase 1 in Colon Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(22), 20006-20012. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M301289200
- GEISZT, Miklós, Jassir WITTA, Judit BAFF, Kristen LEKSTROM a Thomas L. LETO, 2003b. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *The FASEB Journal* [online]. **17**(11), 1-14. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.02-1104fje
- GEISZT, Miklós a Thomas L. LETO, 2004. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(50), 51715-51718. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R400024200.
- GERSON, Cynthia, Juan SABATER, Mario SCURI, et al., 2000. The Lactoperoxidase System Functions in Bacterial Clearance of Airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. **22**(6), 665-671. ISSN 1044-1549. Dostupné z: doi:10.1165/ajrcmb.22.6.3980.
- GINABREDA, Maria Gloria P, Luciene C CARDOSO, Flavia M NOBREGA, Andrea C F FERREIRA, Manuel Domingos C GONÇALVES, Mário VAISMAN a Denise P CARVALHO, 2008. Negative correlation between thyroperoxidase and dual oxidase H2O2-generating activities in thyroid nodular lesions. *European Journal of Endocrinology* [online]. **158**(2), 223-227. ISSN 0804-4643. Dostupné z: doi:10.1530/EJE-07-0602.
- GRIENDLING, Kathy K. a David G. HARRISON, 1999. Dual Role of Reactive Oxygen Species in Vascular Growth. *Circulation Research* [online]. **85**(6), 562-563. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.85.6.562.
- GROEMPING, Yvonne, Karine LAPOUGE, Stephen J. SMERDON a Katrin RITTINGER, 2003. Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. *Cell* [online]. **113**(3), 343-355. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00314-3.
- GUPTA, Ramneek a Søren BRUNAK, 2001. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: *Biocomputing 2002* [online]. WORLD SCIENTIFIC, 2001-12-21, s. 310-322. ISBN 978-981-02-4777-5. Dostupné z: doi:10.1142/9789812799623_0029.
- HA, Eun-Mi, Kyung-Ah LEE, You Yeong SEO, Sung-Hee KIM, Jae-Hong LIM, Byung-Ha OH, Jaesang KIM a Won-Jae LEE, 2009. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory

- pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature Immunology* [online]. **10**(9), 949-957. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1765.
- CHAKRABORTI, Sajal, Soumitra ROY, Amritlal MANDAL, Animesh CHOWDHURY a Tapati CHAKRABORTI, 2013. Role of PKC- ζ in NADPH oxidase-PKC α -G α axis dependent inhibition of β -adrenergic response by U46619 in pulmonary artery smooth muscle cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **540**(1-2), 133-144. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2013.10.018.
- CHEN, Xiaoqiang, Kyung-Ah LEE, Xintong REN, Jae-Chan RYU, Gyungmi KIM, Ji-Hwan RYU, Won-Jae LEE a Juyoung YOON, 2016. Synthesis of a highly HOCl-selective fluorescent probe and its use for imaging HOCl in cells and organisms. *Nature Protocols* [online]. **11**(7), 1219-1228. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2016.062.
- CHENG, Guangjie, Zehong CAO, Xiangxi XU, Erwin G. Van MEIR a J. David LAMBETH, 2001. Homologs of gp91 phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* [online]. **269**(1-2), 131-140. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(01)00449-8.
- CHMIEL, John A., Brendan A. DAISLEY, Jeremy P. BURTON, Gregor REID a Janet K. JANSSON, 2019. Deleterious Effects of Neonicotinoid Pesticides on *Drosophila melanogaster* Immune Pathways. *MBio* [online]. **10**(5), e01395-19. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01395-19.
- IATSENKO, Igor, Jean-Philippe BOQUETE a Bruno LEMAITRE, 2018. Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens *Drosophila* Lifespan. *Immunity* [online]. **49**(5), 929-942.e5. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.09.017.
- JIANG, Huaqi a Bruce A EDGAR, 2012. Intestinal stem cell function in *Drosophila* and mice. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. **22**(4), 354-360. ISSN 0959437X. Dostupné z: doi:10.1016/j.gde.2012.04.002.
- JONES, Rheinallt M, Liping LUO, Courtney S ARDITA, et al., 2013. Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *The EMBO Journal* [online]. **32**(23), 3017-3028. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.224.
- KAMI, K. Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67phox, Grb2 and Pex13p. *The EMBO Journal* [online]. **21**(16), 4268-4276. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf428.
- KARAKUZU, Ozgur, Melissa CRUZ, Yi LIU a Danielle GARSIN, 2019. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *BIO-PROTOCOL* [online]. **9**(21). ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.3409.
- KARATHANASSIS, Dimitrios, Robert V. STAHELIN, Jerónimo BRAVO, Olga PERISIC, Christine M PACOLD, Wonhwa CHO a Roger L WILLIAMS, 2002. Binding of the PX domain of p47phox to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *The EMBO Journal* [online]. **21**(19), 5057-5068. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf519.
- KAWAHARA, Tsukasa a J David LAMBETH, 2007. Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **7**(1). ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-7-178.
- KIM, You-Sun, Michael J. MORGAN, Swati CHOKSI a Zheng-gang LIU, 2007. TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Molecular Cell* [online]. **26**(5), 675-687. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.04.021.
- LAMBETH, J. David, 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* [online]. **4**(3), 181-189. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1312.
- LAMBETH, J. David a Andrew S. NEISH, 2014. Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. **9**(1), 119-145. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104651.

- LAPOUGE, Karine, Susan J.M SMITH, Philip A WALKER, Steven J GAMBLIN, Stephen J SMERDON a Katrin RITTINGER, 2000. Structure of the TPR Domain of p67phox in Complex with Rac·GTP. *Molecular Cell* [online]. **6**(4), 899-907. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(05)00091-2.
- LARKIN, Aoife, Steven J MARYGOLD, Giulia ANTONAZZO, et al., 2021. FlyBase: updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. *Nucleic Acids Research* [online]. **49**(D1), D899-D907. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa1026.
- LEE, Kyung-Ah, Sung-Hee KIM, Eun-Kyoung KIM, et al., 2013. Bacterial-Derived Uracil as a Modulator of Mucosal Immunity and Gut-Microbe Homeostasis in *Drosophila*. *Cell* [online]. **153**(4), 797-811. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.04.009.
- LI, Hongjie, Yanyan QI a Heinrich JASPER, 2016. Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. *Cell Host & Microbe* [online]. **19**(2), 240-253. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2016.01.008.
- MARTYN, Kendra D., Linda M. FREDERICK, Katharina VON LOEHNEYSSEN, Mary C. DINAUER a Ulla G. KNAUS, 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling* [online]. **18**(1), 69-82. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.023.
- NADA, Masatoshi, Hidenori OHNISHI, Hidehito TOCHIO, et al., 2012. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Molecular Immunology* [online]. **52**(3-4), 108-116. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2012.05.003.
- NAUSEEF, William M., 2004. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **122**(4), 277-291. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-004-0679-8.
- NAUSEEF, William M., 2014. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1840**(2), 757-767. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.040.
- PAITAL, Biswaranjan, 2014. A Modified Fluorimetric Method for Determination of Hydrogen Peroxide Using Homovanillic Acid Oxidation Principle. *BioMed Research International* [online]. **2014**, 1-8. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/342958.
- PARK, Beom Seok a Jie-Oh LEE, 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. **45**(12), e66-e66. ISSN 2092-6413. Dostupné z: doi:10.1038/emm.2013.97.
- PATEL, Parthive H, Julieta A MALDERA a Bruce A EDGAR, 2013. Stimulating cROSstalk between commensal bacteria and intestinal stem cells. *The EMBO Journal* [online]. **32**(23), 3009-3010. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.244.
- RADA, Balázs a Thomas L. LETO, 2008. Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. EGESTEN, A., A. SCHMIDT a H. HERWALD, ed. *Trends in Innate Immunity* [online]. Basel: KARGER, 2008, s. 164-187. Contributions to Microbiology. ISBN 978-3-8055-8548-4. Dostupné z: doi:10.1159/000136357.
- SÁNCHEZ-VIROSTA, Pablo, Silvia ESPÍN, Sandra RUIZ, Janina STAUFFER, Mirella KANERVA, Antonio J. GARCÍA-FERNÁNDEZ a Tapio EEVA, 2019. Effects of calcium supplementation on oxidative status and oxidative damage in great tit nestlings inhabiting a metal-polluted area. *Environmental Research* [online]. **171**, 484-492. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2019.01.047.
- SARFSTEIN, Rive, Yara GORZALCZANY, Ariel MIZRAHI, et al., 2004. Dual Role of Rac in the Assembly of NADPH Oxidase, Tethering to the Membrane and Activation of p67. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(16), 16007-16016. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M312394200.
- SEGAL, AnthonyW, OwenT.G JONES, David WEBSTER a AnthonyC ALLISON, 1978. ABSENCE OF A NEWLY DESCRIBED CYTOCHROME b FROM NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE. *The Lancet* [online]. **312**(8087), 446-449. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(78)91445-9.

- SEGAL, Brahm H., Thomas L. LETO, John I. GALLIN, Harry L. MALECH a Steven M. HOLLAND, 2000. Genetic, Biochemical, and Clinical Features of Chronic Granulomatous Disease. *Medicine* [online]. **79**(3), 170-200. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/00005792-200005000-00004.
- SNELGROVE, Robert J., Lorna EDWARDS, Aaron J. RAE a Tracy HUSSELL, 2006. An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *European Journal of Immunology* [online]. **36**(6), 1364-1373. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.200635977.
- SNELGROVE, Robert, Andrew WILLIAMS, Callum THORPE a Tracy HUSSELL, 2014. Manipulation of immunity to and pathology of respiratory infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [online]. **2**(3), 413-426. ISSN 1478-7210. Dostupné z: doi:10.1586/14787210.2.3.413.
- SUNDARESAN, M., Z.-X. YU, V. J. FERRANS, K. IRANI a T. FINKEL, 1995. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science* [online]. **270**(5234), 296-299. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.270.5234.296.
- UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, 2019. *Nucleic Acids Research* [online]. **47**(D1), D506-D515. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky1049.
- USHIO-FUKAI, Masuko, R. Wayne ALEXANDER, Marjorie AKERS a Kathy K. GRIENGLING, 1998. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **273**(24), 15022-15029. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.24.15022.
- VIGNAIS, P. V., 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. **59**(9), 1428-1459. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-002-8520-9.
- WANG, Chenwei, Haodong XU, Shaofeng LIN, et al., 2020. GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in Proteins. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [online]. **18**(1), 72-80. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/j.gpb.2020.01.001.
- WILKINS, Marc R., Elisabeth GASTEIGER, Amos BAIROCH, Jean-Charles SANCHEZ, Keith L. WILLIAMS, Ron D. APPEL a Denis F. HOCHSTRASSER, 1998. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. LINK, Andrew J. *2-D Proteome Analysis Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, s. 531-552. ISBN 1-59259-584-7. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-584-7:531.
- WILSON, Michael I., David J. GILL, Olga PERISIC, Mark T. QUINN a Roger L. WILLIAMS, 2003. PB1 Domain-Mediated Heterodimerization in NADPH Oxidase and Signaling Complexes of Atypical Protein Kinase C with Par6 and p62. *Molecular Cell* [online]. **12**(1), 39-50. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00246-6.
- YANG, Jianyi a Yang ZHANG, 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* [online]. **43**(W1), W174-W181. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv342.
- ZHOU, Mingjie, Zhenjun DIWU, Nataliya PANCHUK-VOLOSHINA a Richard P. HAUGLAND, 1997. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry* [online]. **253**(2), 162-168. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1997.2391.
- ZOR, Tsaffir a Zvi SELINGER, 1996. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry* [online]. **236**(2), 302-308. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.0171.

7 Seznam použitých zkratek

AIR	autoinhibiční oblast
AMP	antimikrobiální peptidy
AR	AmplexRed
BSA	hovězí sérový albumin
CGD	chronická granulomatosní choroba
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPI	difenyljodonium chlorid
Duox	duální oxidasa
FAD	flavinadenindinukleotid
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HEK	lidské embryonální ledvinové buňky
HRP	křenová peroxidasa
HVA	kyselina homovanilová
IMD	„immune deficiency“
ISC	střevní kmenové buňky
JNK	Jun N-terminální kinasy
LDH	laktátdehydrogenasa
LPO	laktoperoxidasa
MAMP	molekulární vzory asociované s mikroby
MPO	myeloperoxidasa
M_w	molekulová hmotnost
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
NET	neutrofilní extracelulární past
Nox	NADPH-oxidasa
Noxa	Nox-aktivátor
Noxo	Nox-organizer
pI	isoelektrický bod
PMA	phorbol 12-myristát 13-acetát
PRR	oblast bohatá na prolin
RCF	relativní centrifugační síla

RFU	relativní fluorescenční jednotka
ROS	reaktivní formy kyslíku
SH3	Src homologie 3
SOD	superoxid dismutasa