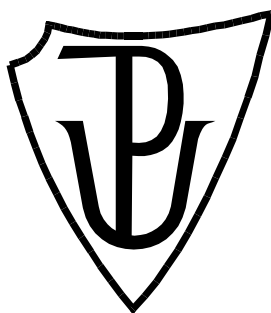


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Epiteliální imunita hmyzu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Barbora Piskláková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala 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. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 14. 5. 2017

Ráda bych tímto poděkovala panu Doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr., vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost při psaní této bakalářské práce a poskytnuté konzultace, které mi pomohly k vypracování teoretické i experimentální části bakalářské práce. Děkuji také katedře biochemie za vstřícný přístup a všestrannou pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Barbora Piskláková
Název práce	Epiteliální imunita hmyzu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Vrstva epitelálních buněk odděluje rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím hmyzu. Střevní epitel hmyzu hraje důležitou roli v mnoha procesech, které zahrnují výživu, imunitní reakce a osmoregulaci. V teoretické části této práce jsou zpracovány dostupné poznatky o složkách a funkci epitelální imunity hmyzu se zaměřením na roli reaktivních forem kyslíku, oxidu dusnatého a antimikrobiálních peptidů, jakožto hlavních signálních a efektorových molekul.

V praktické části byly včelám extrahovány trávicí soustavy, které byly inkubovány s lipopolysacharidem a odebírány v různých časových intervalech. V extraktech těchto trávicích soustav byla následně stanovována specifická aktivita katalasy a superoxidodismutasy a koncentrace NO_2^- , jakožto jediného stabilního konečného produktu autooxidace NO ve vodném roztoku v nepřítomnosti hemoproteinů. Dále byla provedena mikroskopická detekce peroxidu vodíku, superoxidového anionradikálu a oxidu dusnatého bez inkubace a s inkubací s lipopolysacharidem. Peroxid vodíku byl detekován pomocí 0,5% roztoku diaminobenzidinu, superoxidový anionradikál pomocí 2mM roztoku tetrazoliové modři a oxid dusnatý pomocí fluorescenční sondy DAF-FM diacetát. Byla provedena také tricínová elektroforéza extraktů vzorků trávicích soustav a imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů defensinu a abaecinu po přenosu proteinů a peptidů na nitroceluloseovou membránu.

Specifická aktivita katalasy se při inkubaci s lipopolysacharidem v čase zvyšovala, nejvyšší byla po 18 hodinách. Specifická aktivita superoxidodismutasy vykazovala nejvyšší hodnoty po 8 hodinách inkubace s LPS. Nejvyšší koncentrace NO_2^- byla naměřena po 2 hodinách inkubace s LPS a postupně se snižovala. Mikroskopickou detekcí bylo potvrzeno, že při styku s bakteriemi nebo jejich složkami dochází ke zvýšené produkci H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ a NO. Pro vizualizaci proteinů na gelech se lépe osvědčil kit One-step Lumitein Protein Gel Stain. Imunochemická detekce defensinu a abaecinu nebyla úspěšná, pravděpodobně vzhledem k jejich nízké koncentraci v epitelálních buňkách.

Klíčová slova	Hmyz, imunita, oxid dusnatý, reaktivní formy kyslíku, antimikrobiální peptidy, včela medonosná
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Barbora PisklÁková
Title	Insect epithelilal immunity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2018

Abstract

A layer of epithelial cells defines every interface between the inner world of the insect body and the outer world of the external environment. The insect gut epithelium plays an important role in multiple processes, including nutrition, immunity and osmoregulation. The theoretical part of this Bachelor's thesis describes available knowledge about components and functions of insect epithelial immunity focusing on the role of reactive oxygen species, nitric oxide and antimicrobial peptides as main signal and effector molecules.

In the practical part of the Bachelor's thesis honey bee digestive tracts were removed and incubated with lipopolysachyride for different time intervals. In extracts of these digestive tracts catalase and superoxid dismutase specific activities, as well as NO_2^- concentration were determined. Nitrite is the main stable endproduct of the autoxidation of NO in aqueous solution in the absence of hemoproteins. The microscopic detection of hydrogen peroxide, superoxide anion radical and nitric oxide was performed without and with incubation with lipopolysacharide. Hydrogen peroxide was detected using 0,5% solution of diaminobenzidine, superoxide anion radical was detected using 2mM solution of nitro blue tetrazolium chloride and nitric oxide was detected using DAF-FM diacetate fluorescence probe. Tricine electrophoresis of digestive tract extracts and immunochemical detection of defensin and abaecin antimicrobial peptides after protein and peptide transfer to the nitrocellulose membrane were also tested.

Catalase specific activity increased after incubation with lipopolysaccharide over time, the highest activity was observed after 18 hours. Specific activity of superoxide dismutase showed the highest values after 8 hours of incubation with LPS. The highest nitrite concentration was measured after 2 hours of incubation with LPS and gradually decreased. Microscopic detection confirmed that contact with bacteria or its components results in increased production of H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ and NO. The One-step Lumitein Protein Gel Stain kit was proven better for visualizing proteins on

electrophoretic gels. Immunochemical detection of defensin and abacine was not successful, probably due to their low concentration in epithelial cells.

Keywords	Insect, immunity, nitric oxide, reactive oxygen species, antimicrobial peptides
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Současný stav řešené problematiky	13
2.1	Funkce a signální dráhy epiteliální imunity hmyzu.....	13
2.1.1	IMD dráha	13
2.1.1.1	Mechanismus signalizace	13
2.1.2	Toll dráha	14
2.1.2.1	Mechanismus signalizace	14
2.1.3	JAK/STAT dráha	15
2.1.3.1	Mechanismus signalizace	16
2.1.3.2	Signální faktory u různých druhů hmyzu	17
2.2	Reaktivní formy kyslíku.....	17
2.2.1	Tvorba reaktivních forem kyslíku	17
2.2.1.1	Biologické zdroje pro produkci ROS	18
2.2.1.2	Tvorba ROS jako imunitní odezva.....	19
2.2.1.3	NADPH-oxidasa	20
2.2.1.4	Regulace aktivity NADPH-oxidasy	21
2.2.1.5	Regulace exprese NADPH-oxidasy	21
2.2.2	Antioxidační ochrana	21
2.2.2.1	Enzymová antioxidační ochrana	22
2.2.2.2	Neenzymová antioxidační ochrana	24
2.3	Oxid dusnatý.....	25
2.3.1	Oxid dusnatý jako signální molekula.....	26
2.3.2	Oxid dusnatý v imunitních reakcích	26
2.3.3	Synthesa oxidu dusnatého (NOS).....	27
2.3.4	Katabolismus oxidu dusnatého.....	27
2.4	Antimikrobiální peptidy	28
2.4.1	Rozdělení antimikrobiálních peptidů	28
2.4.1.1	Kationické AMP	29
2.4.1.2	Anionické AMP	29
2.4.1.3	Aromatické dipeptidy	29
2.4.1.4	Deriváty peptidů vážící kyslík	29
2.4.2	Antimikrobiální peptidy hmyzu	30
2.4.2.1	Cecropiny.....	30
2.4.2.2	Hmyzí defensiny	31
2.4.2.3	Peptidy bohaté na prolin	31
2.4.2.4	Peptidy bohaté na glycin	31
2.4.2.5	Lysozym	32
2.4.3	Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů.....	32
2.4.3.1	Interakce peptidů s cytoplazmatickou membránou.....	32
2.4.3.2	Schopnost inhibovat nebo rozrušovat intracelulární cíle	34
2.5	Imunitní specifita včely medonosné	35
2.5.1	Sociální imunita	35
2.5.2	Hygienické chování	35
2.5.3	Grooming	36
2.5.4	Sběr antimikrobiálních pryskyřic	36
2.5.5	Sekrece jedu	36
2.6	Trávicí soustava včely medonosné	37
3	Experimentální část.....	38

3.1	Materiál	38
3.1.1	Chemikálie	38
3.1.2	Přístroje a vybavení	40
3.1.3	Biologický materiál.....	40
3.2	Metody	40
3.2.1	Příprava vzorků	40
3.2.2	Stanovení proteinů metodou Bradforda	41
3.2.2.1	Stanovení kalibrační přímky	41
3.2.2.2	Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích	41
3.2.2.3	Použité roztoky	42
3.2.3	Stanovení aktivity katalasy (CAT)	42
3.2.3.1	Příprava vzorků.....	42
3.2.3.2	Měření aktivity CAT	42
3.2.3.3	Použité roztoky	42
3.2.4	Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)	43
3.2.4.1	Příprava vzorků.....	43
3.2.4.2	Měření aktivity SOD	43
3.2.4.3	Použité roztoky	44
3.2.5	Mikroskopická detekce produkce peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu	44
3.2.5.1	Použité roztoky pro detekci peroxidu a superoxidového anionradikálu ..	45
3.2.6	Stanovení NO ₂ ⁻ Griessovou metodou	45
3.2.6.1	Stanovení kalibrační přímky	46
3.2.6.2	Měření koncentrace NO ₂ ⁻ ve vzorcích.....	46
3.2.6.3	Roztoky použité pro stanovení NO ₂ ⁻	46
3.2.7	Mikroskopická detekce NO pomocí DAF-FM DA	46
3.2.7.1	Roztoky použité pro detekci NO.....	47
3.2.8	Tricinová elektroforéza pro analýzu malých peptidů 1-5 kDa.....	47
3.2.8.1	Příprava vzorků.....	48
3.2.8.2	Příprava pufrů a zásobních roztoků.....	48
3.2.8.3	Příprava gelů	49
3.2.8.4	Provedení elektroforézy.....	49
3.2.9	Detekce proteinů na gelech	50
3.2.9.1	Detekce činidlem Coomasie Brilliant Blue	50
3.2.9.2	Detekce Lumitein Protein Gel Stain.....	50
3.2.9.3	Roztoky použité pro detekci proteinů	50
3.2.10	Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů defensinu a abaecinu..	50
3.2.10.1	Použité roztoky pro Western blotting a detekci defensinu a abaecinu	51
3.2.11	Statistické vyhodnocení	51
4	Výsledky a diskuze	52
4.1	Kalibrace metody Bradforda pro výpočet koncentrace proteinů.....	52
4.2	Stanovení koncentrace proteinů v extraktech vzorků trávicí soustavy včel	53
4.3	Stanovení specifické aktivity katalasy	54
4.4	Stanovení specifické aktivity superoxiddismutasy	56
4.5	Mikroskopická detekce peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu.	58
4.6	Kalibrace Griessovy metody pro stanovení koncentrace NO ₂ ⁻ ve vzorcích .	62
4.7	Stanovení koncentrace NO ₂ ⁻ ve vzorcích.....	63
4.8	Mikroskopická detekce NO.....	64
4.9	Tricinová elektroforéza a imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů defensinu a abaecinu	67

5	Závěr	70
6	Literatura	71
7	Seznam použitých zkratek.....	80

Cíle práce:

- Vypracovat literární rešerši shrnující dostupné poznatky o složkách a funkci epiteliální imunity v trávicí soustavě hmyzu, se zaměřením na úlohu reaktivních forem kyslíku (ROS), oxid dusnatého (NO) a antimikrobiální peptidy (AMP) jako signálních a efektorových molekul.
- Zavedení metod detekce vybraných zástupců ROS, NO a AMP ve střevech hmyzu.
- Studium změn vybraných parametrů epiteliální imunity po inkubaci trávicí soustavy dospělých včel s lipopolysacharidem v laboratorních podmínkách.

1 Úvod

Střevní epitel hmyzu hraje důležitou roli v mnoha procesech, které zahrnují výživu, imunitu a osmoregulaci. Vrstva epiteliálních buněk odděluje rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím hmyzu. Střevní epitel disponuje dvěma obecnými funkcemi odpovědi hmyzu na jejich životní prostředí: komunikace od vnějších podnětů do vnitřního prostředí a ochrana vnitřních prostor proti nepříznivým vnějším podmínkám (např. sucho) a biotickým antagonistům (Huang *et al.*, 2015). Ve všech živočišných střevech se nachází velké množství mikroorganismů (Hooper a Gordon, 2001). Tento neustálý kontakt s mikroorganismy by byl velmi nebezpečný, protože střevní organismy produkují mimo jiné prozánětlivé ligandy, známé jako PAMPs (z angličtiny pathogen-associated molecular patterns). Mezi tyto látky patří například lipopolysacharid a peptidoglykan, které jsou schopny vyvolat hostitelskou imunitní odpověď (Denkers, 2010; Honda a Takeda, 2009). Dva druhy molekul jsou zapojeny do střevní obrany octomilky (*Drosophila melanogaster*). Zaprvé, produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO) bylo prokázáno, že tyto molekuly zabíjí patogeny a spouští downstream imunitní odpovědi. Druhou střevní imunitní obranou je produkce antimikrobiálních peptidů (AMPs) (Tzou *et al.*, 2002).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Funkce a signální dráhy epiteliální imunity hmyzu

Imunitní odpověď u octomilky *Drosophila melanogaster* se projevuje v nejméně třech způsobech, první, humorální odpověď generuje AMPs, druhá, buněčná odpověď způsobuje fagocytózu nebo enkapsulaci parazita, třetí, fenoloxidasová reakce vkládá melanin okolo ran a cizích objektů (Hultmark, 2003). Buňky obsahují receptory, které rozeznávají molekulární ligandy. Tyto ligandy jsou produkovány patogeny. Jsou to dobře uchovávané molekulární struktury exprimované různými patogeny (Buchmann, 2014). Po vazbě receptor-ligand signální transdukce zahájí komplexní kaskádu signálních reakcí, které vedou k produkci jedné nebo více efektorových molekul. Signální dráhy hmyzu jsou prostudovány především na octomilce *D. melanogaster* a komárovi *Anopheles gambiae*. Octomilka disponuje dvěma nezávislými signálními drahami, které vedou k aktivaci NF- κ B transkripčního faktoru (IMD a Toll dráha) (Silverman a Maniatis, 2001) a JAK/STAT signální dráhou (Harrison *et al.*, 1998), která je zprostředkována cytokiny (Geng *et al.*, 2016).

2.1.1 IMD dráha

IMD dráha je aktivována gramnegativními bakteriemi. Aktivují ji proteiny rozpoznávající peptidoglykany PGRP-LC (peptidoglycan recognition protein LC) vázané na povrchu buněčné membrány (Silverman *et al.*, 2000). IMD dráha může být také aktivována z cytoplasmy přes spojovací variantu PGRP-LE. (Kaneko *et al.*, 2006).

2.1.1.1 Mechanismus signalizace

Intracelulární signalizace je iniciována přes RHIM (RIP homotypní interakční motiv) -like motivy nalezené na N-konci u obou PGRPs a signál je dále přenášen downstream přes neidentifikovaný adaptorový protein (Kaneko *et al.*, 2006). Signál je následně transdukován ve dvě geneticky odlišné větve, které se opět sbíhají a aktivují transkripční faktor NF- κ B zvaný Relish (Rel) (Costa *et al.*, 2009). Prvním způsobem je signál propagován přes dTAK1 (*Drosophila* transformující růstový faktor aktivovaný kinasou 1) (Vidal *et al.*, 2001; Silverman *et al.*, 2003) do Kenny a Ird5 (homology IKK γ a IKK β u octomilky), které podněcují fosforylaci Rel (Rutschmann *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001). Kenny je složka I κ B kinasového komplexu (IKK), který

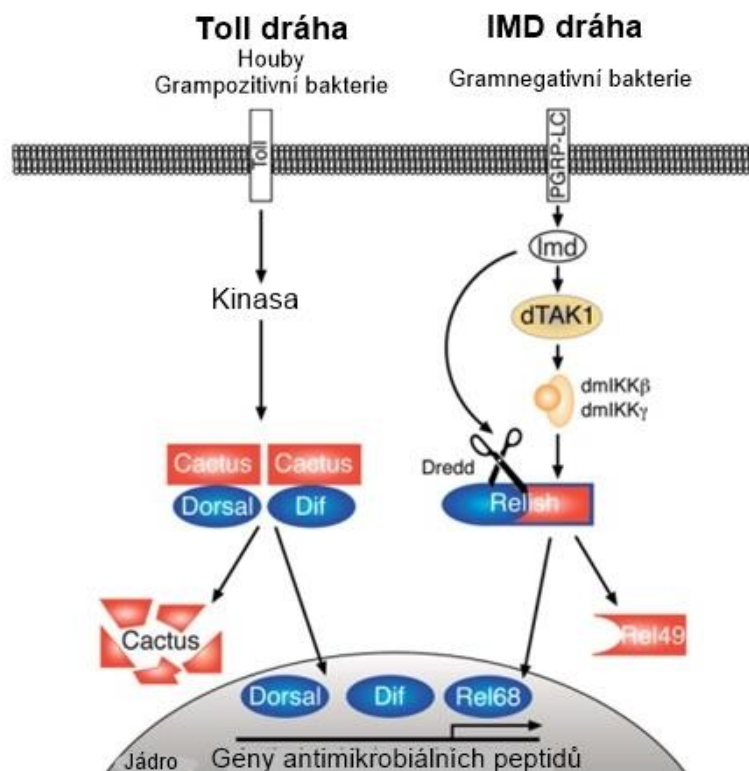
se skládá z IKK β /ird5 a IKK γ /kenny a je rozhodující pro translokaci Relish do jádra a navození exprese genů antimikrobiálních peptidů (AMPs) (Tusco *et al.*, 2017). Druhým způsobem je signál přenášen přes dFADD (Fas-asociovaný protein smrtící domény u *Drosophila*) (Leulier *et al.*, 2002) a vede k aktivaci caspasy-8 homologní Dredd, která je potřebná pro štěpení fosforylovaného Rel na Rel-68 a Rel-49 (Leulier *et al.*, 2000; Stöven *et al.*, 2003; Hultmark, 2003). N – konec REL-68 fragmentu, který obsahuje DNA-vazebné Rel homologní místo, se translokuje do jádra, kde se váže na kB-like elementy v promotorech antimikrobiálních genů a dochází k expresi antimikrobiálních peptidů proti gramnegativním bakteriím. Druhý fragment REL-49 je I κ B-like a zůstává v cytoplasmě překvapivě bez inhibice aktivity fragmentu REL- 68 (Hultmark, 2003).

2.1.2 Toll dráha

Tato dráha byla identifikována jak u savců, tak i u octomilky *Drosophila melanogaster* (Leclerc a Reichhart, 2004), ale také u rostlin a ostatních živočichů (homologní savčí toll-like receptory) (Zaslouff, 2002). Hmyzí Toll a Toll-like receptory (TLR) jsou transmembránové signální proteiny, které hrají důležitou roli v imunitě a vývoji (Evans *et al.*, 2006).

2.1.2.1 Mechanismus signalizace

U octomilky se Toll signální dráha odehrává, když se citokin-like molekula, zvaná Spätzle, naváže na extracelulární doménu transmembránového Toll receptoru (Evans *et al.*, 2006). Aktivace tohoto komplexu vede k degradaci NF- κ B inhibitoru (I κ B), tzv. Kaktusu, a následně dochází k translokaci NF- κ B transkripčního faktoru, zvaný Dorsal (nebo DIF (dorsal-related immunity factor)), do jádra (Royet *et al.*, 2005). V nestimulovaných buňkách jsou Dorsal a DIF uchovány v cytoplasmě, kde interagují s I κ B proteinem Kaktus, který je homologní se savčím I κ Ba proteinem. Stimulace Toll membránového receptoru houbami a grampozitivními bakteriemi indukuje fosforylaci N-konce Kaktusu neznámou kinasou, dochází k ubikvitaci a spouští se degradace Kaktusu v proteasomu (Hultmark, 2003). Tato dráha vede k produkci antihoubových peptidů, jako například drosomycinu (Silverman a Maniatis, 2001) či antimikrobiálních peptidů (Hoffmann, 2003). Pouze DIF je využíván u imunitní odpovědi dospělců, u larev jsou využívány DIF i Dorsal (Beinke a Ley, 2004).



Obrázek 1 Schéma signálních drah Toll a IMD (převzato a upraveno z Beinke a Ley, 2004)

Mnoho genových produktů zprostředkovává signalizaci mezi Toll a DIF a většina je zapojena do faktorů v lidské IL-1 a Toll-like receptor (TLR) dráze (Hultmark, 2003).

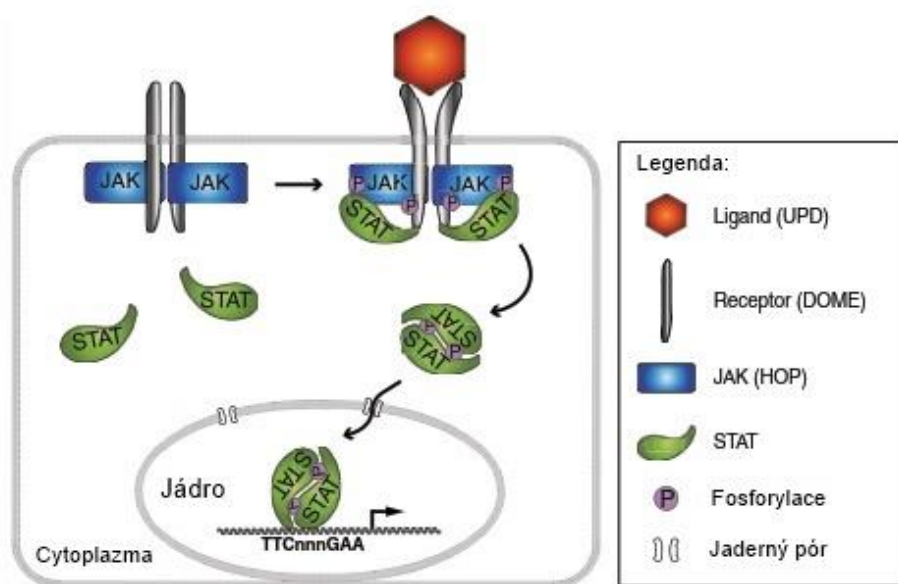
2.1.3 JAK/STAT dráha

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription; Janus kinasa/signální převodník a aktivátor transkripce) (Geng *et al.*, 2016) signální dráha může také přispívat k vrozené imunitě navozením komplement-like faktorů a proliferací hemocytů (Evans *et al.*, 2006). Ukázalo se, že se tato dráha účastní v antivirové odpovědi u octomilky (Dostert *et al.*, 2005). Tato dráha je zprostředkovaná mnohými cytokiny a regulovaná důležitými biologickými procesy, jako je imunoregulace, buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza (Brivanlou a Darnell, 2002). Proteiny zapojené v této dráze a základní funkce jsou vysoce zachovány od savců po bezobratlé (Horvath a Darnell, 1997). Hmyzí JAK/STAT signální dráha byla poprvé nalezena u octomilky (Harrison *et al.*, 1998) a bylo také identifikováno mnoho signálních faktorů, jako extracelulární ligand (nepárový, UPD), transmembránový receptor (domeless, DOME), janus tyrosin kinasa (hopscotch, HOP), transkripční faktory (STAT 92 E), supresor signalizace cytokinů (SOCS),

inhibiční protein aktivovaného STAT (PIAS) a adaptorová molekula pro přenos signálu (STAM) (Arbouzova a Ziedler, 2006).

2.1.3.1 Mechanismus signalizace

Ligand (UPD) se váže s predimerovanými komplexy DOME nebo HOP a poté je aktivován fosforylací. Fosforylace DOME nebo HOP může vázat a posilovat normálně cytosolické STATs (Geng *et al.*, 2016). Cytosolické STATs jsou fosforylovány a utváří STAT dimery, které jsou translokovány do jádra a vážou se na palindromickou sekvenci DNA v promotorech cílových genů a aktivují transkripci (Hombría a Brown, 2002).



Obrázek 2 Schéma signální dráhy JAK/STAT (převzato a upraveno z Arbouzova a Ziedler, 2006)

2.1.3.2 Signální faktory u různých druhů hmyzu

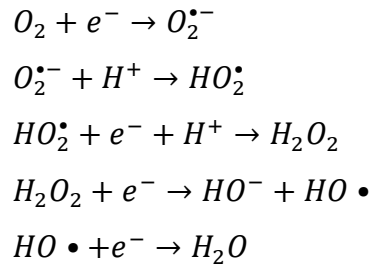
Funkční proteiny JAK/STAT signální dráhy u bource morušového (*Bombyx mori*) jsou vysoce homologní s proteiny octomilky (Li *et al.*, 2003) a klíčoví členové JAK/STAT signální dráhy u octomilky jsou podobné lidským (Rawlings *et al.*, 2004). Každopádně bioinformatické analýzy byly neúspěšné v detekci orthologů octomilky *Upd1*, *Upd2* a *Upd3* v genomu bource a EST knihovny (Cheng *et al.*, 2009) naznačující, že aktivace JAK/STAT signální dráhy u bource může být zprostředkována jinými neznámými ligandy (Geng *et al.*, 2016). Včelí homology pro JAK/STAT signální dráhu octomilky zahrnují cytokinový receptor domeless (DOM), janus tyrosin kinasu (hopscotch, HOP), STAT 92 E transkripční faktor a dva negativní regulátory dráhy SOCS a PIAS (Evans *et al.*, 2006). Orthology dvou identifikovaných složek této dráhy (Baeg *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005), tyrosin fosfatasa Ptp61F (XP392429) a WD40 a doména obsahující brom BRWD3 (XP395263) jsou také přítomny u včely medonosné (Evans *et al.*, 2006). Ačkoliv klíčový ligand UPD nebyl nalezen v genomu včely medonosné, přítomnost cytokinového receptoru gp130 (homolog Domeless) a všech ostatních členů signální dráhy naznačují, že tento mechanismus může být běžný u hmyzu a je neporušený jak u včel, tak u mušek (Evans *et al.*, 2006).

2.2 Reaktivní formy kyslíku

Všechny aerobní organismy produkují reaktivní formy kyslíku (ROS) v procesu jejich oxidativního metabolismu, vyskytující se v mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech. Vznikají redukcí O_2 a mohou poškodit lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Felton a Summers, 1995). Tyto reaktivní formy kyslíku zahrnují superoxidový anionradikál $O_2^{\cdot-}$, hydroperoxylový radikál HO_2^{\cdot} , peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál $\cdot OH$. Všechny tyto sloučeniny jsou meziprodukty, které vznikají během přeměny O_2 na H_2O a jsou odvozeny od enzymatických reakcí a autooxidace redox-aktivních sloučenin, které se nachází ve všech živých buňkách (Weirich *et al.*, 2002).

2.2.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku

V organismu existuje mnoho prostředků pro tvorbu ROS, které zahrnují mitochondriální dýchací řetězec, NADPH-oxidasu fagocytů, systém P450, rozpustné oxidasy a autooxidace mnoho malých molekul (Hermes-Lima a Zenteno-Savín, 2002).



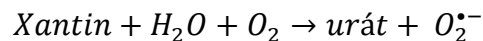
Obrázek 3 Rovnice vzniku ROS (převzato a upraveno z Pardini, 1995).

S ohledem na jejich funkční a vývojové rozmanitosti využívá hmyz různé cytotoxické mechanismy v ochraně proti parazitům a patogenům. ROS jsou produkovány u hmyzu jako ochrana proti endoparazitům (Nappi a Vass, 1993).

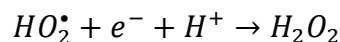
Čtyřelektronová redukce O_2 na H_2O dává aerobním organismům obrovskou energetickou výhodu oproti anaerobním organismům. Každopádně nekompletní redukce O_2 zvyšuje oxidační stavy ROS, které poškozují buňky (Pardini, 1995).

2.2.1.1 Biologické zdroje pro produkci ROS

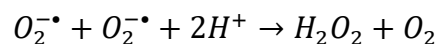
Redox-aktivní látky, jako katecholy, mohou být převedeny z jejich plně redukované formy na semichinonový radikál SQ^{\bullet} , meziprodukt z 1-elektronové oxidace, nebo enzymaticky, poté jsou plně oxidovány na chinonovou formu. Reaktivní radikál SQ^{\bullet} může reagovat s O_2 za přesunu nepárového elektronu, který generuje $O_2^{\bullet -}$ (Pardini, 1995). Existují různé mechanismy enzymatického vzniku $O_2^{\bullet -}$, které jsou uvedeny v tabulce 1. Typickým příkladem vzniku je reakce katalyzovaná xantinoxidasou:



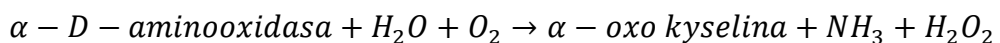
Tvorba peroxidu vodíku probíhá z hydroxyperoxylového radikálu HO_2^{\bullet} :



nebo dismutací $O_2^{\bullet -}$:



Peroxid vodíku může také vznikat přímou dvouelektronovou redukcí kyslíku za katalýzy mnoha peroxisomálními flavinovými enzymy, jako např. glukosaoxidas, uráttoxidas a D-aminoxidas:

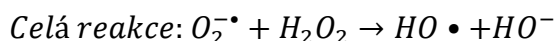
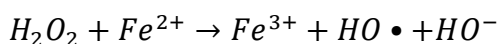
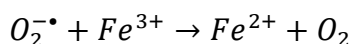


Tabulka 1 Biologické zdroje produkce $O_2^{\cdot-}$ (převzato a upraveno z Pardini, 1995).

Autooxidace redox-aktivních sloučenin	Enzymové zdroje
Katecholaminy	Aldehydoxidas (EC 1.2.3.1)
Hemoglobin	Cytochrom-P450-reduktasa (EC 1.6.2.4)
Myoglobin	Galaktosaoxidas (EC 1.1.3.9)
Redukovaný ferredoxin	NADPH-oxidas (EC 1.6.3.1)
Tetrahydropteriny	Indolamindioxygenasa (EC 1.13.11.52)

Některé známé zdroje $O_2^{\cdot-}$ jsou uvedeny v tabulce 1.

Hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) může být tvořen přeměnou kovů jako železo a měď ve Fentonově reakci:



Askorbát a glutathion (GSH) se vyskytují ve vyšších koncentracích než $O_2^{\cdot-}$ a tyhle reduktanty, stejně jako exogenní flavonoidy, mohou urychlit tvorbu HO^{\cdot} redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} , což může přímo štěpit H_2O_2 na produkty:



2.2.1.2 Tvorba ROS jako imunitní odezva

Vzhledem k jejich reaktivní povaze mají ROS mikrobicidní účinky. Klíčovým antimikrobiálním enzymem je NAD(P)H-oxidas (H_2O_2 -tvořící) (EC 1.6.3.1) (Duox, Dual oxidas), která je lokalizována na apikální membráně enterocytů (Huang *et al.*, 2015). Utváří udržovanou rodinu molekul, která obsahuje NADPH doménu a N-terminální extracelulární peroxidasovou doménu (PHD), která může produkovat ROS regulovaným způsobem (Ritsick *et al.*, 2004). Inaktivace *Duox* genu pomocí RNA interference (RNAi) blokuje produkci ROS ve střevě infikovaných mušek, což naznačuje, že tento enzym je jediným zdrojem ROS v epitelálních buňkách (Ha *et al.*, 2005). Nadměrná produkce ROS, která je škodlivá pro hostitele, je zhasena pomocí imunitně reagující katalasy (IRC) u octomilky. Umlčení IRC pomocí RNAi vede k vyšší produkci ROS a větší úmrtnosti mušek, což ukazuje, že IRC zajišťuje antioxidační ochranný systém octomilky (Ha *et al.*, 2005). IRC a *Duox* fenotypy

ukazují, že dobrá redox rovnováha je klíčová pro kontrolu mikroorganismů v lumenu střeva (Lemaitre a Hoffmann, 2007). ROS-dependentní střevní imunita není spouštěna IMD dráhou a slouží jako další bariéra proti požitým mikroorganismům (Ryu *et al.*, 2006).

2.2.1.3 NADPH-oxidasa

Mikrobicidní role ROS ve vrozené imunitě je nejlépe ilustrovaná u fagocytů. Ve fagosomu fagocytů se nachází NADPH-oxidasa, která produkuje superoxid z kyslíku. Superoxid dále dismutuje na H₂O₂ enzymaticky i neenzymaticky. Peroxid vodíku může být dále převeden na vysoce mikrobicidní HOCl myeloperoxidase (MPO) (EC 1.11.2.2.) (Ryu *et al.*, 2010). Enterocyty octomilky mají další NADPH oxidasu (NOX; EC 1.6.3.3), která je aktivovaná nepatogenní bakterií *Lactobacillus*, pro produkci ROS, které plní funkci lokální signální molekuly bez zdánlivých škodlivých efektů na bakterii nebo epiteliální buňky (Jones *et al.*, 2013).

V genomu octomilky byl nalezen jeden *Nox* gen a jeden *Duox* gen (Ha *et al.*, 2005). Strukturní analýzy ukázaly, že DUOX obsahuje gp91^{phox}, homologní doménu typickou pro všechny členy NOX rodiny, která je zodpovědná za tvorbu H₂O₂ a extracelulární peroxidasa-homologní doménu (PHD) (Ryu *et al.*, 2010). PHD je zachována u DOUX rodiny enzymů od obratlovců po bezobratlé, přestože není jasné, jestli PHD má nebo nemá enzymatickou aktivitu u savců (Meitzler a Montellano, 2009). Hodnocení enzymatické aktivity PHD octomilky ukázalo, že nízké koncentrace H₂O₂ mohou zabít bakterie *in vitro* v přítomnosti rekombinantní PHD chlorid-dependentním způsobem, což naznačuje, že PHD má enzymatickou aktivitu podobnou MPO, která umožňuje přeměnu H₂O₂ na HOCl v přítomnosti chloridových iontů (Ryu *et al.*, 2010). Protože NADPH oxidasa, které chybí PHD, nemůže plně podporovat mikrobicidní účinek ve střevě, je pravděpodobné, že PHD NADPH-oxidasy je nezbytná pro hostitelský obranný systém (Ha *et al.*, 2005).

Objev nezbytné role NADPH-oxidasy v epiteliálních buňkách střeva odhalil, že oxidačně-dependentní imunita není omezena na fagocyty, což rozšiřuje koncept imunity založené na ROS v epiteliálních buňkách, které jsou v kontaktu s mikroby (Ryu *et al.*, 2010).

2.2.1.4 Regulace aktivity NADPH-oxidasy

Model octomilky odhalil, že mikrobiální komponenty, jiné než peptidoglykan (PG), jsou zapojeny v NADPH-oxidasa-dependentní tvorby ROS *in vivo* a *in vitro*. Tyhle ne-PG ligandy jsou rozpoznávány neznámým receptorem spojeným s G proteinem (GPCR) a předávají signály na Ca^2+ a fosfolipasu $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), což vede k mobilizaci intracelulárního vápníku přes tvorbu inositoltrifosfátu (IP3). Tahle $\text{PLC}\beta/\text{IP3}$ -dependentní mobilizace vápníku je dostatečná pro spontánní aktivaci NADPH-oxidasy a následnou tvorbu ROS. Aktivace $\text{PLC}\beta$ je konstitutivní za běžných podmínek, i když na nízké úrovni, která udržuje nízkou aktivitu NADPH-oxidasy (Ha *et al.*, 2009).

2.2.1.5 Regulace exprese NADPH-oxidasy

Genová exprese NADPH-oxidasy je vysoce regulovaná v odpovědi na infekci (Ryu *et al.*, 2010). Ha *et al.* (2009) použili octomilku jako model, aby ukázali, že indukce *Duox* genu ve střevě je potřebná pro přežití hostitele po těžkém napadení mikroorganismy. Po mikrobiální infekci, vysoká koncentrace mikrobiálních ligandů (PG i ne-PG ligandy) přechodně vyvolávala expresi *Duox* přes MEKK1-MKK3-p38 dráhu (Ha *et al.*, 2009). Peptidoglykan může vyvolat expresi *Duox*, ale ne její aktivitu (Ryu *et al.*, 2010). P-38-dependentní aktivace transkripčního faktoru ATF2, je zodpovědná za iniciaci *Duox* indukce. Aktivace MEKK1-MKK3-p38 dráhy nastane PG-independentním způsobem přes $\text{PLC}\beta$ dráhu stejně jako PG-dependentním způsobem přes PGRP-LC a IMD dráhu. Tyto poznatky ukazují, že dynamická regulace úrovně exprese *Duox* je kritickým faktorem pro nastavení enzymové aktivity NADPH-oxidasy v odpovědi na různé fyziologické signály, jako jsou infekce (Ryu *et al.*, 2010).

2.2.2 Antioxidační ochrana

Endogenní antioxidační ochrana enzymové a neenzymové povahy jsou stěžejní pro kontrolu oxidačních poruch biomolekul, jako DNA, RNA, proteiny a polynenasycené membránové lipidy způsobené ROS/RNS (Hermes-Lima a Zeneto-Savín, 2002). Skupina enzymů a nízkomolekulárních složek transformují ROS na neradikálové a slabě reaktivní molekulární formy jsou klasifikovány jako antioxidační obranný mechanismus (Blagojević a Grubor-Lajšić, 2000). Hlavní fyziologická role tohoto mechanismu je předcházet rozvoji oxidačního poškození (Cotgreave *et al.*, 1988). Jejich úlohou je udržovat ROS (a tudíž další toxické vedlejší produkty oxidační

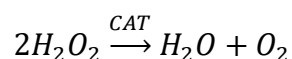
poruchy jako aldehydy) na úrovni neohrožující buňky (Ahmad, 1995). Pokud je míra vzniku ROS nadměrná, může to přemoci antioxidační kapacitu organismu a způsobit tak oxidační stres (Sies, 1987). Organismy jsou schopny adaptace na některé chronické situace vysokého vystavení ROS zvýšením exprese antioxidačních enzymů a mnohých dalších forem obrany/odpovědi a opravují oxidační poškození (Dempfle, 1999). Mnoho výzkumů ukázaly, že ROS a RNS, zvláště H₂O₂ a NO jsou druzí poslové mnoha převodních signálních drah (zahrnují tyrosin kinasové membránové receptory, Ras, MAP kinasy, protein kinasu C a nukleární faktor κB (NF-κB)) zprostředkující odpovědi na oxidační stres a patologické/parakrinní podněty (Kamata a Hirata, 1999; Allen a Tresini, 2000). Endogenní tvorba ROS je také zapojena v převodních drahách spojených s mechanismem O₂ snímající následnou fyziologickou odpověď (Kietzmann *et al.*, 2000; Semenza, 2000).

2.2.2.1 Enzymová antioxidační ochrana

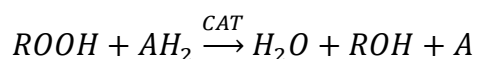
Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy patří katalasa (CAT, EC: 1.11.1.6), superoxiddismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1), glutathionreduktasa (GR, EC: 1.7.1.8), glutathion S-transferasa (GST, EC: 2.5.1.18). V své práci se budu zabývat CAT a SOD.

Katalasa

Katalasa je tetramerní enzym složený ze 4 identických tetraherdrálně uspořádaných 60 kDa podjednotek, kdy každá obsahuje jednu ferriprotoporfyrinovou skupinu. Celková hmotnost CAT je okolo 240 kDa (Aebi, 1980). CAT reaguje velmi efektivně s H₂O₂ za tvorby vody a kyslíku:



A s H donory (metanol, kyselina mravenčí, fenoly) má peroxidasovou aktivitu:

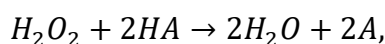


V současnosti jsou katalasy klasifikovány jako: monofunkční (typické) katalasy, katalasy-peroxidasy a katalasy obsahující mangan (nehemové katalasy).

Monofunkční (typické) katalasy byly objeveny u prokaryot i eukaryot (Zámocký, 1997). Kromě katalasové aktivity vykazují v menší míře i peroxidasovou aktivitu (např. s alifatickými alkoholy). Jsou to tetramerní molekuly, které obsahují jeden

protohem IX v každé podjednotce (Zámocký, 1997). Hem-obsahující katalasy mají společné dvě úrovně mechanismu degradace H₂O₂. V prvním kroku jedna molekula H₂O₂ oxiduje hem na oxyferryl sloučeniny, ve kterých je jeden oxidační ekvivalent odstraněn z železa a jeden z porfyrinového jádra za tvorby porfyrin kation radikálu. Ve druhém kroku je H₂O₂ využíván jako reduktant porfyrinkationradikálu za tvorby klidového stavu enzymu, vody a kyslíku. I přes tuto obvyklou reakci jsou velké rozdíly v reaktivní schopnosti mezi touto rodinou enzymů (Chelikani *et al.*, 2004).

Katalasy-peroxidasy i přes odlišnou sekvenci a terciární/kvarterní strukturu, probíhá celková katalytická reakce katalas-peroxidas přes stejné dvě úrovně, jako je tomu u monofunkčních CAT (Chelikani *et al.*, 2004). Vyznačují se relativně nižší katalasovou a zvýšenou peroxidasovou aktivitou, a to nejen s 2-elektronovými, ale i 1- elektronovými substráty (ABTS, L-DOPA, guajakol):

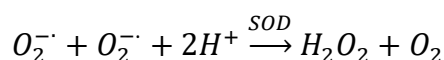


kde A je substrát nejčastěji aromatického charakteru schopný 1-elektronové oxidace. Mají širší pH a teplotní optimum jako monofunkční CAT. Zástupci této skupiny byli izolováni především z buněk prokaryot, ale i eukaryotických hub (Zámocký, 1997).

Katalasy obsahující mangan (nehemové katalasy) nejsou tolik rozšířené jako CAT obsahující hem a zatím byly identifikovány pouze u bakterií. Byly objeveny dva typy těchto katalas, jeden u *Thermus thermophilus* a druhý u *Lactobacillus plantarum*. Krystalová struktura těchto dvou typů katalas ukázala, že jde homoexamerní enzym s přibližně 30kDa monomery a jejich katalytické centrum je dimanganová skupina (Chelikani *et al.*, 2004).

Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa je antioxidační enzym, který katalyzuje dismutaci vysoce reaktivního superoxidového anion radikálu (O₂^{•-}) na kyslík O₂ a méně reaktivní peroxid vodíku H₂O₂, ten může být následně odstraněn pomocí CAT nebo GPX (glutathionperoxidasa) (Matés *et al.*, 1999).



Jsou známy tři typy SOD-cytosolická, Cu/Zn-SOD, mitochondriální, Mn-SOD a extracelulární SOD (EC-SOD) (Matés *et al.*, 1999). Přestože všechny typy tohoto

enzymu mají stejnou funkci, jejich odlišná krystalová struktura, využití jiných metalových kofaktorů a jejich charakteristický katalytický mechanismus, nelze předpokládat, že by tyto enzymy měly stejného předchůdce (Zelko *et al.*, 2002).

Cu/Zn SOD (SOD1) obsahuje dvě identické podjednotky o 32 kDa, přestože monomerní struktura může být nalezena ve vysokých koncentracích u *E. coli*. Každá podjednotka obsahuje metalový klastr, aktivní místo, složený z mědi a zinku spojenými histaminovými rezidui (Matés *et al.*, 1999).

Mn-SOD (SOD2) je homotetramer (96 kDa) obsahující jeden manganový atom v každé podjednotce, který cykluje z Mn^{III} na Mn^{II} a zpět na Mn^{III} během dvoustupňové dismutace superoxidu (Matés *et al.*, 1999).

EC-SOD (SOD3) je sekreční tetramerní glykoprotein, obsahující zinek a měď. Má vysokou afinitu pro některé glykosaminoglykany, jako jsou heparin a heparansulfát. EC-SOD byla nalezena v intersticiálních prostorách tkáni a také v extracelulárních tekutinách. Není indukovaná svým substrátem nebo jinými oxidanty a její regulace v tkáních savců je primárně uskutečňována cytokiny (Matés *et al.*, 1999).

2.2.2.2 Neenzymová antioxidační ochrana

Mezi obranné molekuly neenzymové povahy z endogenních a potravinových zdrojů patří glutathion (GSH), vitamin E, askorbát, karotenoidy, polyfenoly, močová kyselina a bilirubin (Hermes-Lima a Zenteno-Savín, 2002).

Vitamin C (kyselina askorbová)

Ve vodě rozpustný vitamin C zajišťuje intra a extracelulární antioxidační kapacitu primárně odstraňováním volných kyslíkových radikálů. Přeměňuje volné radikály vitaminu E zpět na vitamin E (Birben *et al.*, 2012).

Vitamin E (α -tokoferol)

Jde o hlavní v tuku rozpustný antioxidant, který chrání buňky před volnými alkyl a peroxy radikály. Během reakce vitamin E věnuje 1 elektron peroxy radikálu, který je tvořen během peroxidace lipidů, dále je oxidován na tokoferyl radikál a pak na tokoferolchinon (Felton a Summers, 1995; Birben *et al.*, 2012). Vitamin E spouští apoptózu nádorových buněk a inhibuje tvoření volných radikálů (Birben *et al.*, 2012).

Glutathion (GSH)

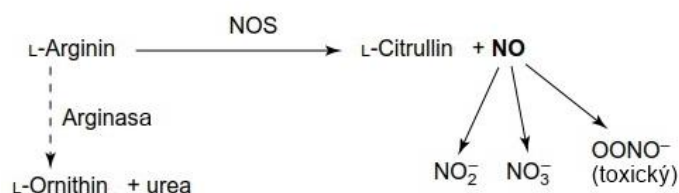
GSH je v buňkách velmi bohatě zastoupen. Přeměňuje peroxid a lipidové peroxidy pomocí glutathionperoxidasy (GSH-Px), donací 1 elektronu redukuje peroxid vodíku na vodu a kyslík. GSH je kofaktorem některých detoxikačních enzymů (Birben *et al.*, 2012).

Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty nalezené v rostlinách. β -karoten reaguje především s peroxy (ROO \cdot), hydroxyl (HO \cdot) a superoxidanion (O $_2^{\cdot-}$) radikály (Birben *et al.*, 2012). Je schopen inhibovat peroxidaci lipidů a je důležitý v ochraně lipoproteinů nízké hustoty (LDL) před oxidací v lidském séru (Felton a Summers, 1995).

2.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je vysoce reaktivní nestabilní volný radikál. Jde o bezbarvý plyn, mírně rozpustný ve vodě. Je to paramagnetická molekula s lichým počtem elektronů, což vysvětluje jeho vysokou reaktivitu a radikálovou povahu (Kelm, 1999). Je produkován během oxidace L-argininu na L-citrulin enzymem syntasou oxidu dusnatého (NOS) (EC 1.14.13.39), která využívá NADPH jako kofaktor (Negri *et al.*, 2013; Mayer, 1994).



Obrázek 4 Dráha syntézy NO a jeho další přeměny (převzato a upraveno z Rivero, 2006).



Obrázek 5 Vzorec oxidu dusnatého

2.3.1 Oxid dusnatý jako signální molekula

V biologických systémech je způsob a rychlost metabolismu NO závislý na jeho koncentraci, schopnosti difuze a okolní koncentraci další bioreaktantů. Difuze je mu umožněna díky jeho neutrálnímu náboji. NO dokáže urazit značné vzdálenosti k dosažení cílových buněk, které sousedí s buňkou produkující NO s malou spotřebou nebo přímou reakcí (Kelm, 1999). Jednoduchost, se kterou NO prostupuje membránami mu umožňuje být ideální molekulou pro přenos signálu (Rivero, 2006; Moreno-García *et al.*, 2012). Na rozdíl od běžných signálních molekul se NO neváže na specifické receptory reversibilním způsobem, ale vykonává svou biologickou funkci pomocí řady chemických reakcí (Müller, 1997). NO může působit na řadu cílů v sousedních buňkách stejně jako na buňku, která sama produkuje NO (Gally *et al.*, 1990). Produkovaný NO je zapojen v chemosenzorickém a vizuálním zpracování a při tvorbě dlouhodobé paměti (Müller, 1997). U imunitně reagujícího hmyzu je NO často produkován aktivovanými buňkami ve spojení s reaktivními kyslíkovými intermediáty (ROI), $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Tyhle ROI, především H_2O_2 , jsou aktivátory druhých poslů NF- κ B (Nappi *et al.*, 2000). NO vykonává signální funkci, jako je tomu u octomilky *Drosophila melanogaster* při vyvolání hostitelské obranné reakce na gramnegativní bakterie (Foley a O'Farrell, 2003), při neurozánětlivých odpovědích (Ajjuri a O'Donnell, 2013) a chemosenzorické transdukce a fungování buněk čichových receptorů u masařky (*Neobellieria bullata*) (Wasserman a Itagaki, 2003). NO také hraje rozhodující roli v produkci světla u světlušek inhibicí využívání kyslíku mitochondriemi, který je dodáván do fotocytů na oxidaci luciferinu (Trimmer *et al.*, 2001). U krev sajícího hmyzu je NO sekretován slinnými žlázami a vpravován do hostitele, kde slouží jako vazodilatační látka nebo jako inhibitor agregace trombocytů (Ribeiro a Nussenzveig, 1993). NO také indukuje humorální a buněčné imunitní odpovědi přes Toll/IMD signální dráhy u octomilky (Nappi *et al.*, 2000; Foley a O'Farrell, 2003).

2.3.2 Oxid dusnatý v imunitních reakcích

Početné publikace popsaly centrální roli pro NO signalizaci v obranném mechanismu hostitele proti infekcím způsobenými viry, bakteriemi, prvoky a živočišnými parazity (Negri *et al.*, 2013). Navíc má NO roli nespecifické cytotoxické molekuly (Rivero, 2006). Pro vyvolání cytotoxické aktivity reaguje NO s $O_2^{\cdot-}$ za tvorby peroxynitritu ($ONOO^{\cdot-}$) a s H_2O_2 za tvorby vysoce reaktivního hydroxylového radikálu (HO^{\cdot}) (Hogg

et al., 1992). Tyto látky mají ničivé vlastnosti pro DNA, proteiny a lipidy (Hillyer a Estévez-Lao, 2010). V tomto smyslu se NO stává toxickým pro mnoho druhů patogenů, které zahrnují viry, houby, bakterie, prvoky a živočišné parazity. U obratlovců role NO jako obranné molekuly proti infekci způsobené viry, bakteriemi, parazity a živočišnými parazity je známá už po několik let (Rivero, 2006). U hmyzu je NO produkován také jako imunitní efektorová molekula v odpovědi na mikrobiální infekci u některých druhů motýlů, polokřídlicích a dvoukřídlicích (Rivero, 2006), ale také v procesu léčby zranění (Moreno-García *et al.*, 2012).

2.3.3 Synthasa oxidu dusnatého (NOS)

U bezobratlých byla nalezena pouze jedna isoforma NOS, která má buď konstitutivní (signální) nebo indukovatelnou (toxickou) roli. V 90. letech byla NOS charakterizována u některých druhů hmyzu (Rivero, 2006). Je to homodimer o molekulové hmotnosti asi 160 kDa (Stuehr and Griffith, 1992; Knowles a Moncada, 1994). Obsahuje různé kofaktory, jako NADPH, kalmodulin, FMN, FAD (Bredt *et al.*, 1991). Hmyz není schopen syntetizovat arginin, který jim musí být dodávat z potravy, což je pravděpodobně limitující faktor syntézy NO (Rivero, 2006).

Hmyzí NOS sdílí mnohé rysy s konstitutivní NOS u obratlovců: má signální roli, syntetizuje NO přes aktivaci tohoto enzymu změnou koncentrace vápníku (Müller, 1997). Chemicky modifikované analogy L-argininu jsou kompetitivními inhibitory hmyzí NOS (Müller, 1997), jako například N^ω-nitro-L-arginin (L-NNA) a N^ω-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) (Elphick *et al.*, 1995). U některých druhů hmyzu je NO indukovatelně syntetizován přes iNOS, jako u *Anopheles gambiae* (Hillyer a Estévez-Lao, 2010), *Anopheles stephensi* (Luckhart *et al.*, 1998) a *Rhodnius prolixus* (Whitten *et al.*, 2001). Regulace exprese NOS je přímo zapojená s imunitní odpovědí u lišaje tabákového (*Manduca sexta*) (Eleftherianos *et al.*, 2009).

2.3.4 Katabolismus oxidu dusnatého

Při vyšších koncentracích může NO interagovat s molekulárním kyslíkem, thioly a redukovanými hemoproteiny (Kelm, 1999). Reakce NO s O₂ v okolí hydrofobních oblastí membrán je přibližně 300x rychlejší než ve vodném médiu (Liu *et al.*, 1998). To znamená, že biologické membrány a jiné hydrofobní části tkání jsou důležité oblasti pro katabolismus NO během jeho migrace z produkční do cílové buňky (Kelm *et al.*, 1999). Mimo molekulární kyslík, některé reaktivní formy kyslíku (ROS), jako

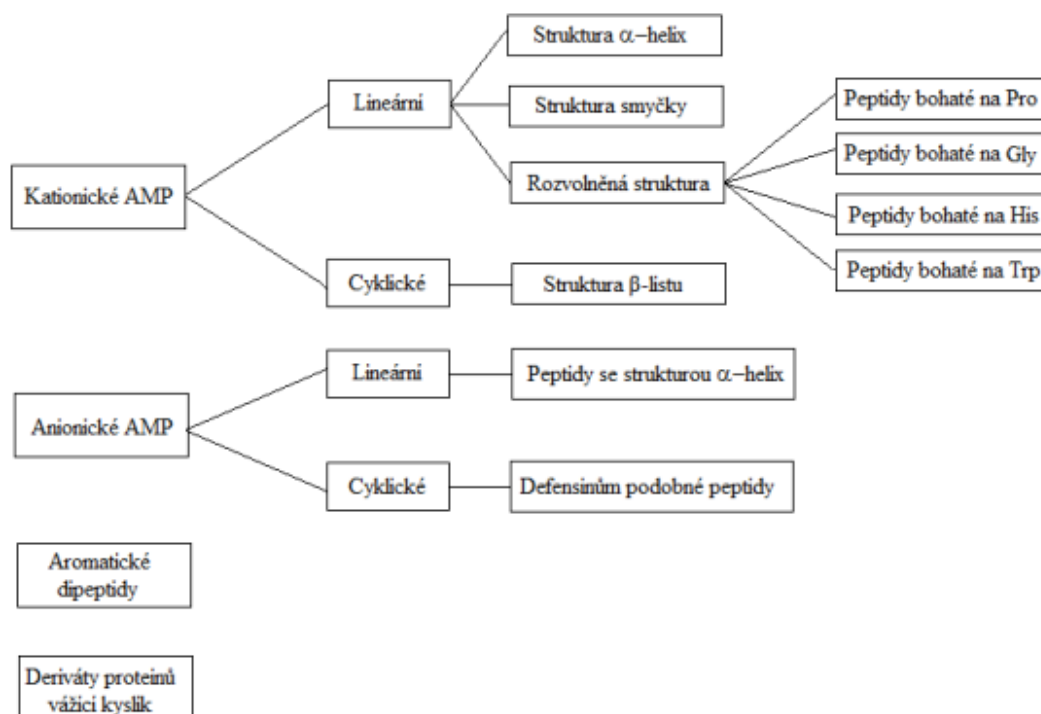
například superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($HO\cdot$) jsou zapojeny do zhášení NO (Kelm *et al.*, 1999).

2.4 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou geneticky kódované, na ribozomech syntetizované polypeptidy. Většinou mají společné charakteristické prvky: malý peptid (30-60 aminokyselinových zbytků), silně kationické (pI 8,9-10,7), teplotně stabilní (100 °C, 15 min), bez odolnosti vůči lékům a nemají žádný účinek na eukaryotickou buňku. AMPs obvykle působí proti bakteriím, které jsou úzce příbuzné s kmeny producentů u prokaryot, zatímco hrají klíčovou roli ve vrozené imunitě eukaryot (Li *et al.*, 2012). Tyto peptidy jsou produkovány několika druhy, zahrnující bakterie, hmyz, rostliny, obratlovce a byly uznány jako starodávné molekuly, které jsou evolučně zachovány i u savců (Altincicek *et al.*, 2007; Konno *et al.*, 2007).

2.4.1 Rozdělení antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy lze podle struktury a vlastností rozdělit do několika skupin (Obr. 2).



Obrázek 6 Rozdělení antimikrobiálních peptidů (převzato z BP Silvie Dostálková, 2014).

2.4.1.1 Kationické AMP

Jde o nejpočetnější skupinu antimikrobiálních peptidů. Z této skupiny bylo charakterizováno více jak 400 peptidů a téměř polovinu z nich tvoří peptidu z hmyzu (Vizioli a Salzet, 2002). Kationické AMPs jsou většinou definovány jako peptidy s méně než 50 aminokyselinovými zbytky s celkovým pozitivním nábojem, který je dán přítomností několika lysinových a argininových zbytků a značnou částí hydrofobních reziduí. Tyto peptidy působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, houbám, prvokům (Powers a Hancock, 2003).

2.4.1.2 Anionické AMP

Anionické peptidy jsou poměrně novou skupinou AMPs a jsou obvykle izolovány z epitelálních buněk savců (Vizioli a Salzet, 2002). Jde o malé peptidy, které jsou bohaté na kyselinu glutamovou a aspargovou, pochází z ovcí, dobytka a lidí. Jsou produkovány v mM koncentracích, vyžadují zinek jako kofaktor pro antimikrobiální aktivitu a působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím (Brodgen, 2005). Anionický peptid dermicidin, který je složený ze 47 aminokyselin, byl identifikován v lidském potu jako odpověď proti různým patogenním grampozitivním bakteriím (Schitteck *et al.*, 2001).

2.4.1.3 Aromatické dipeptidy

Aromatické dipeptidy zahrnují nízkomolekulární antibakteriální sloučeniny, izolované z larev dvoukřídlých (*Diptera*) (Vizioli a Salzet, 2002). Zástupci těchto dipeptidů jsou například N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanine (573 Da), který byl identifikován v masařce (*Sarcophaga peregrina*) (Leem *et al.*, 1996) a p-hydroxycinnamaldehyd, izolovaný z ploskohřbetky (*Acantholyda parki*) (Leem *et al.*, 1999).

2.4.1.4 Deriváty peptidů vážící kyslík

Deriváty hemocyaninu, prvního zástupce této skupiny, byly izolovány z hemolymfy členovců (*Arthropoda*) a kroužkovců (*Annelida*) (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001). V hemolymfě klíštěte (*Boophilus microplus*) byla pozorována rozštěpená forma hemoglobinu, která byla produkována parazitem po požití krve (Fogaça *et al.*, 1999).

Baktericidní aktivita anionických peptidů, aromatických dipeptidů a derivátů vážící kyslík je obvykle nízká v porovnání s kationickými peptidy. Jejich mechanismus akce

se může lišit od kationických peptidů a ostatních antibiotik a mohou doplňovat aktivitu jiných sloučenin a představovat užitečný základ pro rozvoj nových syntetických derivátů (Vizioli a Salzet, 2002).

2.4.2 Antimikrobiální peptidy hmyzu

Antimikrobiální peptidy jsou buď konstitutivní nebo indukovatelné. Vrozený imunitní systém hmyzu a savců sdílí strukturně a funkčně příbuzné faktory pro eliminaci útočících mikrobů. Hmyz nedisponuje žádným adaptivním imunitním systémem, který hraje nezbytnou roli u obratlovců, vyvinuli si ovšem účinnou vrozenou imunitu pro ochranu před mikrobiální infekcí. Hmyzí antimikrobiální peptidy hrají důležitou roli v humorální obranné reakci (Li *et al.*, 2012). Hlavním místem jejich syntézy je tukové tělísko (hmyzí funkční ekvivalent savčích jater) (Li *et al.*, 2012), jejich syntéza probíhá ale také v hemocytech (Boman, 1991), kutikulárních epitelálních buňkách (Brey *et al.*, 1993), střevě (Daffre *et al.*, 1994), slinných žlázách (Kylsten *et al.*, 1992) a reprodukčním ústrojí (Samakovlis *et al.*, 1991). AMPs jsou následně vylučovány do hemolymfy (Li *et al.*, 2012). Od 80. let 20. století, kdy byl Hansem Bomanem a jeho skupinou objeven první antimikrobiální peptid cecropin u martináče (*Hyalophora cecropia*), bylo identifikováno velké množství antimikrobiálních peptidů. U hmyzu jich bylo identifikováno už více než 200 a mezi jejich společné rysy patří relativně malá molekulová hmotnost, pozitivní náboj a indukovatelnost poraněním nebo mikrobiální infekcí. Tyto peptidy jsou rozděleny do 5 skupin podle jejich aminokyselinové sekvence a antimikrobiální aktivity: cecropiny, hmyzí defensiny, peptidy bohaté na prolin, peptidy bohaté na glycin a lysozymy (Li *et al.*, 2012).

2.4.2.1 Cecropiny

Cecropin, indukovatelný antimikrobiální peptid, který byl nalezen v hemolymfě martináče (*H. cecropia*), byl první objevený antimikrobiální peptid. Následně byly identifikovány cecropiny z pláštěnců a škrkavky, což naznačuje, že jsou cecropiny rozšířeny celou živočišnou říší. U hmyzu byly identifikovány a popsány cecropiny u druhů hmyzu řádu motýli (*Lepidoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*) (Li *et al.*, 2012). Cecropiny ve své struktuře neobsahují cystein, jsou složeny z 35-39 aminokyselin a vytváří 2 lineární α -helixy, které jsou spojené Ala-Gly-Pro pantem (Steiner, 1982; Holak *et al.*, 1988). Mají antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Vilmos a Kurucz, 1998).

2.4.2.2 Hmyzí defensiny

Tyto peptidy byly izolovány ze savců, hmyzu i rostlin. Defensiny tvoří unikátní rodinu kationických antimikrobiálních peptidů bohatých na cystein, jež mají ve své struktuře tři nebo čtyři disulfidové můstky. Jsou velice efektivní proti grampozitivním bakteriím, účinkují ale taky proti některým gramnegativním bakteriím, houbám, kvasinkám a prvokům (Li *et al.*, 2012). Defensiny se skládají z 36-56 aminokyselin, které mají podobnou sekvenci, což je základní pro jejich běžnou strukturu. Jsou tvořeny smyčkou z α -helixu a dvěma antiparalelními β -skládanými listy, které jsou stabilizovány třemi disulfidovými můstky (Klaudiny *et al.*, 2005). Do této skupiny patří i royalisin, který byl izolovaný z mateří kašičky (Fujiwara *et al.*, 1990).

2.4.2.3 Peptidy bohaté na prolin

Tyto kationické peptidy obsahují ve své struktuře zvýšený počet prolinů. Jsou aktivní především vůči gramnegativním bakteriím (Li *et al.*, 2012). Tyto peptidy byly izolovány z blanokřídlých (*Hymenoptera*), dvoukřídlých (*Diptera*) a polokřídlých (*Hemiptera*). Některé z těchto peptidů jsou O-glykosylované a tyto peptidy mají vyšší aktivitu vůči gramnegativním bakteriím (Cociancich *et al.*, 1994). Prototyp těchto substituovaných peptidů je drosocin, složený z 19 reziduí, z nichž jedna třetina obsahuje prolinové zbytky seskupené ve třech Pro-Arg-Pro opakováních (Bulet *et al.*, 1993). Dalším příkladem je abaecin, který je složený ze 34 reziduí, obsahuje 30 % prolinových zbytků a byl izolován z včely medonosné (*Apis mellifera*) (Casteels *et al.*, 1990). Ze včely byl izolovaný také apidaecin (Casteels *et al.*, 1989), který se skládá z 18 aminokyselinových zbytků a obsahuje 33 % prolinu (Cociancich *et al.*, 1994). Do této skupiny peptidů patří také pyrrococin izolovaný z ruměnice pospolné (*Pyrrocoris apterus*) (Cociancich *et al.*, 1994).

2.4.2.4 Peptidy bohaté na glycin

Tyto peptidy jsou bohatá na glycinová rezidua (14-22 %), což má velký vliv na jejich terciární strukturu a mechanismus účinku (Li *et al.*, 2012). Jsou účinné vůči gramnegativním bakteriím, ale i vůči některým grampozitivním bakteriím (Otvos, 2002). Patří zde především attaciny izolované z motýla martináče (*Hyalofora cecropia*) (Hultmark *et al.*, 1983), dále také sarcotoxiny II, které byly izolovány z mouchy *Sarcophaga peregrina* (Komano *et al.*, 1987) a jsou podobné attacinům (Cociancich *et al.*, 1994) a dipetriciny (Dimarcq *et al.*, 1988). V další řadě stojí za

zmínku hymenoptaecin, který byl izolovaný ze včely medonosné (*A. melifera*) (Casteels *et al.*, 1993), obsahuje 93 reziduí a je aktivní proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím a jejich sekvence je podobná diptericinům (Cociancich *et al.*, 1994).

2.4.2.5 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je enzym, který hydrolyzuje β -(1,4)-glykosidické vazby peptidoglykanu mezi kyselinou acetylmuramovou a N-acetylglukosaminem v buněčné stěně bakterií. Hmyzí lysozymy jsou proteiny (14 kDa), které jsou svou sekvencí podobné lysozymům obratlovců (Vilmos a Kurucz, 1998). V genomu včely medonosné byly nalezeny tři typy lysozymů – dva c-(chicken) jeden i-(invertebrate). Jeden z c-typu je více regulován u infikovaných včel (Evans *et al.*, 2006).

2.4.3 Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Funkce AMPs se liší od průniku membránou po akce v řadě intracelulárních cílových molekul, které zahrnují imunomodulační aktivity. Peptidy mohou rozrušit cytoplazmatickou membránu, což vede k lýze buňky, nebo pomohou interagovat s membránou za vzniku přechodných pórů a peptidy se tak transportují do buňky, kde dochází ke kontaktu s intracelulárními cíli (Li *et al.*, 2012).

2.4.3.1 Interakce peptidů s cytoplazmatickou membránou

Klasickou vlastností AMPs je schopnost interagovat s membránami a prostupovat jimi. To je jim usnadněno pomocí pozitivně nabitých hydrofilních domén peptidů, které interagují s negativně nabitými povrchy mikrobů, což vede k penetraci membrány. Dochází k narušení transmembránového potenciálu a pH gradientu, je postižena osmotická regulace a dochází k inhibici respirace (Li *et al.*, 2012).

Existují nejméně čtyři rozdílné běžně používané modely, které popisují možné způsoby akce AMPs: toroidní model, koberecový (carpet) model, model sudové skruže (barrel-stave model), model micelárních agregátů (aggregate channel model) (Li *et al.*, 2012).

Toroidní model (Toroidal model)

V tomto modelu dochází k agregaci připojených peptidů, následkem toho dochází k nepřetržitému ohýbání membrány a zúčastněné lipidy získávají pozitivní zakřivení (Li *et al.*, 2012). Při tvorbě toroidového póru se polární části peptidů spojují

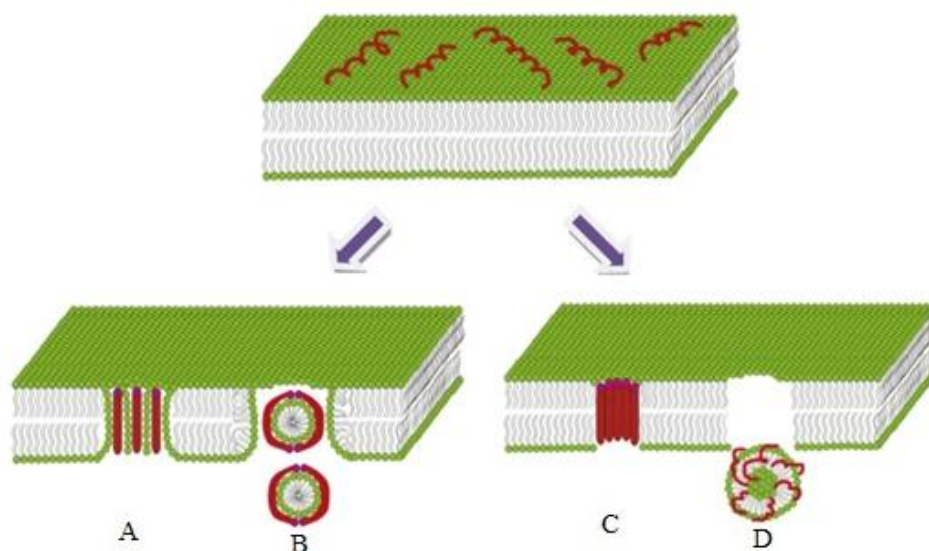
s polárními skupinami lipidů. Lipidy se v těchto otvorech oddělí od rovnoběžné vrstvy a spojují se s vedlejšími fosfolipidy. Vytváří se permanentní ohyb membrány od shora dolů na průchodu toroidního póru (Brodgen, 2005). Tento pór je tvořen peptidy i polárními skupinami lipidů (Brodgen, 2005). Nedávné studie prokázaly vzájemné působení lipidů a peptidů s ohledem na tvorbu póru: zatímco peptid podporuje vznik zakřivení, lipidové uspořádání reguluje konformaci peptidů (Bozzelli Jr. *et al.*, 2012).

Kobercový model (Carpet model)

V tomto modelu se peptidy akumulují na povrchu membrány. Tento model vysvětluje aktivitu peptidů jako ovispirin, který je paralelně orientovaný na povrchu membrány. Peptidy jsou elektrostaticky přitahovány k anionové polární skupině lipidů v početné plochy, které pokrývají povrch membrány. Při dosažení prahové koncentrace peptidů peptidy prostupují membránou jako detergenty a vytváří tak micela (Brodgen, 2005). Takové narušení membrány vede k buněčné smrti. Tento model je nejběžnější při reakci AMPs na gramnegativní bakterie a parazity za výsledného oslabení membrány. Toto narušení vede k přechodné formě pórů, transportu vnějších lipidů do vnitřní vrstvy a konečnému kolapsu membrány za tvorby malých vezikul obalených AMPs (Li *et al.*, 2012).

Model sudové skruže (barrel-stave model)

V tomto modelu vytváří peptidové helixy v membráně svazky s centrálním průsvitem podobně jako sud složený z helikálních peptidů na vnější straně. Hydrofobní části peptidů se seřadí se středem lipidové dvojvrstvy a hydrofilní části peptidů vytváří vnitřek póru (Brodgen, 2005). Tímto je vytvořen vodní kanál. Smrt mikroba nastane z důvodu ztráty polarizace membrány, úniku buněčného obsahu, poruchy membránové funkce redistribucí lipidů nebo aktivací hydrolas, které rozrušují buněčnou stěnu (Li *et al.*, 2012). Tento typ transmembránového póru je unikátní a je vyvolán alamethicinem (Brodgen, 2005).



Obrázek 7 Modely akce AMPs. A) Toroidní model, B) Kobercový model, C) Model sudové skruže, D) Model micelárních agregátů (převzato a upraveno z Li *et al.*, 2012)

Model micelárních agregátů (aggregate channel model)

V tomto modelu zvýšená permeabilita membrány nemusí být dostatečná, aby vedla k buněčné smrti (Li *et al.*, 2012). Počáteční akce peptidu zahrnuje kompetitivní přesun dvoumocných kationtů (Mg^{2+} a Ca^{2+}), které jsou přidružené k LPS, ze kterých peptidy destabilizují tyto supramolekulární sestavy a získají přístup k vnitřní i vnější membráně. Tyto peptidy způsobují membránové rozrušení tvorbou specifických membránových domén, postranní fázová segregace zwitterionu z anionových fosfolipidů a tvorba nelamelárních lipidových fází. Tyhle agregáty zajišťují kanály pro únik iontů přes membránu (Li *et al.*, 2012). Tímto způsobem reaguje maculatin 1.1 z australské rosničky (Bond *et al.*, 2008).

2.4.3.2 Schopnost inhibovat nebo rozrušovat intracelulární cíle

Kromě schopnosti interagovat s membránami, narůstají spekulace, že nejde o jediné mechanismy, které vedou ke smrti mikrobů (Brodgen, 2005; Li *et al.*, 2012). AMPs mají jiné intracelulární cíle: mohou se vázat na DNA, RNA a proteiny, inhibovat syntézu buněčné stěny, DNA, RNA a proteinů. Peptidy si vyvinuly unikátní mechanismy pro translokaci do cytoplasmy za účelem pozměnit tvorbu přepážky v cytoplasmatické membráně, inhibovat syntézu buněčné stěny, nukleových kyselin, proteinů či inhibovat enzymovou aktivitu. Vstup antimikrobiálních peptidů VS2 a VS3 do kvasinky způsobí akumulaci reaktivních forem kyslíku, což vede k buněčné

nekróze. Bufforin II (α -helix) se váže na krátké sekvence DNA a vytvoří peptid-DNA kondenzáty (Li *et al.*, 2012).

2.5 Imunitní specifita včely medonosné

Včely (*Apis mellifera*) jsou celosvětově jedním z nejrozšířenějších druhů společenského hmyzu. Hrají důležitou roli v opylování rostlin a v produkci medu, vosku, propolisu a dalších včelích produktů. Zdraví včel je v dnešní době velmi diskutovaným tématem. V mnoha zemích dochází k významným ztrátám včelstev, jejich příčiny nejsou doposud spolehlivě objasněny. Pokles počtu včelstev nebo jejich slábnutí je zřejmě ovlivněno řadou patogenů a parazitů včetně bakterií, hub, virů, prvoků nebo roztočů. Vůči řadě z nich nebyla dosud nalezena funkční léčba (Svitáková, 2017).

2.5.1 Sociální imunita

Kolonie sociálního hmyzu mohou být považovány za superorganismus, skupinu jedinců žijících v hnízdě, jejichž kolektivní chování produkuje fenotyp na úrovni kolonie, což zase ovlivňuje chování jedinců v hnízdě (Seeley, 1989). Na úrovni kolonie preferují někteří jedinci chování, které brání a chrání kolonii před patogeny a parazity (Simone *et al.*, 2009). Tato obranná chování v rámci kolonie včelstva zahrnují: hygienické chování a grooming, sběr antimikrobiálních pryskyřic a sekreci jedu (Borba *et al.*, 2015). Život ve skupině má mnoho výhod ve srovnání se soliterním způsobem života. Spolupráce může zvýšit efektivitu v péči o potomstvo, hledání potravy a ochraně před predátory. Život v sociální skupině má také řadu nevýhod: infekční onemocnění se mohou potenciálně šířit snadněji mezi členy skupiny v porovnání s jedinci se soliterním způsobem života (Cremer *et al.*, 2007).

2.5.2 Hygienické chování

Hygienické chování dělnic včely medonosné zahrnuje dvě složky chování, odvíčkování a odstraňování mrtvých plodů. Dělnice mají schopnost rozpoznat nemocný plod, odvíčkovat vosk překrývající pláсты a odstranit infikované larvy nebo kukly. Účinek hygienického chování na šíření infekčního onemocnění je maximalizován, pokud probíhá před sporulací invazivního organismu (Boecking a Spivak, 1999).

2.5.3 Grooming

Grooming umožňují jedincům a skupině včel v kolonii odstraňovat prach a pyl z jejich těl, rozptylovat feromony a odstraňovat parazity. Grooming zahrnuje kousání a lízání částmi úst a pohyby středohrudních nohou. Tykadla jsou opatrně očištěna pomocí předohrudních nohou. Mnoho sebečisticích aktivit (auto-grooming) může být viděno na rostlinách, v letu, během sběru pylu a v úlu. Sociální grooming (allo-grooming) mezi včelami může být pozorován v prostředí úlu (Boecking a Spivak, 1999). Allo-grooming může být vyvolán tancem, který byl poprvé pozorován u *A. mellifera* Haydakem (Haydak, 1945). Včely, které předvádí tento tanec, jsou čištěny jinou včelou za pomoci středohrudních nohou. Grooming je také důležitým mechanismem ochrany včel proti invazi roztočů (Boecking a Spivak, 1999).

2.5.4 Sběr antimikrobiálních pryskyřic

Sběr antimikrobiálních pryskyřic z prostředí a ukládání těchto pryskyřic do stavby hnízda je základní složka sociální imunity. Tyto pryskyřice rostliny vyměšují pro ochranu mladých pupenů před patogeny a býložravci. Jsou složeny primárně z antimikrobiálních látek (např. flavonoidy a monoterpeny), které hrají hlavní ochrannou roli pro přežití rostliny. Včely vkládají tyto rostlinné pryskyřice do hnízda jako formu tmelu, nazývaného propolis (Borba *et al.*, 2015). Když si včely staví hnízdo v dutině stromu, používají propolis pro obalení celé vnitřní vrstvy dutiny stromu a vytvoří tak propolisový obal (Seeley a Morse, 1976). Každopádně včely nestaví přírodní propolisový obal v rámci standardního včelařského zařízení, protože vnitřní stěny dřevěných boxů jsou hladké a nevyvolávají vlastnosti ukládání propolisu. Místo toho vkládají propolis do rozsáhlých trhlin a štěrbin (Borba *et al.*, 2015).

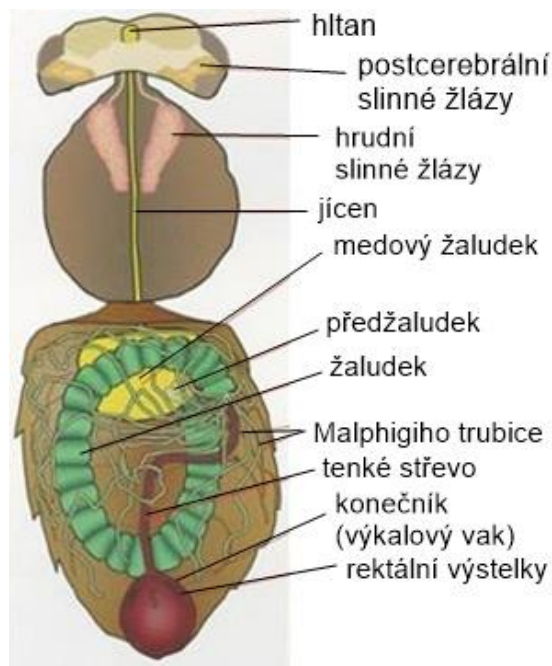
2.5.5 Sekrece jedu

Jedová žláza včel je důležitým zdrojem antimikrobiálních látek (Kuhn-Nentwig, 2003). Včelí jed obsahuje mnoho komplexních látek, jako jsou peptidy (melitin, apamin, secapin, tertiapin, adolapin a degranulační peptid žírných buněk), enzymy (fosfolipasa A2, hyaluronidasa, kyselá fosfomonoesterasa, lysofosfolipasa), aktivní aminy (histamin, dopamin, norepinefrin, serotonin) a další látky, jež mají obsáhlé farmaceutické vlastnosti (Gülmez *et al.*, 2017). Nedávné studie odhalily, že včelí jed uvnitř buněk zvyšuje koncentraci Ca^{2+} a reaktivních forem kyslíku (ROS) a snižuje potenciál mitochondriální membrány (Gülmez *et al.*, 2017).

2.6 Trávicí soustava včely medonosné

Trávicí soustava včely medonosné má dvě hlavní funkce: poskytuje výživovou potřebu samotné včely a je to také prostředek skladování a dočasného transportu nektaru do úlu. Nektar, který je vrácen do úlu, je skladován v medovém žaludku a je tak zabráněno jeho putování dále to trávicího traktu. Pyl obsažený v tomto nektaru může být vypuzen ven a selektivně stráven pro vlastní potřebu včely. Odpadní produkty trávení jsou skladovány ve výkalovém vaku. Včely se nikdy nevyprazdňují v úlu, pouze během výletu z úlu. Takže během zimy, pokud počasí zabraňuje výletu, je výkalový vak plněn stále více a může zabírat více než polovinu místa v zadečku. Včely se následně vyprázdní až během prvního jarního letu.

Hlavní složky trávicího traktu začínají slinnými žlázami umístěnými v hlavě a hrudi, které dodávají enzymy do potravy v ústech. Směs následně putuje hltanem, jícnem, který ústí do zadečku, tam se jícnen rozšiřuje do medového žaludku. Hlavní trávicí orgán je žaludek, který tahá potravu z medového žaludku prostředkem podobným struktuře úst, předžaludkem. Potrava je v žaludku trávena enzymy před vstupem do tenkého střeva. Před spojením žaludku a tenkého střeva se připojují malpighické trubice. Tenké střevo následně ústí do výkalového vaku, kde jsou skladovány výkaly až do doby, kdy jsou vyloučeny anusem (Stell, 2012).



Obrázek 8 Součásti trávicí soustavy včely medonosné (převzato a upraveno z Stell, 2012).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Agarosa (Sigma-Aldrich, USA)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

APS (Sigma-Aldrich, Čína)

Bisakrylamis (MP Biomedicals, USA)

Coomasie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad, USA)

Coomasie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad, USA)

DAF-FM (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)

Diethylentriaminpentaacetát (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika)

Dusitan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)

Formaldehyd (Lachema, Česká republika)

Glycerol (Sigma, Malajsie; Lach-Ner, Česká republika)

Glycin (Sigma-Aldrich, Čína)

HEPES (Sigma, USA)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydroxid draselný (Lachema, Česká republika)

Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Katalasa z hovězích jater (Serva, Německo)

Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)

Lipopolysachyrid (Sigma-Aldrich, Izrael)

Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

NED (Sigma, USA)

Nitro blue tetrazolium chlorid (Sigma, USA)

One-step Lumitein Protein Gel Stain (Biotium, Kanada)

Peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika)

Primární protilátky (Clonestar, Česká republika)

Pyrogallol (Sigma-Aldrich, Velká Británie)

SDS (Applichem, Německo)

SDS-PAGE marker – Ultra Low range Molecular Weight Marker (standard obsahuje: triosafosfát isomerasu z králičího svalu (26.600 Da), myoglobin z koňského srdce (17.000 Da), α -laktalbumin z kravského mléka (14.200 Da), aprotinin z hovězích plic (6.500 Da), hovězí oxidovaný insulinový řetězec B (3.496 Da) a bradykinin (1,060 Da); Sigma-Aldrich, USA)

Sekundární protilátka (anti-králičí IgG značené peroxidasou; Sigma-Aldrich, USA)

SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A (Serva, Německo)

SERVALight EOS Peroxide Solution Reagent B (Serva, Německo)

Sulfanilamid (Sigma-Aldrich, Čína)

Superoxiddismutasa z hovězích erytrocytů (Serva, Německo)

Sušené mléko (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

TEMED (Sigma, Čína)

Tricin (Sigma-Aldrich, USA)

Trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)

TRIS (Sigma-Aldrich, Německo)

Tween- 20 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Přístroje a vybavení

analytické váhy (Sartorius, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo), digitální pH metr InoLab pH level1 (InoLab, Německo), elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), Gel Doc EZ System (Bio-Rad, USA), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), kulový mlýnek FastPrep FP120 (Thermo Savant, USA), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek instruments, USA), mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko), NC membrána (Bio-Rad, Německo), předvážky (KERN, Německo), spektrofotometr UV-VIS (Agilent technologies, USA), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva), třepačka vortex V-1 Plus (Biosan Litva), zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Biologický materiál

Veškerý biologický materiál včely medonosné *Apis mellifera* pochází z Krhové z včelnice Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. Veškeré včely pocházely z klinicky zdravých včelstev a byly odebírány v období července 2017 a března až dubna 2018.

Vzorky včel jsem obdržela od svého vedoucího.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků

Včely byly vybírány náhodným výběrem. Extrakci trávicí soustavy jsem provedla následovně: živou včelu jsem uchytila pomocí pinzety za křídlo nebo nohu, druhou pinzetou jsem ji uchytila opatrně za hrud' a pomocí nůžek odstříhla hlavu. Pinzetou se

zahnutým koncem jsem posledním zadečkovým článkem vytáhla celou trávicí soustavu. Vzorky trávicí soustavy byly ihned po extrakci uchovávány na ledové lázni.

Vzorky pro stanovení aktivity katalasy, superoxiddismutasy, koncentrace NO a proteinů byly připraveny následujícím způsobem. Ihned po vyjmutí trávicích soustav, byly vzorky nejprve promyty v PBS pufru a poté rozděleny do 5 skupin. Každý vzorek obsahoval 5 trávicích soustav. Vzorky v kontrolní skupině (K) byly pouze promyty v PBS pufru. V dalších skupinách byly vzorky promyty v PBS pufru a následně inkubovány při laboratorní teplotě s lipopolysacharidem v koncentraci 0,5 mg/ml a odebírány po 2, 4, 8 a 18 hodinách. Po dokončení inkubace byly všechny vzorky promyty v PBS pufru. Způsoby přípravy dalších vzorků pro další experimenty jsou popsány dále u každého experimentu.

3.2.2 Stanovení proteinů metodou Bradforda

3.2.2.1 Stanovení kalibrační přímk

Stanovení bylo provedeno metodou Bradforda (1976) modifikovanou podle Zora a Selinger (1996) s měřením absorbance při 590 a 450 nm. Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomasie BB G250 v 25 ml ethanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněním roztoku na 100 ml deionizovanou vodou (ddH₂O). Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven zředěním zásobního roztoku CBB s deionizovanou vodou v poměru 1:4. Byl připraven zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg/ml a jeho postupným ředěním byla připravena kalibrační řada BSA o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/ml. Měření bylo provedeno na mikrodestičkách. Do jamek destičky bylo napipetováno 45 µl ddH₂O, 5 µl standardu a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Destička byla jemně protřepána a ponechala se 5 inkubovat při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena proti blanku při 590 nm a při 450 nm v triplikátech. Kalibrační závislost byla vyhodnocena lineární regresí závislosti poměru absorbancí při 590 a 450 nm a koncentrací proteinů.

3.2.2.2 Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích

Měření probíhalo na mikrodestičkách, přičemž do každé jamky bylo pipetováno 5 µl extraktu vzorku, který bylo nutné 10x naředit, 45 µl dd H₂O a 200 µl pracovního

roztoku Bradfordova činidla. Destička byla jemně protřepána a po 5 minutách inkubace byla změřena absorbance při 590 a 450 nm v triplikátech proti blanku.

3.2.2.3 Použité roztoky

Zásobní roztok CBB: 50 mg CBB G250 bylo rozpuštěno v 25 ml ethanolu a 50 ml 85% H_3PO_4 a doplněno na 100 ml dd H_2O .

Zásobní roztok BSA: 0,0108 g BSA bylo rozpuštěno v 5 ml dd H_2O

3.2.3 Stanovení aktivity katalasy (CAT)

Měření bylo provedeno podle základního protokolu Aebi (1984) s modifikací podle BP Svitáková (2017). Principem této metody je měření úbytku peroxidu vodíku jako pokles absorbance při 240 nm.

3.2.3.1 Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny extrakcí trávicí soustavy včel. Ke vzorkům (5 ks střev) bylo přidáno 100 μl extrakčního a pufru a homogenizační kuličky (cca 10 ks). Extrakční pufr obsahoval 0,1M K^+ -fosfátový pufr (pH 7,0), 1mM EDTA. Vzorky byly homogenizovány 10 s v kulovém mlýnku. Poté bylo přidáno dalších 100 μl 0,1M pufru a vzorky byly opět homogenizovány. Mikrozkuhavky byly centrifugovány při 16 900 x g při teplotě 5 °C po dobu 10 minut. V supernatantu byla změřena aktivita CAT.

3.2.3.2 Měření aktivity CAT

Měření proběhlo na mikrodestičkách, kde se sledoval úbytek peroxidu vodíku jako pokles absorbance při 240 nm. Do jamky bylo pipetováno 5 μl extraktu, 225 μl 0,1M K^+ - fosfátového pufru a start reakce byl zahájen 20 μl čerstvě připraveného 150mM H_2O_2 . Byl měřen pokles absorbance při 240 nm v triplikátech po dobu 1 min při 25 °C.

3.2.3.3 Použité roztoky

0,1M K^+ -fosfátový pufr (pH 7,0): 2,73 g KH_2PO_4 a 5,23 g K_2HPO_4 bylo rozpuštěno ve 400 ml dd H_2O , upraveno pH na hodnotu 7,0 a doplněno na objem 500 ml

1mM EDTA: 30 mg bylo rozpuštěno ve 100 ml dd H_2O

150mM H_2O_2 : bylo smícháno 75 μl 30% H_2O_2 a 4,925 ml dd H_2O

3.2.4 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)

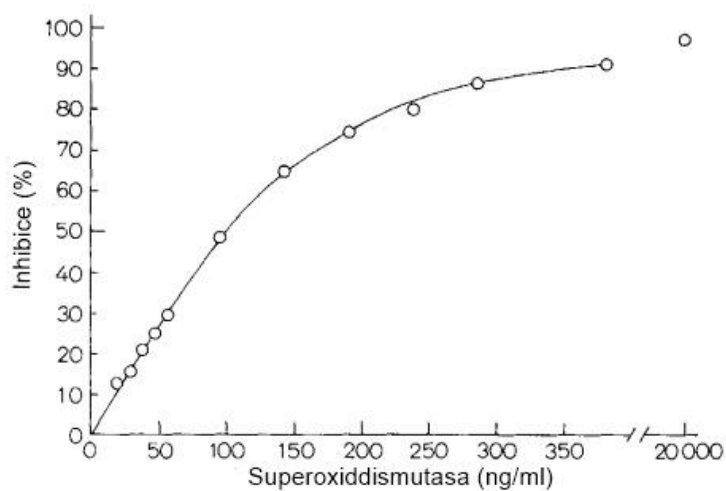
Stanovení bylo provedeno podle Marklund a Marklund (1974), kde je měřena inhibice autooxidace pyrogalolu superoxiddismutasou.

3.2.4.1 Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny obdobným způsobem jako pro aktivitu CAT. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l 20mM TRIS-HCl pufru (pH 8,0), který obsahoval navíc 1mM diethylenetriaminpentaacetát (DPTA), dále několik skleněných kuliček a vzorky byly homogenizovány 10 s v kulovém mlýnku. Následně bylo přidáno dalších 100 μ l pufru a opět homogenizováno. Vzorky byly zcentrifugovány 5 min při 16 900 x g, supernatant byl odebrán do čistých zkumavek a následně v něm byla stanovena aktivita SOD.

3.2.4.2 Měření aktivity SOD

Měření probíhalo na mikrodestičkách, kdy do každé jamky bylo pipetováno 220 μ l pufru TRIS-HCl (pH 8,0), 20 μ l 10x ředěného extraktu TS a reakce byla zahájena 10 μ l 6mM pyrogalolu. Byl měřen pokles absorbance při 420 nm v triplicátech po dobu 5 min při 25 °C.



Obrázek 9 Graf inhbice autooxidace pyrogalolu superoxiddismutasou (převzato a upraveno z Marklund a Marklund (1974)).

3.2.4.3 Použité roztoky

20mM TRIS-HCl pufr (pH 8,0): 0,6 g TRIS bylo rozpuštěno ve 150 ml dd H₂O, upraveno pH a doplněno ddH₂O na objem 250 ml.

10 mM HCl: 82 µl konc. HCl bylo smícháno s 50 ml dd H₂O a doplněno na objem 100 ml

6 mM pyrogallol v 10mM HCl: 7,6 mg pyrogallolu na 10 ml 10mM HCl

3.2.5 Mikroskopická detekce produkce peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu

Detekce byla provedena na základě reakcí, kde peroxid vodíku oxiduje diaminobenzidin (DAB) za vzniku hnědé sraženiny a superoxidový anionradikál redukuje tetrazoliovou modř (NBT, nitro blue tetrazolium chlorid) na modrý nerozpustný formazan. Čerstvé vzorky TS z 12 dnů starých včel, které byly krmeny sacharosou, byly rozděleny do 5 zkumavek po 5 kusech a promyty v PBS pufru. Ke zkumavce K (kontrola) byl přidán 1 ml PBS pufru a tyto TS sloužily jako negativní kontrola barvení. Vzorky ve zkumavce, označená jako P2, byly inkubovány s 1 ml 0,5% roztoku DAB v PBS pufru a vzorky ve zkumavce, označená jako P3, byly inkubovány s 0,75 ml 0,5% DAB a 0,25 ml roztoku lipopolysachyridu (LPS) o koncentraci 0,5 mg/ml. Vzorky, které sloužily pro detekci superoxidového anionradikálu, byly inkubovány s 1 ml 2mM NBT v PBS pufru (S2) a s 0,75 ml 2mM NBT a 0,25 ml roztoku LPS o koncentraci 0,5 mg/ml (Tab. 2). Zkumavky byly inkubovány přes noc.

Tabulka 2 Rozdělení vzorků pro detekci peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu.

Peroxid	Superoxidový anionradikál
K – kontrola, pouze PBS pufr	
P2– 0,5% DAB	S2– 2mM NBT
P3– 0,5% DAB + LPS	S3– 2mM NBT + LPS

Po inkubaci byly všechny vzorky promyty v PBS pufru. Poté byly vzorky inkubovány ve fixačním roztoku, a nakonec 2x propláchnuty v 70% ethanolu. Část vzorků byla použita pro pozorování celé TS pod mikroskopem. Vybrané vzorky střev byly použity pro přípravu příčných řezů. Tato střeva byla zalita 3,5% roztokem agarosy. Po ztuhnutí byly jednotlivé vzorky nařezány na mikrotonu na řezy o tloušťce 50 μm a pozorovány pod mikroskopem.

3.2.5.1 Použité roztoky pro detekci peroxidu a superoxidového anionradikálu

PBS pufr (pH= 7,4): 10x koncentrovaný; 40,1631 g NaCl, 1,0021 g KCl, 7,2005 g Na_2HPO_4 , 1,2045 g KH_2PO_4 v 500 ml H_2O . Před použitím byl pufr 10x naředěn.

0,5% roztok DAB: 25,3 mg DAB v 5 ml PBS pufru

2mM roztok NBT: 8,1774 mg NBT v PBS pufru

Roztok LPS: 0,52 mg LPS v 1000 μl PBS pufru

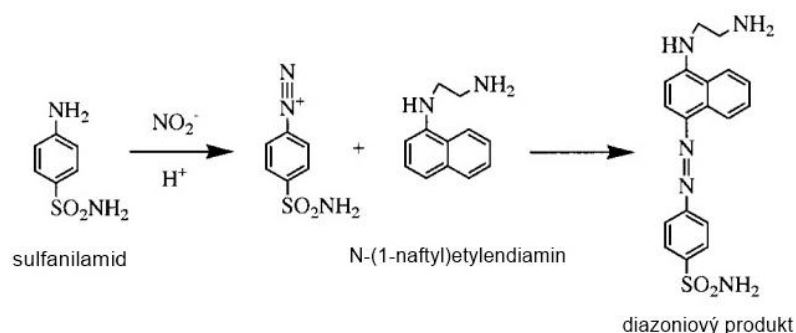
Fixační roztok: 5% formaldehyd, 5% kyselina octová, 70% ethanol ve 100 ml. Bylo smícháno 13,51 ml 37% formaldehydu, 5 ml 99,99% kyseliny octové, 72,92 ml 96% ethanolu a doplněno na objem 100 ml 8,57 ml dd H_2O .

3,5% roztok agarosy: 7,0014 g agarosy ve 200 ml dd H_2O

3.2.6 Stanovení NO_2^- Griessovou metodou

Stanovení bylo provedeno podle Miranda *et al.* (2001). Principem stanovení je tvorba diazoniové soli v kyselém prostředí a její kopulace s N-(1-naftyl)etylendiaminem (NED) za tvorby azobarviva. Měření se provádí při 540 nm.

Přestože může být koncentrace NO měřena mnoha přímými i nepřímými metodami, krátký poločas života a jeho nízké koncentrace *in vivo* snižují praktičnost těchto metod pro biologické vzorky. Obtížná kvantifikace NO může být eliminována měřením jeho stabilních metabolitů, zejména NO_2^- a NO_3^- . NO_2^- je jediný stabilní konečný produkt autooxidace NO ve vodném roztoku v nepřítomnosti hemoproteinů (Miranda *et al.*, 2001). Pro stanovení byl použit 1% sulfanilamid namísto 2%.



Obrázek 10 Schéma principu stanovení NO_2^- Griessovou metodou (převzato a upraveno z Miranda *et al.*, 2001).

3.2.6.1 Stanovení kalibrační přímky

Měření probíhalo na mikrodestičkách. Kalibrační řada byla připravena ředěním 1 mM NaNO_2 na koncentrace 10, 20, 30, 40, 50, 80 a 100 $\mu\text{mol/l}$. Do jamky bylo pipetováno 50 μl standardu, 50 μl ddH₂O a 100 μl čerstvě připraveného Griessova činidla, které bylo připraveno smícháním činidel Griess A a B v poměru 1:1. Destička byla inkubovaná 1 hodinu ve tmě a poté byla změřena absorbance při 540 nm proti blanku.

3.2.6.2 Měření koncentrace NO_2^- ve vzorcích

Stanovení koncentrace NO_2^- bylo provedeno ve vzorcích pro stanovení aktivity CAT a SOD. Měření probíhalo na mikrodestičkách, do jamek bylo pipetováno 50 μl vzorku, 50 μl ddH₂O a 100 μl Griessova činidla. Destička byla inkubována 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě a poté byla změřena absorbance při 540 nm proti blanku.

3.2.6.3 Roztoky použité pro stanovení NO_2^-

Griess A: 1% sulfanilamid v 5% H_3PO_4 ; 1,0021 g sulfanilamidu ve 100 ml 5% H_3PO_4 (5,9 ml 85% H_3PO_4 a 94,1 ml ddH₂O)

Griess B: 0,1% NED v ddH₂O: 0,1014 g NED rozpuštěno ve 100 ml ddH₂O

1mM NaNO_2 : 0,69 mg v 10 ml ddH₂O

3.2.7 Mikroskopická detekce NO pomocí DAF-FM DA

DAF-FM diacetát je fluorescenční sonda, která se používá k detekci a kvantifikaci nízkých vnitrobuněčných koncentrací NO. Přirozeně nefluoreskuje, ve formě diacetátu prochází řes buněčné membrány a v cytosolu po odštěpení esterasy vzniklý DAF-FM reaguje s NO_2^+ , produktem oxidace NO, za vzniku fluorescentního benzotriazolu.

Tabulka 3 Rozdělení vzorků pro detekci oxidu dusnatého

Označení vzorku	Inkubace
K	PBS pufr
D	10 μ M DAF-FM DA
D+L	10 μ M DAF-FM DA + LPS (0,5 mg/ml)

Čerstvé vzorky TS včel byly rozděleny do 3 zkumavek po 5 kusech a opláchnuty PBS pufrém. Následně byly tyto vzorky inkubovány s 10 μ M DAF-FM DA tak, že zkumavka K (kontrola) byla inkubována pouze v 1 ml PBS pufru, zkumavka D byla inkubována s 1 ml 10 μ M DAF-FM DA a zkumavka D+L byla inkubována s 750 μ l 10 μ M DAF-FM a 250 μ l LPS (0,5 mg/ml) (Tab. 3). Vzorky byly inkubovány 30 minut a následně promyty v PBS pufru. Vybrané vzorky byly pozorovány pod mikroskopem v modrém fluorescenčním světle hranou UMWB2, excitační vlnová délka je 495 nm, emisní 515 nm.

Ostatní vzorky byly použity pro přípravu příčných řezů tak, že byly vzorky zality 3,5% roztokem agarosy a po ztuhnutí byly připraveny řezy o tloušťce 50 μ m pomocí mikrotonu. Tyto řezy byly taktéž pozorovány v modrém fluorescenčním světle hranou UMWB2, excitační vlnová délka je 495 nm, emisní 515 nm.

3.2.7.1 Roztoky použité pro detekci NO

PBS pufr (pH= 7,4): 10x koncentrovaný; 40,1631 g NaCl, 1,0021 g KCl, 7,2005 g Na₂HPO₄, 1,2045 g KH₂PO₄ v 500 ml H₂O. Před použitím byl pufr 10x naředěn.

Roztok LPS: 0,25 mg LPS v 500 μ l PBS pufru

10 μ M DAF-FM: 1000x ředěný zásobní 10mM DAF-FM v DMSO; 1 μ l 10mM DAF-FM + 999 μ l 100mM HEPES pufru

100mM HEPES pufr (pH= 7,5): 11,92 g HEPES v 500 ml ddH₂O

3,5% roztok agarosy: 7,0014 g agarosy ve 200 ml ddH₂O

3.2.8 Tricinová elektroforéza pro analýzu malých peptidů 1-5 kDa

Elektroforéza byla provedena podle základního protokolu Schägger (2006).

3.2.8.1 Příprava vzorků

Byly odebrány vzorky trávicí soustavy včel, kterým byly odstraněny výkalové váčky. Všechny vzorky byly odváženy. Následně byly vzorky homogenizovány v 0,1% TFA, kdy se na 1 g vzorku přidaly 2 ml TFA. Poté byly vzorky centrifugovány 5 min při 16 900 x g. Supernatant byl následně odpipetován do čistých zkumavek, ty byly nakonec zahřáty 10 min na 80 °C. Vzorky byly uchovávány v mrazáku při -29 °C.

3.2.8.2 Příprava pufrů a zásobních roztoků

Katodový pufr (10x)

Obsahuje 1M TRIS, 1M Tricine a 1% SDS, pH= 8,25.

Pufr byl připraven rozpuštěním 60,5 g TRIS, 89,5 g Tricin a 5 g SDS v 500 ml ddH₂O. pH nebylo třeba upravovat. Před použitím byl pufr naředěn 10x.

Anodový pufr (10x)

Obsahuje 1M TRIS, pH= 8,9.

Pufr byl připraven rozpuštěním 121 g TRIS v 500 ml ddH₂O, pH bylo upraveno konc. HCl na 8,9. Před použitím byl pufr naředěn 10x.

Gelový pufr (3x)

Obsahuje 3M TRIS, 0,3% SDS, pH= 8,45.

Pufr byl připraven rozpuštěním 182 g TRIS v 300 ml ddH₂O, posléze bylo pH upraveno pomocí konc. HCl na hodnotu 8,45. Pufr byl doplněn ddH₂O na objem 500 ml a nakonec v něm byl rozpuštěno 1,54 g SDS.

Zásobní roztok AB-6

Monomer pro dělicí gel, který obsahuje 49,5% akrylamid a 6% bisakrylamid.

Roztok byl připraven rozpuštěním 46,5 g akrylamidu a 3 g bisakrylamidu ve 100 ml ddH₂O. Roztok byl uchován ve tmě v lednici.

Zásobní roztok AB-3

Monomer pro zaostřovací a spacer gel, který obsahuje 49,5% akrylamid a 3% bisakrylamid.

Roztok byl připraven rozpuštěním 46,5 g akrylamidu a 1,5 g bisakrylamidu ve 100 ml ddH₂O. Roztok byl uchováván ve tmě v lednici.

Vzorkovací pufr- neredukující s glycerolem

Vzorkovací pufr obsahuje 12% SDS, 30% glycerol a 0,05% CBB G250.

Pufr byl připraven rozpuštěním 1,2 g SDS, 3 g (2,24 ml) glycerolu a 5 mg CBB v 10 ml 1M Trisu. Pufr byl rozdělen po 0,5 ml do alikvotů a uchováván v mrazáku při - 29 °C.

Vzorkovací pufr- redukující s glycerolem

Tento pufr obsahuje stejné množství látek jako neredukující vzorkovací pufr, jen je přidán mekraptoethanol na konečnou 6% koncentraci (0,539 ml). Pufr byl rozdělen po 0,5 ml do alikvotů a uchováván v mrazáku při -29 °C.

3.2.8.3 Příprava gelů

Dělicí gel- 16% s glycerolem

Bylo smícháno 10 ml gelového pufru (3x), 6,1 ml AB-6, 4 g glycerolu (3,2 ml) a 10,7 ml ddH₂O. Polymerace byla zahájena přidáním 20 µl TEMEDu a 150 µl čerstvě připraveného 10% APS. Takto připravený gel byl nanesen do stojánku cca 2 cm pod okraj hřebínku, překryt několika kapkami vody a nechal se polymerovat asi 30 min.

Zaostřovací gel- 4%

Bylo smícháno 1 ml AB-3, 3 ml gelového pufru a 8,5 ml ddH₂O. Polymerace byla zahájena přidáním 20 µl TEMEDu a 150 µl čerstvě připraveného 10% APS. Tento gel byl nanesen na ztuhlý dělicí gel.

3.2.8.4 Provedení elektroforézy

K 75 µl vzorku bylo přidáno 25 µl redukujícího vzorkovacího pufru a takto byly vzorky zahřáty 10 min při 37 °C. Gely ve stojánku byly umístěny do ELFO aparatury. Katodový pufr byl nalit do vnitřního prostoru mezi sklíčka a anodový do vnějšího prostoru. Do jamek bylo nanesen 3 µl standardu peptidů nebo 2,5; 5; 10 µl vzorku extraktu TS. Úvodní napětí bylo nastaveno na 30 V a po zajetí vzorků do dělicího gelu na 90 V.

3.2.9 Detekce proteinů na gelech

3.2.9.1 Detekce činidlem Coomasie Brilliant Blue

Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a ponořeny na 30-60 min do fixačního roztoku. Následně byly gely obarveny pomocí činidla CBB R250. Po uplynutí doby barvení byly gely několikrát odbarveny odbarvovacím roztokem.

3.2.9.2 Detekce Lumitein Protein Gel Stain

Lumitein je komerční preparát pro fluorescenční detekci celkových proteinů v elektroforetických gelech. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a ponořeny na 30-60 min do fixačního roztoku. Následně byly gely inkubovány 30 min s lumiteinem a proteiny byly detekovány na přístroji C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor) pomocí programu Image Studio.

3.2.9.3 Roztoky použité pro detekci proteinů

Fixační roztok: 50% methanol, 10% kyselina octová

Barvicí roztok CBB R250: 0,1% CBB R250, 45% methanol, 15% kyselina octová

Odbarvovací roztok: 10% kyselina octová, 40% methanol

3.2.10 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů defensinu a abaecinu

Po elektroforéze byl proveden přenos proteinů z gelu na blotovací membránu v uspořádání tank-blotting. Tento proces zahrnuje přenos proteinů z gelu na povrch NC nebo PDFV membrány o velikosti pórů 0,45 μm (BioRad, Německo). Plocha použité NC membrány o velikosti odpovídající velikosti použitého gelu byla změřena kvůli nastavení velikost přenosového proudu (viz dále). Membrána, gel, filtrační papíry a blotovací houbičky byly ponořeny na 10 min do blotovacího pufru, poté byly seřazeny do blotovací kazety, která byla umístěna do blotovací komůrky (MiniProtean, BioRad, Německo). Do blotovací komůrky byl nalit blotovací pufr, následně byla komůrka umístěna do lednice a byl nastaven proud 0,8 mA/cm² dle velikosti membrány. Blotování probíhalo přes noc.

Po blotování byla kazeta vyjmuta z komůrky a rozložena. Vždy jedna membrána sloužila jako kontrola úspěšnosti přenosu proteinů a byla barvena 30 min v roztoku

Ponceau S. Poté byla membrána opláchnuta vodou. Druhá membrána vždy sloužila pro imunochemickou detekci proteinů na membráně. Membrána byla inkubována 2 hodiny v 1% roztoku sušeného mléka v TBS, následovalo 2x promytí roztokem Tweenu v TBS po dobu 10 min. Dále byla membrána inkubována s primární protilátkou proti defensinu nebo abaecinu po dobu 2 h, která byla ředěna v poměru 1:500. Následovalo opět promytí stejně jako po inkubaci v roztoku mléka. Membrána byla dále inkubována po dobu 2 h se sekundární protilátkou proti králičím IgG značenou peroxidasou, která byla ředěna v poměru 1:10 000 v 1% mléku v TBS. Následovalo promytí stejně jako po inkubaci s primární protilátkou. Nakonec byla membrána inkubována s reagenty SERVALight EOS Luminol Solution Reagent A a SERVALight EOS Peroxide Solution Reagent B, které byly smíchány v poměru 1:1. Peptidy byly detekovány na přístroji C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor) pomocí programu Image Studio.

3.2.10.1 Použité roztoky pro Western blotting a detekci defensinu a abaecinu

Blotovací pufr: 0,025M Tris-HCl, 0,192M glycin, 20% metanol, pH 8,3; 3,025 g TRIS, 14,41 g glycinu ve 200 ml dd H₂O, přidáme 200 ml metanolu, zkontrolovat pH a doplnit ddH₂O do objemu 1 litr.

Blokovací roztoky: 1% sušené mléko v TBS; 0,25 g sušeného mléka ve 25 ml TBS

TBS pufr: 20mM Tris, 500 mM chlorid sodný, pH 7,5; 4,84 g TRIS, 58,44 g NaCl rozpustit v 1 l H₂O, upravit pH na 7,5 a doplnit vodou na objem 2 l.

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

3.2.11 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica 13 64-bit. Veškeré výsledky byly vyhodnocovány na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

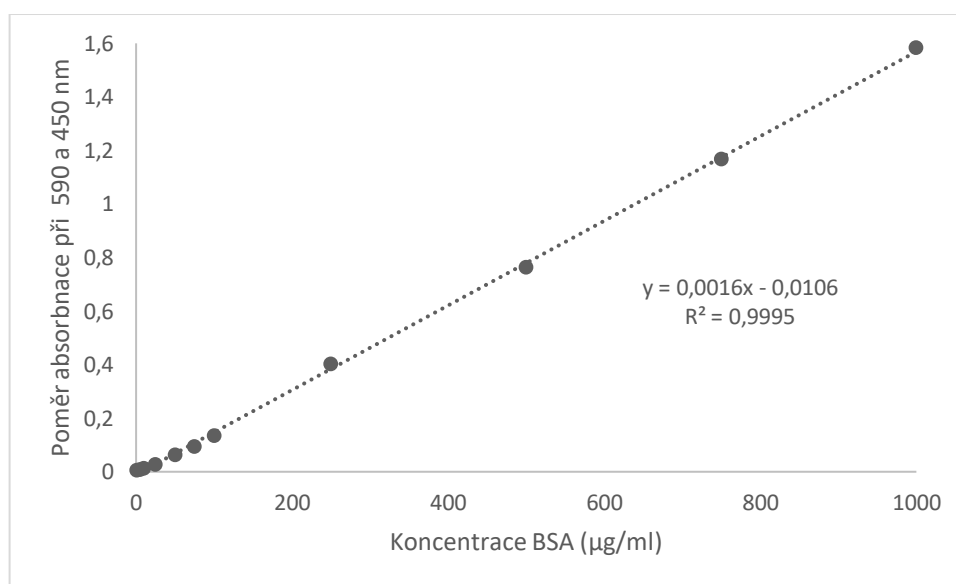
4 Výsledky a diskuze

4.1 Kalibrace metody Bradforda pro výpočet koncentrace proteinů

Byly připraveny standardy hovězího sérového albuminu o koncentracích 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ byla měřena absorbance při 590 a 450 nm v triplikátech proti blanku. Závislost hodnoty poměru absorbancí při 590 a 450 nm po odečtení hodnoty blanku na koncentraci standardu proteinu byla vyhodnocena lineární regresí v programu Excel 2016 (obr. 11).

Koncentrace proteinů ve vzorcích TS byla vypočtena ze získané rovnice kalibrační přímky $y=0,0016x - 0,0106$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9995$.

Linearizace Bradfordovy metody podle Zora a Selinger (1996) s poměrem absorbancí 590/450 dává spolehlivější výsledky a je citlivější než běžná metoda podle Bradforda pouze při 590 nm.

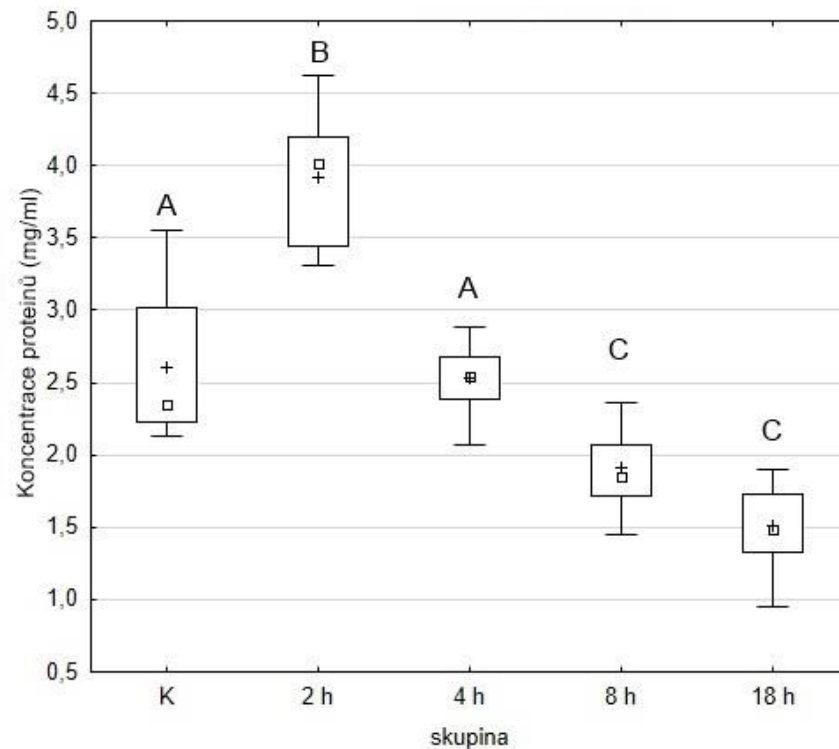


Obrázek 11 Kalibrační graf závislosti absorbnace 590/450 na koncentraci BSA. Rovnice přímky vychází $y = 0,0016x - 0,0106$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9995$.

4.2 Stanovení koncentrace proteinů v extraktech vzorků trávicí soustavy včel

Koncentrace proteinů v extraktech vzorků včelích TS byla vypočtena s použitím stanovené rovnice kalibrační přímky $y = 0,0016x - 0,0106$. Proteiny byly stanoveny ve vzorcích bez inkubace (kontrola) a s inkubací s LPS po 2, 4, 8 a 18 hodinách v triplikátech. Veškeré vzorky bylo potřeba 10x naředit. Hodnoty vypočtených koncentrací proteinů byly porovnány statistickou analýzou metodou jednocestné ANOVA (ANalysis Of Variance-analýza rozptylu), analýzy statistické významnosti odlišnosti hodnot jednotlivých skupin vzorků byla provedena post-hoc analýzou Tukeyovou metodou mnohonásobného porovnávání.

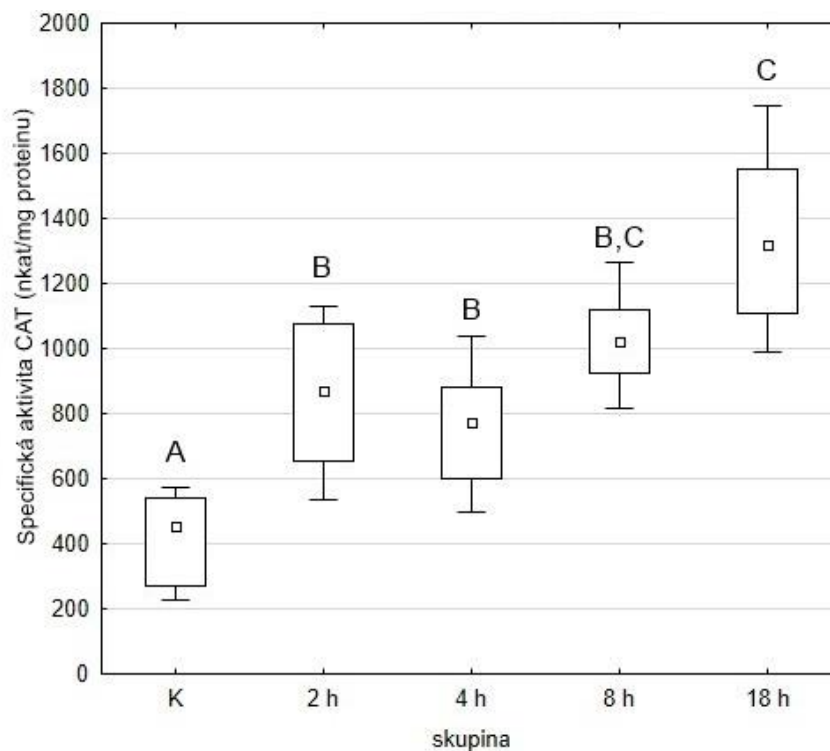
U vzorků kontrolní skupiny se koncentrace proteinů pohybovala v rozmezí od 2,2 do 3,5 mg/ml, po dvou hodinách inkubace TS s LPS tato koncentrace stoupla na hodnoty 3,3 až 4,6 mg/ml. Po 4 hodinách inkubace se koncentrace proteinů pohybovala od 2,1 až 2,9 mg/ml, po 8 hodinách od 1,8 do 2,4 mg/ml a po 18 hodinách inkubace od 1 do 1,9 mg/ml (Obr. 12). Pozorované vyšší hodnoty koncentrace proteinů po 2 hodinách inkubace s LPS mohou souviset se zvýšenou syntézou proteinů a peptidů v rané fázi imunitní reakce, jako například antimikrobiálních peptidů nebo enzymů účastnících se imunitní odezvy organismu. Následně je pozorován trend postupně se snižující koncentrace proteinů. To může být dáno postupnou degradací proteinů při inkubaci působením proteas.



Obrázek 12 Koncentrace proteinů v extraktech vzorků trávicích soustav včel po různé době inkubace s LPS. Statistické rozdíly jsou vyznačeny písmeny nad grafy, přičemž shodná písmena ukazují, že ve skupinách není statisticky významný rozdíl, tedy $p > 0,05$.

4.3 Stanovení specifické aktivity katalasy

Specifická aktivita katalasy (CAT) byla stanovena ve vzorcích bez a s inkubací s LPS po 2, 4, 8 a 18 hodinách. Každý vzorek obsahoval 5 ks trávicích soustav. Stanovení specifické aktivity CAT bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 240 nm, kdy se měřila změna absorbance v extraktech vzorků trávicích soustav včel po dobu 60 s. Měření probíhalo na mikrodestičkách, kde bylo do jamky pipetováno 5 μ l extraktu, 225 μ l 0,1M K^+ - fosfátového pufru a reakce byla zahájena přidáním 20 μ l čerstvě připraveného 150mM H_2O_2 . Vzorky bylo potřeba 10x naředit, aby pokles absorbance při 240 nm byl lineární. Ze zjištěných hodnot aktivit a naměřených hodnot koncentrace protein v extraktech byly vypočítány hodnoty specifické aktivity CAT a výsledky byly analyzovány metodou jednocestné ANOVA, post-hoc test byl proveden Tukeyovou metodou mnohonásobného porovnávání.



Obrázek 13 Specifická aktivita CAT v extraktech vzorků trávicích soustav včel s různou dobou inkubace s lipopolysacharidem. Statistické rozdíly jsou popsány písmeny nad grafy, přičemž shodná písmena ukazují, že ve skupinách není statisticky významný rozdíl, tedy $p > 0,05$.

Specifická aktivita v kontrolních vzorcích se pohybovala v rozmezí od 227 do 574 nkat/mg, po 2 hodinách inkubace od 555 do 1130 nkat/mg. Po 4 hodinách inkubace s LPS vykazovala aktivita CAT hodnoty 499 až 1038 nkat/mg. Po 8 hodinách inkubace se aktivita CAT opět zvýšila na hodnoty 816 až 1267 nkat/mg a po 18 hodinách inkubace byla její aktivita vůbec nejvyšší, vykazovala asi 3x vyšší aktivitu oproti kontrolním vzorkům, pohybovala se v rozmezí od 814 do 1746 nkat/mg (Obr. 13).

Z grafu je patrné, že aktivita CAT se s rostoucí dobou inkubace s LPS zvyšuje, což naznačuje, že se zvyšuje také koncentrace H_2O_2 , jakožto substrátu pro katalasu. Epiteliální buňky reagují na přítomnost LPS zvýšenou produkcí H_2O_2 , který má ničivé účinky pro řadu patogenů, ale také pro hostitele a u hostitele tím vzniká oxidační stres. Katalasa jakožto hlavní antioxidační enzym dokáže tento stres eliminovat rozkladem peroxidu vodíku na vodu a kyslík.

Zhang *et al.* (2015) měřili koncentraci peroxidu vodíku ve střevech bource morušového (*Bombyx mori*) po požití stravy s gramnegativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa* v různých časových intervalech. Zjistili, že tato koncentrace je největší po

8 a 16 hodinách po požití potravy. Měřili také relativní expresi CAT, přičemž tato exprese byla největší po 8 hodinách po požití potravy.

Weirich *et al.* (2002) stanovovali aktivitu CAT v různých částech těla včely v různých kastách a zjistili, že tato aktivita je nejvyšší v žaludcích oplozených matek a dělnic, a ve spermatu trubců. Tuto aktivitu stanovovali také metodou podle Aebi (1984), ale tyto včely a trubci nebyli vystaveni bakteriální infekci.

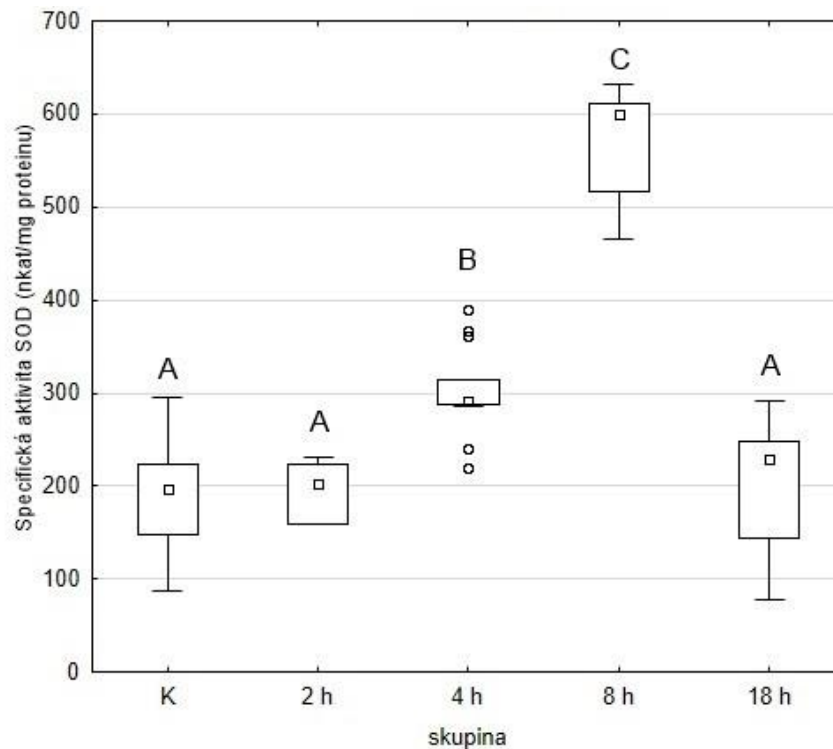
Nikolič *et al.* (2015) publikovali článek, kde studovali vliv prostředí na aktivitu antioxidantních enzymů. Aktivitu CAT stanovovali podle protokolu Aebi (1984) a zjistili, že aktivita CAT je nejvyšší u včel, které se pohybují v městském prostředí, jelikož jsou tyto včely stresovány organickými látkami znečišťující ovzduší.

Tato zjištění jsou v souladu s výsledky mého experimentu, kdy ve vzorcích s dobou vystavení LPS vzrůstá specifická aktivita CAT.

4.4 Stanovení specifické aktivity superoxidodismutasy

Specifická aktivita SOD byla stanovena podle základního protokolu Marklund a Marklund (1974), kde je měřeno snížení rychlosti autooxidace pyrogallolu superoxidem účinkem superoxidodismutasy při vlnové délce 420 nm po dobu 5 min při 25 °C proti blanku. Blank obsahoval pouze pyrogallol a pufr. Měření probíhalo na mikrodestičkách, do každé jamky bylo pipetováno 20 µl extraktu TS, 220 µl pufru TRIS-HCl (pH 8,0) a reakce byla zahájena přidávkem 10 µl 6mM pyrogallolu. Měření probíhalo u extraktů vzorků včelích trávicích soustav, které byly jako v předchozím případě inkubovány s LPS různou dobu. Pro měření bylo potřeba vzorky 10x naředit. Aktivita SOD byla stanovena podle výpočtu, kdy za jednotku aktivity SOD byla brána aktivita způsobující 50% snížení rychlosti autooxidace pyrogallolu. Hodnoty vypočtených specifických aktivit byly porovnány statistickou analýzou metodou jednocestné ANOVA (ANalysis Of Variance- analýza rozptylu), analýzy statistické významnosti odlišnosti hodnot jednotlivých skupin vzorků byla provedena post-hoc analýzou Tukeyovou metodou mnohonásobného porovnávání.

Aktivita SOD se postupně zvyšovala od 4 hodin inkubace s LPS, kdy její aktivita dosahovala hodnot 219 až 390 nkat/mg. Při 8 hodinách byla její aktivita nejvyšší, v rozmezí 456 až 632 nkat/mg. Aktivita SOD u vzorků, které byly inkubovány s LPS 18 hodin, naopak poklesla na úroveň hodnot aktivit kontrolních vzorků (Obr. 14).



Obrázek 14 Specifická aktivita SOD v extraktech vzorků trávicích soustav včel s různou dobou inkubace s lipopolysacharidem. Statistické rozdíly jsou popsány písmeny nad grafy, přičemž shodná písmena ukazují, že ve skupinách není statisticky významný rozdíl, tedy $p > 0,05$.

Weirich *et al.* (2002) stanovovali aktivitu SOD v různých tkáních a kastách, ovšem jinou metodou podle Paoletti *et al.* (1986) a Paoletti a Mocali (1990) s několika modifikacemi. Jednotka aktivity SOD je definována jako množství enzymu způsobující 50% inhibici rychlosti oxidace NADH řízené superoxidem (McCord a Fridovich, 1969). Každé stanovení sestávalo ze tří testů probíhajících při různých koncentracích enzymu a množství enzymatického přípravku (μg ekvivalentů čerstvé hmotnosti) požadované pro 50% inhibici bylo vypočteno pomocí lineární regrese semilog (Paoletti *et al.*, 1986; Paoletti and Mocali, 1990). Podle jejich výsledků je nejvyšší aktivita SOD ve svalech oplozených matek, nižší aktivita byla naměřena v hemolymfě všech kast a jen o pár jednotek nižší byla aktivita SOD naměřena v žaludku dělnic.

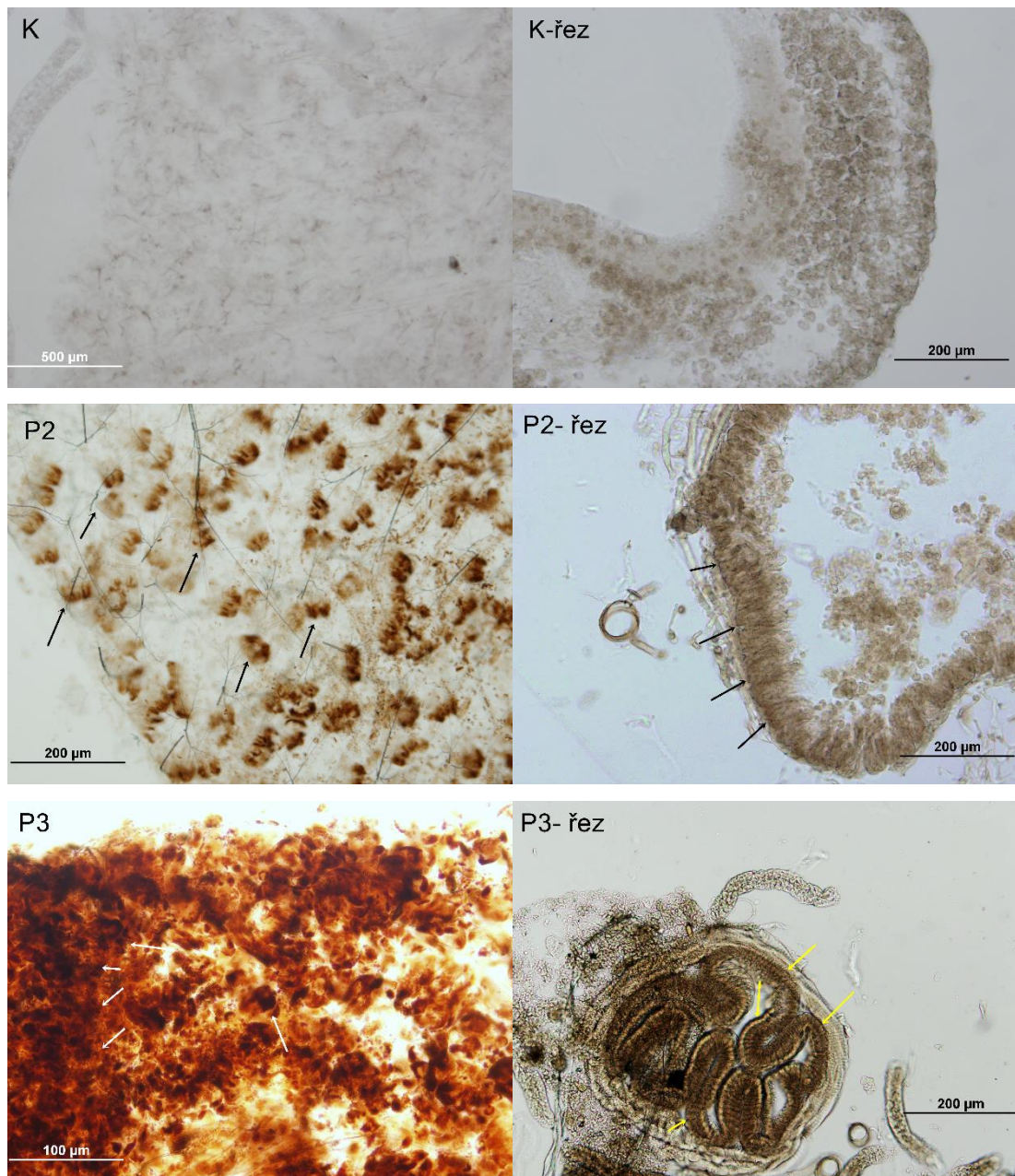
Nikolič *et al.* (2015) stanovovali aktivitu SOD u včel v různých životních prostředích, na venkově, v městech a v průmyslových zónách. Tuto aktivitu stanovovali podle protokolu McCord and Fridovich (1968), kde je měřena inhibice produkce superoxidového anionradikálu v xantin-xantinoxidasové reakci. Jejich výsledkem bylo, že nejvyšší aktivita SOD byla naměřena u včel, které se nacházely

v průmyslových zónách a v městech, což by mohl být výsledek zvýšené produkce $O_2^{\cdot-}$ kvůli znečištěnému prostředí. Toto prostředí tedy u včel způsobuje oxidační stres.

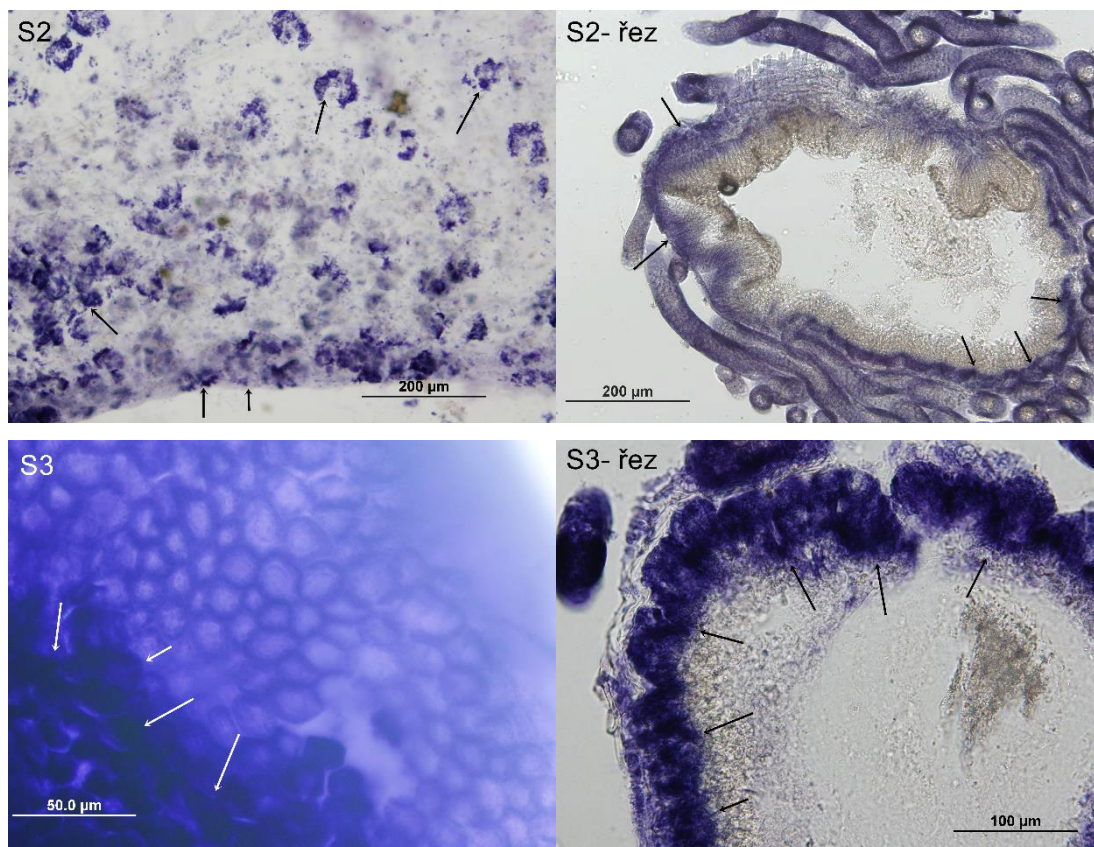
Je známo, že superoxidový anionradikál je obdobně jako peroxid molekula zapojená do imunitní odezvy organismu na bakteriální infekci. NADPH-oxidasa, která se nachází na apikální membráně enterocytů produkuje tyto ROS jako imunitní odezvu na přítomnost patogenu. Tyto výsledky potvrzují, že při bakteriální infekci se v epiteliálních buňkách produkuje větší množství superoxidového anionradikálu, jakožto odpověď na bakteriální infekci neb vystavení imunitního podnětu jako je bakteriální LPS. Zvýšená hladina ROS, má ničivé účinky pro tyto bakterie, při nekontrolované nadprodukcí těchto reaktivních látek bohužel i pro samotného hostitele, který se tomuto oxidačnímu stresu brání. Jako ochrana proti oxidačnímu stresu je aktivita SOD vyšší už po 4 hodinách inkubace s LPS, nejvyšší tedy po 8 hodinách inkubace. Po 18 hodinách se její specifická aktivita vyrovnala aktivitě kontrolních vzorků, nejspíše kvůli nižší produkci $O_2^{\cdot-}$ a produkce peroxidu je tím zřejmě možná časově posunutá i do pozdější fáze imunitní odezvy.

4.5 Mikroskopická detekce peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu

Detekce byla provedena na základě reakcí, kde peroxid vodíku oxiduje diaminobenzidín (DAB) za vzniku hnědé sraženiny a superoxidový anionradikál redukuje tetrazoliovou modř (NBT) na fialovomodrý formazan. Čerstvé vzorky TS byly rozděleny do 5 zkumavek podle skupiny po 5 kusech. Kontrolní vzorek byl inkubován pouze s PBS pufrem, 2 zkumavky byly inkubovány pouze s činidly a k dalším dvěma byl přidán LPS pro navození imunitní reakce (Tab. 2). Vzorky byly inkubovány přes noc a poté pozorovány jak celá střeva, tak i z nich připravené příčné řezy ve světelném světelném mikroskopu.



Obrázek 15 Mikroskopická detekce H_2O_2 ve střevě včel. K- kontrola, inkubace s PBS pufrem, 40x zvětšeno; K-řez- 100x zvětšeno; P2- střevo inkubované s 0,5% DAB, 100x zvětšeno; P2- řez- 100x zvětšeno; P3- střevo inkubované s 0,5% DAB a s LPS, 200x zvětšeno; P3-řez- 100x zvětšeno. Šípky naznačují místa produkce H_2O_2 .



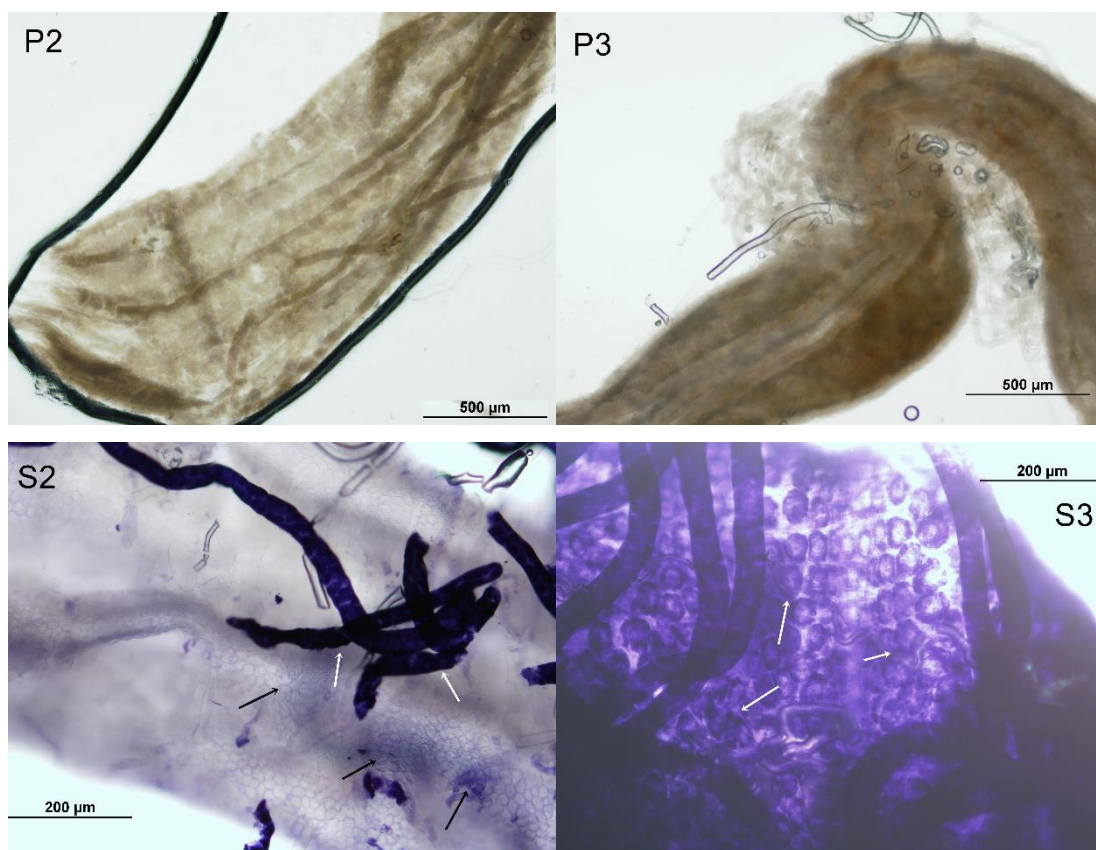
Obrázek 16 Mikroskopická detekce superoxidu ve střevě včel po inkubaci s LPS 18 hodin. S2- inkubace s 2mM NBT, 100x zvětšeno; S2- řez- 100x zvětšeno; S3- inkubace s 2mM NBT a s LPS, 400x zvětšeno; S3-řez- 200x zvětšeno. Šipky naznačují místa produkce $O_2^{\cdot-}$.

Při inkubaci střev s LPS dochází k větší produkci peroxidu vodíku i superoxidového anionradikálu vzhledem k intenzivnějšímu zbarvení v obou případech (Obr. 15 a 16). Střeva na fotografiích byla inkubována s LPS přibližně 18 hodin. Mikroskopická pozorování potvrzují, že k produkci ROS dochází i za fyziologických podmínek bez imunitního podnětu, i když v mnohem menší míře. LPS, jakožto složka vnější membrány gramnegativních bakterií, dokáže navozovat imunitní reakci. To odpovídá hypotéze, že k aktivaci enzymů produkujících superoxid je potřebná interakce LPS s receptory na membránách buněk, která aktivuje produkci ROS přes NADPH-oxidasu. Tyto molekuly jsou nadále schopny poškozovat a ničit tak škodlivé bakteriální buňky.

Pro toto stanovení byla střeva inkubována přes noc, tedy přibližně 18 hodin. Inkubaci jsem se také pokusila provést v kratším časovém intervalu, konkrétně 1 hodinu. To se ukázalo být dostatečné pro detekci $O_2^{\cdot-}$, které bylo dostatečně intenzivní a byl pozorován i značný rozdíl mezi střevy bez a s inkubací s LPS. Pro detekci H_2O_2 byl tento časový interval příliš krátký, jelikož nebyl pozorován příliš velký rozdíl mezi

střevy, která byla a která nebyla inkubována s LPS. Toto zjištění naznačuje, že v ranné fázi infekce dochází k větší produkci $O_2^{\cdot-}$ než H_2O_2 (Obr. 17). Tento fakt potvrzují i předchozí experimenty, kde se stanovovala specifická aktivita CAT a SOD (kapitoly 4.3 a 4.4), přičemž aktivita CAT se v čase postupně zvyšovala a největší byla až po 18 hodinách inkubace s LPS, kdežto aktivita SOD byla nejvyšší po 8 hodinách inkubace a po 18 hodinách už se vyrovnala aktivitě kontrolního vzorku. Koncentrace H_2O_2 se tedy zvyšuje až s delší inkubací s LPS.

Při bakteriální infekci tedy dochází ve střevech ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku NADPH-oxidásou, jakožto hlavních efektorových a signálních molekul při imunitní reakci.

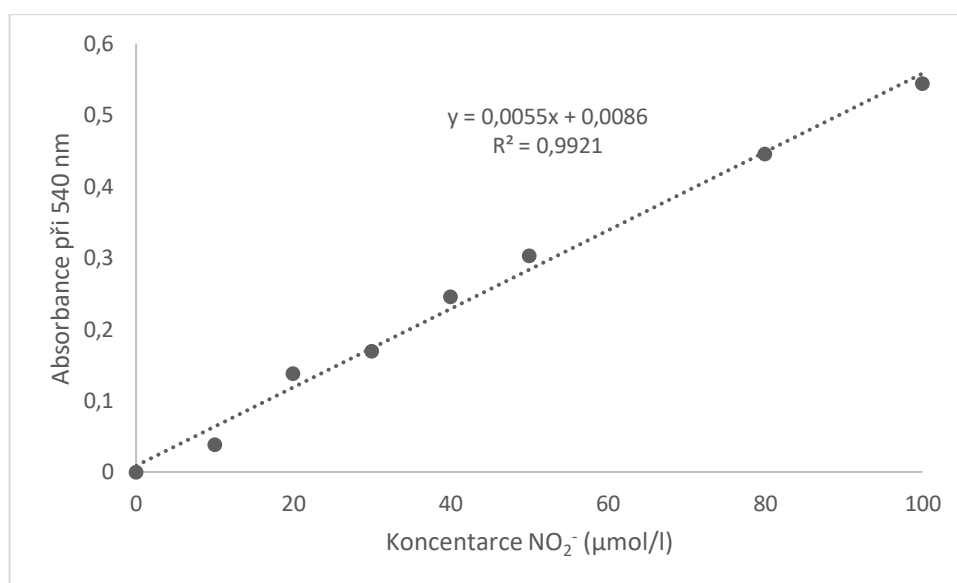


Obrázek 17 Mikroskopická detekce peroxidu a superoxidu ve střevech včel po inkubaci s LPS po dobu 1 hodiny. P2- střevo inkubované s 0,5%DAB, 40x zvětšeno; P3- střevo inkubované s 0,5%DAB a s LPS, 40x zvětšeno; S2- střevo inkubované s 2mM NBT, 100x zvětšeno; černé šipky naznačují místa produkce $O_2^{\cdot-}$, bílé ukazují na maphigické trubice; S3- střevo inkubované s 2mM NBT a s LPS, 100x zvětšeno; bílé šipky naznačují místa produkce $O_2^{\cdot-}$.

4.6 Kalibrace Griessovy metody pro stanovení koncentrace NO_2^- ve vzorcích

Koncentrace NO_2^- byla stanovena Griessovou metodou podle Miranda *et al.* (2001). Principem této metody je tvorba diazoniové soli v kyselém prostředí a její kopulace s NED za tvorby azobarviva. Závislost hodnoty absorbance při 540 nm po odečtení hodnoty blanku na koncentraci standardu proteinu byla vyhodnocena lineární regresí v programu Excel 2016 (Obr. 18). Měření probíhalo po triplikátech.

Koncentrace NO_2^- ve vzorcích byla vypočítána s využitím získané rovnice kalibrační přímky $y = 0,0055x + 0,0086$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9921$.

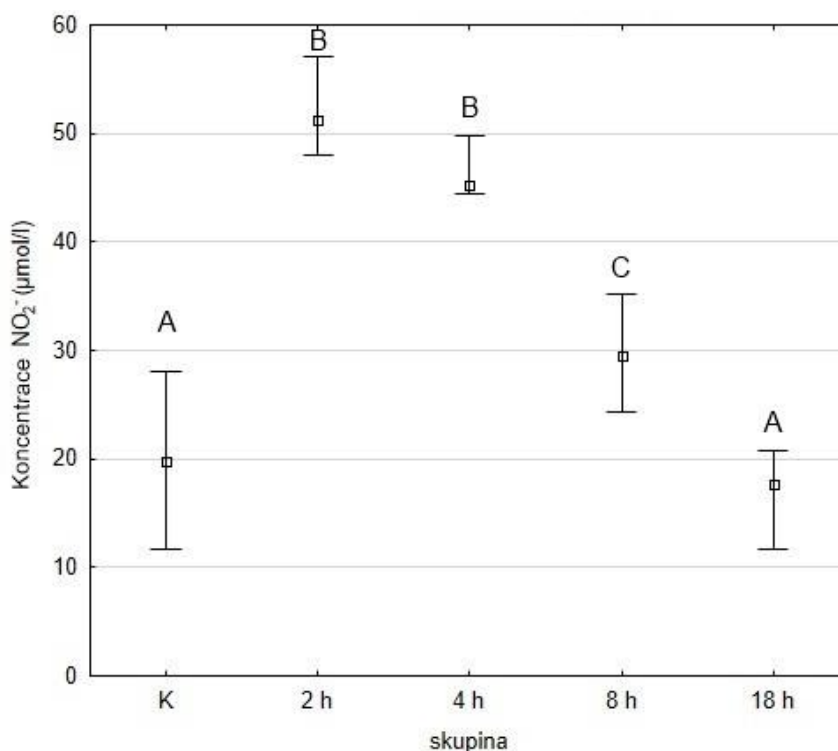


Obrázek 18 Kalibrace Griessovy metody pro stanovení koncentrace NO_2^- . Rovnice přímky vychází $y = 0,0055x - 0,0086$ s hodnotou spolehlivosti $R^2=0,9921$.

4.7 Stanovení koncentrace NO_2^- ve vzorcích

Koncentrace NO_2^- ve vzorcích TS byla stanovena z rovnice kalibrační přímky $y = 0,0055x + 0,0086$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9921$. Koncentrace byla měřena ve vzorcích bez inkubace (kontrola) a s inkubací s LPS po 2, 4, 8 a 18 hodinách v triplikátech Griessovou metodou podle Miranda *et al.* (2001). Hodnoty vypočtených koncentrací NO_2^- byly porovnány statistickou analýzou metodou jednocestné ANOVA (ANalysis Of Variance- analýza rozptylu), analýzy statistické významnosti odlišnosti hodnot jednotlivých skupin vzorků byla provedena post-hoc analýzou Tukeyovou metodou mnohonásobného porovnávání.

Koncentrace NO_2^- v kontrolních vzorcích dosahovala hodnot 12 až 28 $\mu\text{mol/l}$. Po 2 hodinách inkubace s LPS došlo k téměř trojnásobnému nárůstu koncentrace NO od 48 do 57 $\mu\text{mol/l}$, po dalších 2 hodinách inkubace tato koncentrace byla na hodnotách 44 až 50 $\mu\text{mol/l}$. Po 8 hodinách inkubace tato koncentrace již významně klesla k hodnotám 24 až 37 $\mu\text{mol/l}$ a po 18 hodinách tato koncentrace již klesla k hodnotám kontrolních vzorků v mezích od 12 do 21 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 19).



Obrázek 19 Koncentrace NO_2^- v extraktech vzorků trávicí soustavy včel s různou dobou inkubace s LPS. Statistické rozdíly jsou popsány písmeny nad grafy, přičemž shodná písmena ukazují, že ve skupinách není statisticky významný rozdíl, tedy $p > 0,05$.

Během bakteriální infekce dochází k nárůstu koncentrace NO_2^- během velmi rané fáze imunitní odpovědi, nejvyšší koncentrace NO_2^- byla naměřena již po 2 hodinách inkubace s LPS. Epiteliální buňky tedy dokáží velmi rychle reagovat na přítomnost komponent gramnegativních bakterií a produkují větší množství NO za pomoci synthasy NO.

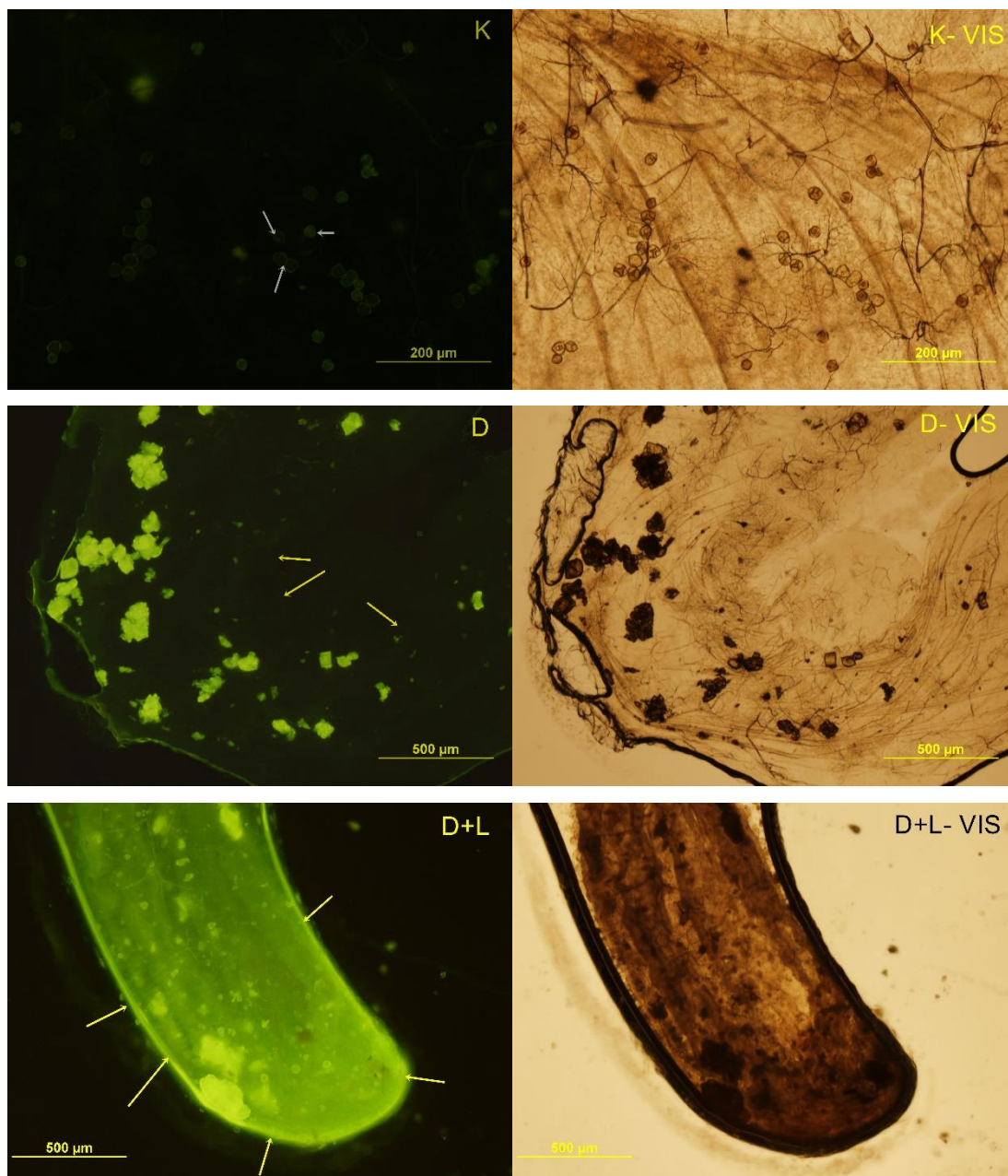
Zhang *et al.* (2015) pozorovali změny v koncentraci NO ve střevech bource morušového (*Bombyx mori*) po vystavení larev bakteriální infekci. Tyto larvy byly krmeny listy moruše potažené kulturou *Pseudomonas aeruginosa*. Jejich výsledky byly odlišené, poněvadž nejvyšší koncentraci NO naměřili až 16 hodin po požití listu s bakteriální kulturou. To může být způsobeno variabilitou jednotlivých druhů hmyzu, nebo například i tím, že v případě tohoto experimentu dochází k jisté časové prodlevě při transportu potravy z úst až do střeva. V případě mého pozorování byla celá trávicí soustava kontinuálně ve styku s LPS a tím mohlo dojít k okamžité reakci na jeho přítomnost v celé TS.

NO je tedy molekula zapojená do imunitní obranné reakce organismu. Po vystavení TS přítomnosti LPS dochází už během 2 hodin k odpovědi epitheliálních buněk na jeho přítomnost a dochází tedy k nadprodukci NO, jakožto signální a efektorové molekuly v boji proti parazitům.

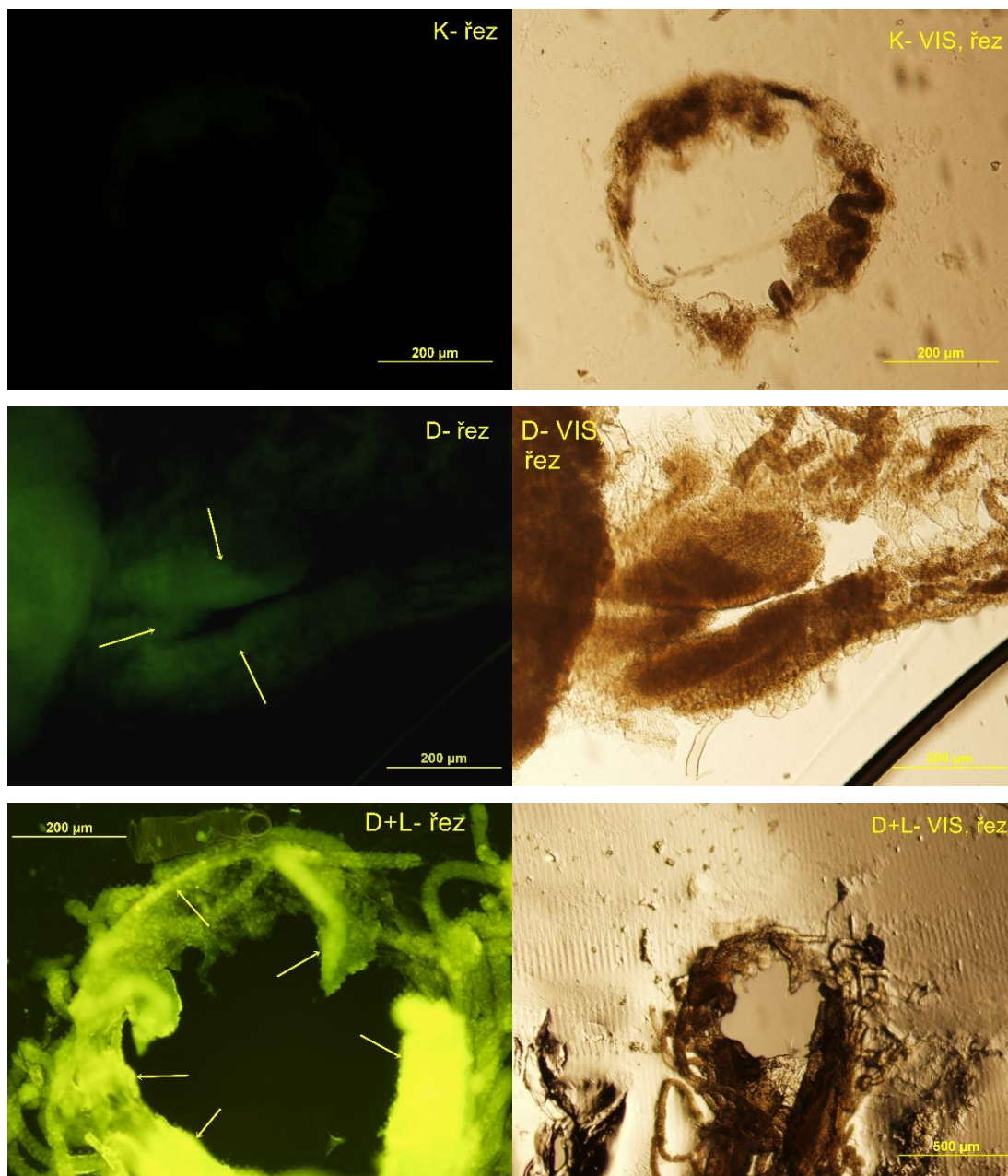
4.8 Mikroskopická detekce NO

Mikroskopická detekce NO byla provedena pomocí činidla DAF-FM diacetátu. DAF-FM diacetát je fluorescenční sonda, která se používá k detekci a kvantifikaci nízkých koncentrací NO.

Vzorky byly promyty v PBS pufru a následně byly rozděleny do zkumavek do 3 skupin- K (kontrola), D (inkubace s DAF-FM), D + L (DAF-FM + LPS) (Tab. 3). Vzorky byly inkubovány 30 minut a posléze byly promyty v PBS pufru. Vzorky celých střev a jejich příčné řezy byly pozorovány ve viditelném (VIS) a fluorescenčním spektru odpovídajícím vlnovým délkám excitace a emise délkám benzotriazolu jako produktu reakce mezi NO a DAF-FM.



Obrázek 20 Mikroskopická detekce NO ve střevech včel. K- inkubace s PBS pufrem, 100x zvětšeno, bílé šipky ukazují na pylová zrna, která po ozáření fluoreskují; K- VIS- 100x zvětšeno; D- inkubace s DAF-FM, 40x zvětšeno; D- VIS- 40x zvětšeno; D+L- inkubace s DAF- FM a LPS, 40x zvětšeno; D+L-VIS- 40x zvětšeno. Žluté šipky ukazují na místa produkce NO.



Obrázek 21 Mikroskopická detekce NO v příčných řezech střev včel. K- inkubace s PBS pufrem, 100x zvětšeno; K- VIS, řez- 100x zvětšeno; D- inkubace s DAF-FM, 100x zvětšeno; D- VIS, řez- 100x zvětšeno; D+L- inkubace s DAF-FM a LPS, 100x zvětšeno; D+L-VIS, řez- 40x zvětšeno. Žluté šipky ukazují na místa produkce NO.

Po inkubaci včelí TS s DAF-FM dochází k reakci a vzniku fluorescenčního benzotriazolu. U kontrolních vzorků byl pozorován velmi slabý fluorescenční signál, až na zvýšenou autofluorescenci pylové zrn jako složky potravy včel, které se ve střevech vyskytují a složky jejich buněčných stěn fluoreskují v dané části spektra. NO se tedy v epiteliálních buňkách vyskytuje za fyziologických podmínek i když ve velmi nízkých koncentracích. Po inkubaci TS s DAF-FM a LPS dochází ovšem k výraznému zvýšení hladiny NO, projevující se zvýšeným signálem zelené fluorescence vzorků

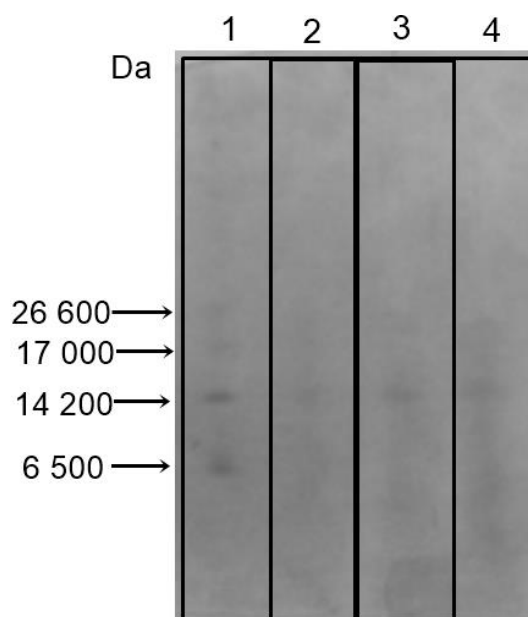
(Obr. 20 a 21). Epiteliální buňky dokáží tedy velmi rychle, již po 30 minutách inkubace s LPS, reagovat na přítomnost patogenu produkcí NO pomocí synthasy NO a zapojovat se tedy do obranných mechanismů epitelálních buněk, a tedy i celého organismu.

Tento experiment koreluje s výsledky z předchozího experimentu z kapitoly 4.7, kde jsem zjistila, že koncentrace dusitanů jako produktů oxidace NO je nejvyšší již po 2 hodinách inkubace s LPS. Epiteliální buňky jsou tedy schopny velmi rychle reagovat na přítomnost bakteriálních buněk nebo jejich součástí zvýšenou produkcí NO, který plní jednak signální roli, ale i roli nescifické cytotoxické molekuly. NO po reakci s $O_2^{\cdot-}$ tvoří peroxynitrit ($ONOO^-$) a s H_2O_2 vytváří vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($HO\cdot$). Tyto látky mají toxické vlastnosti následkem vysoké reaktivity a nitrooxidačního poškození DNA, proteinů a lipidů. Metabolismus NO tedy úzce souvisí i s metabolismem ROS.

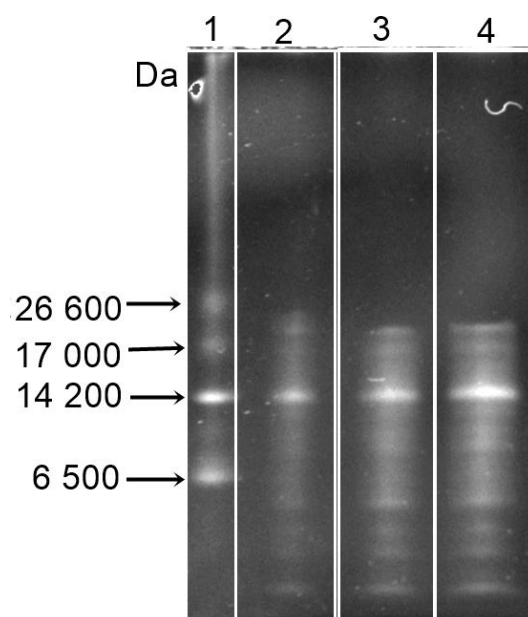
4.9 Tricinová elektroforéza a imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů defensinu a abaecinu

Byla provedena analýza proteinů a peptidů v extraktech TS včel s použitím tricinové elektroforézy podle protokolu dle Schägger v 16% dělicím gelu s glycerolem a 4% zaostřovacím gelu. Po ukončení elektroforézy byly proteiny a peptidy v gelech detekovány pomocí CBB R250 a Lumitein Protein Gel Stain. Bylo také provedeno blotování proteinů a peptidů na nitrocelulózovou membránu a následná imunochemická detekce peptidů defensinu a abaecinu na membráně s využitím příslušných polyklonálních protilátek.

Po provedení tricinové elektroforézy byla provedena detekce proteinů a peptidů pomocí CBB R250 a pomocí Lumitein Protein Gel Stain (Obr. 22 a 23). Při porovnání obou typů barvení lze vidět, že v případě CBB R250 není vizualizace proteinových pásů zcela ostrá a výrazná. U vzorků téměř nejdou identifikovat jednotlivé bandy. Z tohoto důvodu byla provedena citlivější vizualizace pomocí luminiscenčního kitu Lumitein Protein Gel Stain. Při vizualizaci pomocí tohoto reagentu už můžeme pozorovat výraznější a ostřejší zóny než v případě CBB R250. Především u vzorků lze pozorovat rozdíl v množství zastoupených proteinů v závislosti na množství nanseného vzorku extraktu TS včel.



Obrázek 22 Detekce proteinů v extraktech TS včel na 16% tricínovém gelu činidlem CBB R250. 1- standard, 3 µl; 2- extraktu TS 2,5 µl; 3- extraktu TS 5 µl; 4- extraktu TS 10 µl.



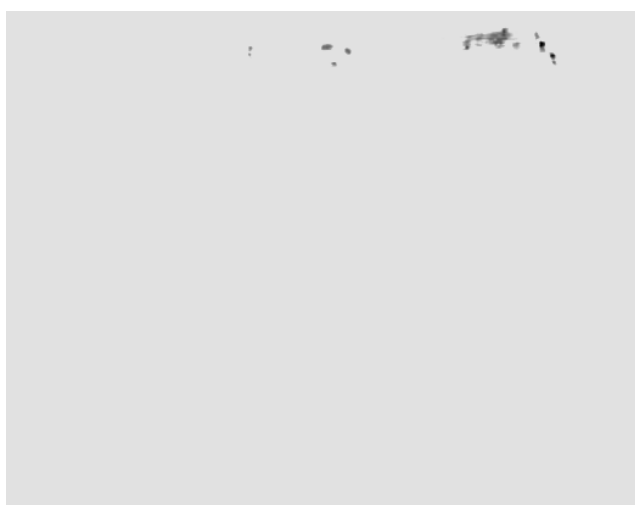
Obrázek 23 Detekce proteinů v extraktech TS včel na 16% tricínovém gelu, činidlem Lumitein Protein Gel Stain. 1- standard, 3 µl; 2- extraktu TS 2,5 µl; 3- extraktu TS 5 µl; 4- extraktu TS 10 µl.

Vyhodnocení výsledků pro markery molekulové hmotnosti ukazuje, že metodu je třeba ještě optimalizovat pro vylepšení separace a detekce cílových peptidů

Po elektroforéze bylo provedeno blotování, které probíhalo přes noc. Kontrola přenosu proteinů na membránu byla provedena pomocí barvení Ponceau S. Následně byla provedena imunochemická detekce defensinu a abaecinu na blotovací membráně. Jako

blokovací roztok byl použit 1% roztok sušeného mléka v TBS. Pro detekci Def a Aba byl použit komerční kit chemiluminiscenčního substrátu luminol a peroxidu vodíku.

Imunochemická detekce AMPs defensinu a abaecinu na NC membráně byla provedena v několika opakování, vždy s negativním výsledkem (Obr. 24). S největší pravděpodobností tuto skutečnost připisují velmi nízké koncentraci těchto AMPs ve střevních epitelálních buňkách, které tímto způsobem není možné detekovat. Možným řešením může být použití většího objemu extraktu a vhodné metody pro zakoncentrování peptidové frakce, nebo použití citlivější analytické metody, např. HPLC analýzy s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.



Obrázek 24 Imunochemická detekce Def a Aba na blotovací membráně. Na membráně nebylo možné detekovat žádné bandy.

5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše o dostupných poznatcích o složkách a funkci epiteliální imunity hmyzu se zaměřením na signální dráhy, roli reaktivních forem kyslíku, oxidu dusnatého a antimikrobiálních peptidů, jakožto hlavních signálních a efektorových molekul.

V praktické části byla provedena měření biochemických parametrů v trávící soustavě včely medonosné (*Apis mellifera*), která byla inkubována s lipopolysacharidem, jakožto prozánětlivým ligandem, hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií. Byly pozorovány změny specifických aktivit významných antioxidačních enzymů katalasy a superoxidodismutasy. Nejvyšší aktivita CAT byla naměřena po 18 hodinách a SOD po 8 hodinách inkubace s LPS. Dále byla provedena mikroskopická detekce reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého ve střevech včel a jejich příčných řezech, přičemž bylo potvrzeno, že během infekce dochází k nárůstu koncentrace těchto molekul. Byly také sledovány změny produkce NO a jeho metabolitu dusitanu, jehož nejvyšší koncentrace byla dosažena po 2 hodinách inkubace s LPS. Byla také provedena tricínová elektroforéza spolu s Western blottingem a imunochemickou detekcí antimikrobiálních peptidů na membráně. Pro vizualizaci proteinů na gelech se lépe osvědčil kit One-step Lumitein Protein Gel Stain. Imunochemická detekce defensinu a abaecinu nebyla úspěšná, pravděpodobně vzhledem k jejich nízké koncentraci v epiteliálních buňkách.

Dále by měly být zavedené metody použity na studium parametrů (CAT, SOD, AMPs) s typickými včelími patogeny. Detekci AMPs je dále nutné testovat s využitím citlivější metody dostupné na katedře – HPLC s MS detekcí.

6 Literatura

- Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Aebi H. E. (1980): Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. In: Bergmeyer H, Ed. *Methods of enzymatic analysis* **3**, 273-82.
- Ahmad S. (1995): Oxidative stress from environmental-pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 135-157.
- Ajjuri R. R., O'Donnell J. M. (2013): Novel whole-tissue quantitative assay of nitric oxide levels in *Drosophila* neuroinflammatory response. *Journal of Visualized Experiments* **82**, e50892, <http://www.jove.com/video/50892>.
- Allen R. G., Tresini M. (2000): Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 463-499.
- Altincicek B., Linder M., Linder D., Preissner K. T., Vilcinkas A. (2007): microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity* **75**, 175-183.
- Arbouzova N. I., Ziedler M. P. (2006): JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *The Company of Biologists* **133**, 2605-2616.
- Baeg G., Zhou R., Perrimon N. (2005): Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes and Development* **19**, 1861-1870.
- Beinke S., Ley S. C. (2004): Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal* **382**, 393-409.
- Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *Wao Journal* **5**, 9-19.
- Blagojović D. P., Grubor-Lajšić G. (2000): Multifunctionality of antioxidant system in insects. *Archives of Biological Sciences* **52**, 185-194.
- Boecking O., Spivak M. (1999): behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie* **30**, 141-158.
- Boman H. G. (1991): Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* **65**, 205-207.
- Bond P. J., Parton D. L., Clark J. F., Sansom M. S. P. (2008): Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial peptide maculatin 1.1. *Biophysical Journal* **98**, 3802-3815.
- Borba R. S., Klyczek K. K., Mogen K. L., Spivak M. (2015): Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3689-3699.
- Bozzelli Jr. J. C., Sasahara E. T., Pinto M. R. S., Nakaire C. R., Schreier S. (2012): Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrypticin to lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **165**, 365-373.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt Ch. E., Lowenstein Ch., Reed R. R., Snyder S. H. (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718.

- Brey P. T., Lee W., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., Francois M., Ashida M. (1993): Role of the Integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6275-6279.
- Brivanlou A. H., Darnell J. E. Jr. (2002): Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* **295**, 813-818.
- Brodgen K. A. (2005): Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Buchmann K. (2014): Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in Immunology* **5**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459>.
- Bulet P., Dimarcq J. L., Hetru C. (1993): A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 14893-14897.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Tempst, P., (1993): Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 7044–7054.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaek, M., Tempst, P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387–2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J.V., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381–386.
- Cociancich S., Dupont A., Hégy G., Lanot R., Holder F., Hetru C., Hoffmann J. A., Bulet P. (1994): Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Biochemical Journal* **300**, 567-575.
- Costa A., Jan E., Sarnow P., Schneider D. (2009): The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS ONE* **4**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007436>.
- Cotgreave I. A., Moldéus P., Orrenius S. (1988): Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **28**, 189-212.
- Cremer S., Armitage S. A. O., Schmid-Hempel P. (2007): Social immunity. *Current Biology* **17**, 693-702.
- Daffre S., Kylsten P, Samakovlis Ch., Hultmark D. (1994): The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics* **242**, 152-162.
- Demple B. (1999): Radical ideas: genetic responses to oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **26**, 64-68.
- Denkers E. Y. (2010): Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/737125>.
- Destoumieux-Garzón D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachère E. (2001): Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 47070-47077.
- Dimarcq J., Keppi E., Dunbar B., Lambert J., Reichhart J., Hoffmann D., Rankine S. M., Fothergill J. E., Hoffmann J. A. (1988): Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phorrmia terranova*

and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterocin A. *European Journal of Biochemistry* **171**, 17-22.

Dostálková S. (2014): *Testování antimikrobiální aktivity peptidů*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru Ch., Hoffmann J. A., Imler J. (2005): The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunology* **6**, 946-953, <https://www.nature.com/articles/ni1237>.

Eleftherianos I., Felföldi G., French-Constant R. H., Reynolds S. E. (2009): Induced nitric oxide synthesis in the gut of *Manduca sexta* protects against oral infection by the bacterial pathogen *Photobacterium luminescens*. *Insect Molecular Biology* **18**, 507-516, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00899.x>.

Elphick M. R., Rayne R. C., Riveros-Moreno V., Moncada S., O'Shea M. (1995): Nitric oxide Synthesis in Locust Olfactory Interneurons. *The Journal of Experimental Biology* **198**, 821-829.

Evans J. D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.

Felton G. W., Summers C. B. (1995): Antioxidant system in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 187-197.

Fogaça A. C., da Silva P. I., Miranda M. T. M., Bianchi A. G., Miranda A., Ribolla P. E. M., Daffre S. (1999): Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 25330-25334.

Foley E., O'Farrell P. H. (2003): Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes and Development* **17**, 115-125.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.

Gally J. A., Montague P. R., Reeke G. N. Jr., Edelman G. M. (1990): The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3547-3551.

Geng T., Lv D., Huang Y., Hou Ch., Qin G., Guo X. (2016): JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana*. *Gene* **595**, 69-76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.043>.

Gülmez Y., Aydın A., Can I., Tekin S., Cacan E. (2017): Cellular toxicity and biological activities of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom. *Marmara Pharmaceutical Journal* **21**, 251-260.

Ha E., Lee K., Seo Y. Y., Kim S., Lim J., Oh B., Kim J., Lee W. (2009): Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature Immunology* **10**, 949-957, <https://www.nature.com/articles/ni.1765>.

Ha E., Oh Ch., Bae Y. S., Lee W. (2005): A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**, 847-850.

- Harrison D. A., McCoon P. E., Binari R., Gilman M., Perrimon N. (1998): *Drosophila unpaired* encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes and Development* **12**, 3252-3263.
- Haydak M. H. (1945): Value of pollen substitutes for brood rearing of honeybees. *Journal of Economic Entomology* **38**, 484-487.
- Hermes-Lima M., Zeneto-Savín T. (2002): Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **133**, 537-556.
- Hillyer J. F., Estévez-Lao T. Y. (2010): Nitric oxide is an essential component of the hemocyte-mediated mosquito immune response against bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 141-149.
- Hoffmann J. A. (2003): The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**, 33-38.
- Hogg N., Darley-Usmar V. M., Wilson M. T., Moncada S. (1992): Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochemical Journal* **281**, 419-424.
- Holak T. A., Engström Å., Kraulis P. J., Lindeberg G., Bennich H., Awlyn Jones T., Gronenborn A. M., Marius Clore G. (1988): The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* **27**, 7620-7629.
- Hombria J. C., Brown S. (2002): The Fertile Field of *Drosophila* JAK/STAT Signalling. *Current Biology* **12**, 569-575.
- Honda K., Takeda K. (2009): Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunology* **2**, 187-196, <https://doi.org/10.1038/mi.2009.8>.
- Hooper L. V., Gordon J. I. (2001): Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115-1118.
- Horvath C. M., Darnell J. E. (1997): The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 233-239.
- Huang J., Jing X., Douglas A. E. (2015): The multi-tasking gut epithelium of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **67**, 15-20.
- Hultmark D. (2003): *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* **15**, 12-19.
- Hultmark D., Engström A., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H. G. (1983): Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal* **2**, 571-576.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208.
- Cheng T., Xia Q., Xu, P., Tan X., Fang T., Xiang Z. (2009): Identification and comparative analysis of immune-related genes and signaling pathways in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica* **52**, 235-245.
- Jones R. M., Luo L., Ardita C. S., Richardson A. N., Kwon Y. M., Mercante J. W., Alam A., Gates C. L., Wu H., Swanson P. A., Lambeth J. D., Denning P. W., Neish A. S. (2013): Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *The EMBO Journal* **32**, 3017-3028.

- Kamata H., Hirata H. (1999): Redox regulation of cellular signalling. *Celular signalling* **11**, 1-14.
- Kaneko T., Yano T., Aggarwal K., Lim J., Ueda K., Oshima Y., Peach C., Erturk-Hasdemir D., Goldman W. E., Oh B., Kurata S., Silverman N. (2006): PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature Immunology* **7**, 715-723, <https://www.nature.com/articles/ni1356>.
- Kelm M. (1999): Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 273-289.
- Kietzmann T., Fandrey J., Acker H. (2000): Oxygen radicals as messengers in oxygen-dependent gene expression. *News in Physiological Sciences* **15**, 202-208.
- Klaudiny J., Albert Š., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J. (2005): Two structurally different defensin genes one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 11-22.
- Knowles R. G, Moncada S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249-258.
- Komano H., Kasama E., Nagasawa Y., Nakanishi Y., Matsuyama K., Ando K., Natori S. (1987): Purification of *Sarcophaga* (fleshfly) lectin and detection of sarcotoxins in the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *Biochemical Journal* **248**, 217-222.
- Konno K., Rangel M., Oliveira J. S., dos Santos Cabrera M., Fontana R., Hirata I. Y., Hide I., Nakata Y., Mori K., Kawano M., Fuchino H., Sekita S., Neto J. R. (2007): Decoralin, a novel linear cationic α -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides* **28**, 2320-2327.
- Kuhn-Nentwig L. (2003): Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 2651-2668.
- Kylsten P., Kimbrell D. A., Daffre S., Samakovlis Ch., Hultmark D. (1992): The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Molecular and General Genetics* **232**, 335-343.
- Leclerc V., Reichhart J. (2004): The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews* **198**, 59-71.
- Leem J. Y., Jeong I. J., Park K. T., Park H. Y. (1999): Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S.. *FEBS Letters* **442**, 53-56.
- Leem J. Y., Nishimura Ch., Kurata S., Shimada I., Kobayashi A., Natori S. (1996): Purification and characterization of N-b-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 13573-13577.
- Lemaitre B., Hoffmann J. (2007): The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *The Annual Review of Immunology* **25**, 697-743, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Leulier F., Rodriguez A., Khush R. S., Abrams J. M., Lemaitre B. (2000): The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Reports* **1**, 353-358.

- Leulier F., Vidal S., Saigo K., Ueda R., Lemaitre B. (2002): Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Current Biology* **12**, 996-1000.
- Li J., Xia F., Li W. X. (2003): Coactivation of STAT and ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Developmental Cell* **5**, 787-798.
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207-215.
- Liu X., Miller M. J. S., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster J. R. Jr. (1998): Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2517-2179.
- Lu Y., Wu L. P., Anderson K. V. (2001): The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an IκB kinase. *Genes and Development* **15**, 104-110.
- Luckhart S., Vodovotz Y., Cui L. and Rosenberg R. (1998): The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 5700–5705.
- Marklund S., Marklund G. (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474.
- Matés J. M., Pérez-Gómez C., de Castro I. N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- Mayer B. (1994): Regulation of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase. *Cell Biochemistry and Function* **12**, 167-177.
- McCord J. M., Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049–6055.
- Meitzler J. L., de Montellano P. R. O. (2009): Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) “Peroxidase” domains. Insights into heme binding and catalytic activity. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 18634-18643.
- Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A. (2001): A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **5**, 62-71.
- Moreno-García M., Córdoba-Aguilar A., Condé R., Lanz-Mendoza H. (2012): Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues. *Bulletin of Entomological Research* **103**, 127-139, http://journals.cambridge.org/abstract_S000748531200048X.
- Müller P., Kutenkeuler D., Gesellchen V., Zeidler M. P., Boutros (2005): Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* **436**, 871-875.
- Müller U. (1997): The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology* **51**, 363-381.
- Nappi A. J., Vass E. (1993): Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research* **6**, 117-126.
- Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. (2000): Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **4**, 423-430.

- Negri P., Maggi M., Correa-Aragunde N., Brasesco C., Eguaras M., Lamattina L. (2013): Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie* **44**, 575-585.
- Nikolić T. V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D. P. (2015): Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **90**, 181-194, <https://doi.org/10.1002/arch.21253>.
- Otvos L. (2002): The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1138-1150.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. (1986): A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **154**, 536-541.
- Paoletti F., Mocali A. (1990): Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymology* **186**, 209-220.
- Pardini R. S. (1995): Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 101-118.
- Powers J. P. S., Hancock R. E. W. (2003): The relationship between peptide structure and microbial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Rawlings J. S., Rosler K. M., Harrison D. A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* **117**, 1281-1283.
- Ribeiro J. M. C., Nussenzveig R. H. (1993): Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Letters* **330**, 165-168.
- Ritsick D. R., Edens W. A., McCoy J. W., Lambeth J. D. (2004): The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. *Biochemical Society Symposia* **71**, 85-96.
- Rivero A. (2006): Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology* **22**, 219-225, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.014>.
- Royet J., Reichhart J., Hoffmann J. A. (2005): Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology* **17**, 11-17.
- Rutschmann S., Jung A. C., Zhou R., Silverman N., Hoffmann J. A., Ferrandon D. (2000): Role of *Drosophila* IKK γ in a Toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunology* **1**, 342-347.
- Ryu J., Ha E., Lee W. (2010): Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 369-376.
- Ryu J., Ha E., Oh Ch., Seol J., Brey P. T., Jin I., Lee D. G., Kim J., Lee D., Lee W. (2006): An essential complementary role of NF- κ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *The EMBO Journal* **25**, 3693-3701.
- Samakovlis Ch., Kylsten P., Kimbrell D. A., Engström A., Hultmark D. (1991): The Andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal* **10**, 163-169.
- Seeley, T. D. (1989): The honey bee colony as a superorganism. *American Scientist* **77**, 546-553.
- Seeley, T. D. and Morse, R. A. (1976): The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **23**, 495-512.

- Semenza G. L. (2000): Cellular and molecular dissection of reperfusion injury- ROS within and without. *Circulation Research* **86**, 117-118.
- Schägger H. (2006) Tricine SDS-PAGE, *Nature Protocols* **1**, 16-23.
- Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kolbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C. (2001): Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology* **2**, 1133-1137.
- Sies H. (1987): Defense lines against reactive oxygen species. *Alcohol and Alcoholism* **22**, A5-A5.
- Silverman N., Zhou R., Erlich R. L., Hunter M., Bernstein E., Schneider D., Maniatis T. (2003): Immune activation of NF- κ B and JNK requires *Drosophila* TAK1. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 48928-48934.
- Silvermann N., Maniatis T. (2001): NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes and Development* **15**, 2321-2342.
- Silvermann N., Zhou R., Stöven S., Pandey N., Hultmark D., Maniatis T. (2000): A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes and Development* **14**, 2461-2471.
- Simone M., Evans J. D., Spivak M. (2009): Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* **63**, 3016-3022.
- Steiner H. (1982): Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters* **137**, 283-287.
- Stell I. (2012): Digestive System. In: *Understanding Bee Anatomy: A Full Colour Guide*. 1, The Catford Press, UK, 164-175.
- Stöven S., Silvermann N., Junell A., Hedengren-Olcott M., Erturk D., Engström Y., Maniatis T., Hultmark D. (2003): Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5991-5996.
- Stuehr D. J., Griffith O. W. (1992): Mammalian nitric-oxide synthases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **65**, 287-346.
- Svitáková M. (2017): *In vitro metody studia imunitního systému včel*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Trimmer B. A., Aprille J. R., Dudzinski D. M., Lagace Ch. J., Lewis S. M., Michel T., Qazi S., Zayas R. M. (2001): Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science* **292**, 2486-2488.
- Tusco R., Jacomin A., Jain A., Penman B. S., Larsen K. B., Johansen T., Nezis I. P. (2017): Kenny mediates selective autophagic degradation of the IKK complex to control innate immune responses. *Nature Communications* **8**, <https://www.nature.com/articles/s41467-017-01287-9>.
- Tzou P., de Gregorio E., Lemaitre B. (2002): How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 102-110.
- Vidal S., Khush R. S., Leulier F., Tzou P., Nakamura M., Lemaitre B. (2001): Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-B-dependent innate immune responses. *Genes and Development* **15**, 1900-1912.

- Vilmos P., Kurucz E. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Vizioli J., Salzet M. (2002): Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**, 494-496.
- Wasserman S. L., Itagaki H. (2003): The olfactory responses of the antenna and maxillary palp of the fleshfly, *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae), and their sensitivity to blockage of nitric oxide synthase. *Journal of Insect Physiology* **49**, 271-280.
- Weirich G. F., Collins A. M., Williams V. P. (2002): Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **33**, 3-14.
- Whitten M. M., Mello C. B., Gomes S. A., Nigam Y., Azambuja P., Garcia E. S. and Ratcliffe N. A. (2001): Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Experimental Parasitology* **98**, 44-57.
- Wink D. A., Hines H. B., Cheng R. Y. S., Switzer Ch. H., Flores-Santana W., Vitek M. P., Ridnour L. A., Colton C. A. (2011): Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 873-891.
- Zámocký M. (1998): Spektroskopické a enzymologické vlastnosti kvasinkovej peroxidázovej katalázy. *Chemické listy* **92**, 875-882.
- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 337-349.
- Zhang L., Wang Y., Lu Z. (2015): Midgut immune responses induced by bacterial infection in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **16**, 875-882.
- Zor T., Selinger Z. (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* **236**, 302-308.

7 Seznam použitých zkratek

Aba	abaecin
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonová kyselina)
AMPs	antimikrobiální peptidy
APS	amonium persulfát, persulfát amonný
BSA	sérový hovězí albumin
CAT	katalasa
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DAB	diaminobenzidin
DAF-FM DA	4-amino-5-aethylamino-2',7'-ai fluorofluorescein diacetát
ddH ₂ O	deionizovaná voda
Def	defensin
DIF	dorsal-related immunity factor, imunitní faktor příbuzný s dorsal
DMSO	dimethylsulfoxid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
Duox	Dual oxidasa, NADPH oxidasa
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GST	glutathion S-transferasa
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
IMD	immune defficiency pathway
IP3	inositoltrifosfát
IRC	imunitně reagující katalasa
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription

LDL	lipoprotein o nízké hustotě
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
LPS	lipopolysacharid
NBT	nitro blue chlorid tetrazolium
NC	nitrocelulosa
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NOS	synthasa oxidu dusnatého
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns, prozánětlivé ligandy
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PDFV	polyvinylidenfluorid
PG	peptidoglykan
PGRP-LC	LC protein rozpoznávací peptidoglykan
PHD	peroxidasová homologní doména
PLC β	fosfolipasa C β
RNS	reaktivní formy dusíku
ROI	reaktivní meziprodukty kyslíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
TBS	Tris Buffered Saline, Tris pufovaný fyziologický roztok
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TLR	toll-like receptor
TS	trávicí soustava