

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**



**Izolace a biochemická charakteristika proteinů FREP u
klíštěte *Dermacentor marginatus*.**

Bakalářská práce

Jarmila Dupejová

2008

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba

Bakalářská diplomová práce

Dupejová J., 2008: Izolace a biochemická charakteristika proteinů FREP u klíštěte *Dermacentor marginatus*. [Isolation and biochemical characterisation of FREP proteins from *Dermacentor marginatus*]. BSc. Thesis, in Czech. 63 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Fibrinogen-related proteins (FREP) are lectins with possible functions in invertebrate immunity. Previously, a FREP protein from the hemolymph of the tick *Ornithodoros moubata*, Dorin M, was isolated and characterised in our laboratory. In this study, four FREP proteins named DMFREP1, DMFREP2, DMFREP3, and DMFREP4 were detected with anti-Dorin M antibodies in the hemolymph of the tick *Dermacentor marginatus*. These FREP proteins were characterised by biochemical methods, purified, antibodies directed against these proteins were produced and the proteins were localised to tick tissues by immunofluorescence.

Bakalářská práce byla financována z grantu SGA2008/017 (řešitel J. Dupejová), Výzkumného záměru MSM 6007665801 (řešitel L. Grubhoffer), grantu Grantové agentury ČR 524/06/1479 (řešitel L. Grubhoffer), výzkumného centra LC 06009 MŠMT (řešitel L. Grubhoffer) a grantu Grantové agentury Jihočeské univerzity 04-GAJU-45 (řešitel J. Štěrba).

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

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

V Českých Budějovicích,

.....

Jarmila Dupejová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům Prof. Liborovi Grubhofferovi za možnost vytvořit vlastní vědeckou práci, za cenné rady a čas, který mi věnoval; Jankovi Štěrbovi děkuji za ochotu pomoci a poradit, kdykoli bylo potřeba, za pevné nervy při konzultacích a za tvrdohlavost, díky které to se mnou nevzdal.

V neposlední řadě děkuji Maruše Vancové za pomoc s přípravou vzorků na fluorescenci a za umožnění nahlédnutí do mikrosvěta; Lence Bučinské a Veronice Dorňákové patří mé díky za zpříjemnění volných chvil mezi pokusy a všestrannou pomoc a podporu při učení se být vědcem. Všem členům laboratoře rovněž děkuji za příjemnou a přátelskou atmosféru v laboratoři.

Mé velké díky patří rodině a přátelům za podporu, lásku a možnost studovat.

obsah

1. ÚVOD.....	6
2. CÍLE PRÁCE	7
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1. Klíšťata	8
3.2. Klíšťe druhu <i>Dermacentor marginatus</i>	8
3.3. Hemolymfa klíšťat a proteiny hemolymfy	9
3.4. Imunita.....	10
3.4.1. Interakce klíšťe-hostitel.....	11
3.4.2. Imunitní systém klíšťete.....	12
3.4.2.1. Buněčná imunita	12
3.4.2.2. Humorální imunita.....	12
3.5. Lektiny.....	14
3.5.1. Význam a funkce lektinů	14
3.5.2. Rozdělení lektinů	15
3.5.2.1. Galektiny (S-lektiny)	16
3.5.2.2. C-lektiny	17
3.5.2.2.1. Kolektiny	17
3.5.2.2.2. Selektiny	17
3.5.2.3. Pentraxiny	18
3.5.2.4. Fibrinogenu podobné proteiny (FREP) a fikoliny	18
3.5.2.4.1. Fikoliny/proteiny FREP bezobratlých	19
3.6. Klíšťecí lektiny.....	19
3.6.1. Fikoliny a fibrinogenu podobné proteiny klíšťat.....	20
3.6.1.2. Dorin M	20
3.7. Glykosylace:	22
4. MATERIÁL A METODY	24
4.1. Materiál.....	24
4.1.1. Zvířata.....	24
4.1.2. Chemikálie a kity	24
4.1.2.1. Roztoky a puřry	24
4.1.2.2. Kity	25
4.1.2.3 Primery (Generi BioTech).....	26
4.2. METODY	26
4.2.1. Příprava plasmy	26
4.2.2. Příprava myších erytrocytů.....	26
4.2.3. Hemaglutinace a inhibice hemaglutinace	27
4.2.4. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	27
4.2.5. Blotovací techniky	28
4.2.5.1. Imunobloting	28
4.2.5.2. Detekce glykoproteinů.....	29
4.2.5.3. Lektinobloting	29
4.2.6. Příprava myšního polyklonálního séra	30
4.2.7. Enzymatická deglykosylace	30
4.2.8. Afinitní chromatografie	30
4.2.8.1. Purifikace protilátek ze séra	30
4.2.8.2. Purifikace proteinů afinitní chromatografií	31
4.2.9. Izolace RNA	31
4.2.9.1. Příprava vzorků	32

4.2.9.2. Vlastní izolace RNA.....	32
4.2.10. Izolace mRNA	32
4.2.11. Syntéza cDNA	32
4.2.12. PCR.....	33
4.2.13. Elektroforéza	33
4.2.14. Imunofluorescence.....	33
4.2.14.1. Příprava vzorků	33
4.2.14.2. Imunozaření.....	34
5. VÝSLEDKY.....	35
5.1. Hemaglutinační aktivita a inhibice hemaglutinace.....	35
5.2. SDS-PAGE	36
5.3. Imunobloting	37
5.4. Detekce glykoproteinů.....	39
5.5. Lektinobloting	39
5.6. Příprava myších (BALB/c) polyklonálních sér	41
5.7. Enzymatická deglykosylace	42
5.8. Afinitní chromatografie	44
5.10. Sekvence genů proteinů FREP	46
6. DISKUZE.....	47
6.1. Lektiny/proteiny FREP v plasmě <i>D. marginatus</i>	47
6.2. Vazebná specifita proteinů DMFREP a charakteristika jejich glykanů	49
6.3. Izolace proteinů FREP	51
7. ZÁVĚR.....	52
8. LITERATURA	53
9. POUŽITÉ ZKRATKY	61
10. PŘÍLOHY.....	62

1. ÚVOD

Klíšťata patří mezi krevsající ektoparazity, které můžeme najít po celém světě. Z globálního hlediska patří hned po komárech mezi nejvýznamnější vektory patogenů, kteří jsou původci onemocnění s velkým dopadem na zdraví lidí i zvířat. Přesto je současná znalost molekulových a buněčných faktorů rozpoznávání přenášených patogenů klíšťaty včetně zodpovědných proteinů v hemolymfě klíšťat velmi malá.

Lektiny se řadí mezi evolučně konzervované molekuly účastnící se procesů přirozené imunity. Jejich charakteristickou vlastností je schopnost interagovat se sacharidy a sacharidovými molekulami a rozpoznávat tak cukerné zbytky na povrchu patogenů. Do těchto interakcí jsou zapojeny zejména fibrinogenu podobné proteiny (FREPs) s lektinovou aktivitou, jejichž charakterizaci a mechanismům působení nebyl dosud věnován moc velký zájem.

2. CÍLE PRÁCE

- prokázat přítomnost lektinů v plasmě klíštěte *Dermacentor marginatus* detekcí jejich hemaglutinační aktivity (HA) a určit jejich vazebnou specifitu pomocí inhibice hemaglutinace,
- identifikovat proteiny FREP *D. marginatus* protilátkami proti Dorinu M (FREPU *O. moubata*) a protilátkami proti hemaglutinační aktivitě plasmy *D. marginatus*,
- charakterizovat nalezené proteiny FREP metodami analytické biochemie (SDS-PAGE, barvení glykoproteinů, lektinobloting, enzymatická deglykosylace).
- připravit myší polyklonální monospecifické protilátky proti proteinům FREP,
- izolovat proteiny FREP pomocí afinitní chromatografie:
 - na základě jejich vazené specifity určené inhibicí HA,
 - na základě specifické interakce antigen-protilátka,
- lokalizovat nalezené proteiny FREP v tkáních *D. marginatus* imunofluorescencí.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Klíšťata

Klíšťata patří mezi roztoče (*Acarina*) a dělí se do tří základních čeledí: *Ixodidae* (klíšťata), *Argasidae* (klíšťáci) a *Nutalliellidae*, který je zastoupen pouze jedním druhem.

Do čeledi *Ixodidae* je řazeno 13 rodů a 650 druhů, zatímco čeleď *Argasidae* zahrnuje 5 rodů a 170 druhů (rody *Argas*, *Ornithodoros*, atd.) (Sonenshine, 1991). Čeleď *Ixodidae* se dělí na skupiny Prostriata (rod *Ixodes*) a Metastriata, kam patří zbývající rody (*Ridicephalus*, *Amblyoma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyaloma*, atd.). Jednotlivé čeledi se liší v ontogenezi, fyziologii, morfologii i reprodukční strategii.

Klíšťata jsou krevsající členovci, které můžeme najít ve všech terestrických oblastech. Jsou po komárech nejnebezpečnějšími přenašeči závažných onemocnění lidí i zvířat, kteří přenášejí větší množství různých druhů infekčních agens než jiné skupiny členovců. Tito ektoparazité napadají člověka, terestrické savce, ptáky, hady a zřídka i obojživelníky. Klíšťata jsou hlavními vektory patogenů způsobujících nemoci jako je horečka skalistých hor, ehrlichioza a lymská borelióza, theilerióza a babezióza (Sonenshine, 1993). Klíšťáci přenášejí původce Africké horečky prasat a spirochéty rodu *Borrelia*, původce návratných horeček (Piesman a Gage, 1996).

3.2. Klíšťe druhu *Dermacentor marginatus*

Piják stepní (*Dermacentor marginatus*) se řadí mezi tvrdá klíšťata a je rozšířen napříč Evropou, Asií a Severní Amerikou. Je možné jej najít v stepních oblastech a v několika případech zasahuje oblast jeho rozšíření i do lesů. Toto trojhostitelské klíšťe cizopasí na drobných i velkých savcích, přičemž člověka napadá zřídka. Piják stepní je hlavním přenašečem *Rickettsia slovaca* (Řeháček et al., 1990; Beati et al., 1993) a hraje druhotnou roli v přenosu viru omské hemoragické horečky (Nuttal a Labuda, 1994).

Piják stepní je též prokázaným přenašečem viru klíšťové encefalitidy (Kozuch a Nosek, 1971), viru konžsko-krymské hemoragické horečky (Markeshin et al., 1992), viru Bhandža (Hubálek et al., 1988; Labuda et al., 1997), viru West Nile (Hubálek a Halouzka, 1999), bakterií *Coxiella burnetii*, *R. sibirica*, *R. conorii*, *B. burgdorferi* (Smetanová et al., 2006), *Francisella tularensis* (Hubálek et al., 1990) a prvoků rodu *Babesia* (Pietrobelli et al., 2007).

3.3. Hemolymfa klíšťat a proteiny hemolymfy

Hemolymfa klíšťat, stejně jako u ostatních členovců, je komplexní tekutina složená z plasmu a hemocytů, která vykonává mnoho funkcí. Kromě transportu hormonálních posílů, nutričních molekul a chemických intermediátů metabolismu napříč klíštěcím tělem působí také jako opora pro různé tkáně a jako médium pro přenos mechanické energie na principu hydrostatického tlaku. Plasma udržuje osmoticky vyrovnané vnitřní prostředí se správnou hladinou iontů. Kromě vody jsou v ní obsaženy také lipidy, aminokyseliny, sacharidy, anorganické soli, některé pigmenty a složky zapojené do srážení hemolymfy. Dále se tam vyskytují různé enzymy, hormony a molekuly cizího původu, např. hostitelské imunoglobuliny získané během sání krve (Sonenshine, 1991).

Převážnou většinu rozpustných molekul obsažených v plazmě představují proteiny. K nejlépe prostudovaným plasmatickým proteinům patří vitelogeniny a viteliny, jejichž aminokyselinové, lipidové a sacharidové složení je u klíšťat a hmyzu velmi podobné s tím rozdílem, že klíštěcí viteliny a vitelogeniny na sebe váží hem (James a Oliver, 1997; Gudderra et al., 2001), který získávají z hostitelského hemoglobinu; hmyzí vitelogeniny a viteliny tuto funkci nemají. Vitelogeniny cirkulují v hemolymfě a představují prekurzor žlutkových proteinů potřebných k vývoji vajíček (shrnuto v Gudderra et al., 2001). U klíšťat bylo dosud charakterizováno několik vitelogeninů, např. z klíšťáka *Ornithodoros moubata* (Taylor a Chinzei, 2001) a z tvrdých klíšťat *Dermacentor variabilis* (Rosel a Coons, 1991) a *Ixodes scapularis* (James a Oliver, 1997).

U několika druhů klíšťat byly popsány hemoproteiny a hemoglykoproteiny spojené s vitelogenezí a proteiny účastníci se patrně procesů přirozené imunity klíšťat. Mezi posledně jmenované patří proteiny klíšťáka *O. moubata* α -2-makroglobulin (Kopáček et al., 2000), antimikrobiální peptid patřící do rodiny defensinů (Nakajima et al., 2001) a plasmatický lektin Dorin M (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000; Rego et al., 2005, 2006). Dalším částečně charakterizovaným proteinem je lektin o velikosti 85 kDa z klíštěte *I. ricinus* (Grubhoffer et al., 1991) a lysozomy s antimikrobiální aktivitou nacházející se v hemolymfě *D. variabilis* a *Amblyomma hebraeum* (Johns et al., 1998; Lai et al., 2004).

3.4. Imunita

Odolnost vyšších organismů proti infekci je zprostředkována dvěma hlavními systémy: adaptivní a vrozenou imunitou.

Vrozená imunita je evolučně starší a různé její formy lze najít u všech mnohobuněčných organismů, kde zajišťuje první linii hostitelovy obrany proti patogenům (viry, bakterie, houby, paraziti).

U vrozeného imunitního systému se uplatňují dvě odlišné strategie pro rozpoznávání mikroorganismů a cizorodých buněk: 'missing self' (opomíjející vlastní molekuly) a 'microbial non-self' (rozeznávající nevlastní, mikrobiální molekuly) (Mushegian a Medzhitov, 2001).

První strategie je založená na rozeznávání molekulových markerů specifických pro vlastní buňky. Tyto se nacházejí se na povrchu neinfikovaných i infikovaných buněk hostitele, ale ne na mikrobiálních buňkách. Rozpoznávání těchto signálů mechanismy vrozené imunity je spřaženo s inhibičními signály, které zabraňují aktivaci imunitní odpovědi proti vlastním buňkám. Absence těchto markerů na cizorodých buňkách umožňuje následně specifickou odpověď proti patogenům. „Vlastní“ molekuly jsou rozpoznávány tzv. inhibičními receptory, které patří buď do rodiny imunoglobulinů, nebo obsahují lektinové domény typu C.

Druhá strategie spočívá v identifikaci patogenů prostřednictvím receptorů kódovaných v zárodečných buňkách. Tyto receptory rozpoznávající motivy (PRRs, pattern recognition receptors) rozlišují mnoho podobných molekulových struktur označovaných jako molekulové motivy spojené s patogenem (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns). PAMPs jsou především polysacharidy, které se u různých patogenů liší jen málo, nevyskytují se však u hostitele (Janeway, 1989). Tento typ rozeznávání patogenů můžeme najít u obratlovců i bezobratlých, zatímco rozpoznávání patogenů strategií 'missing self' je charakteristické pouze pro savce/obratlovce.

Adaptivní (získaná) imunita se vyvinula asi před 400 miliony let během časně evoluce obratlovců. Geny kódující několik klíčových molekul účastnících se procesů adaptivní imunity, včetně imunoglobulinu, TCR (T-cell receptor), MHC I. a II. třídy a genu aktivujícího rekombinaci (RAG, recombination-activating gene) byly identifikovány pouze u paryb, ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců (shrnutí ve Fujita et al., 2004). Získaná imunita je charakterizována větší specifitou než imunita vrozená, tj. odpověď adaptivní imunity umí kromě rozlišení cizích buněk od vlastních rozlišit různé antigeny i jejich epitopy. Dalším charakteristickým znakem adaptivní imunity je paměť, která umožňuje

organismu úspěšně se bránit infekčním zárodkům, se kterými se organismus již dříve setkal. V případě tohoto opakovaného vystavení organismu stejnému patogenu/cizorodé látce se pak vytváří silnější a rychlejší sekundární odpověď.

Klíčovou složkou obrany hostitele je tedy rozlišení vlastního a cizího (self/non-self) s využitím různých typů molekulových interakcí. Mezi nimi hrají významnou roli interakce sacharidů (jako součásti makromolekuly) a proteinů imunitního systému, a to je zajišťováno zejména lektiny, případně dalšími typy sacharid vázajících proteinů (shrnuje v Mushegian a Medzhitov, 2001).

3.4.1. Interakce klíště-hostitel

Interakce mezi klíštětem a hostitelem zahrnují na jedné straně vrozenou a specifickou získanou imunitní obranu hostitele (např. antigen-prezentující buňky, cytokiny, lymfocyty, protilátky, granulocyty) společně s dalšími mechanismy namířenými proti sání klíštěte, např. srážení krve, vasokonstrikce apod. Na druhé straně k těmto interakcím patří imunomodulační protiopatření klíšťat, včetně blokování aktivace komplementu, tlumení funkce T-lymfocytů, enzymatické štěpení imunoglobulinů a mechanismy umožňující sání (viz níže) (shrnuje ve Wikel, 1999).

Klíště se na kůži hostitele nejprve přichytí pomocí háčků na chelicerách (klíšťkách) a při jejich zatahování pomalu vtlačuje hypostom (sací orgán) do kůže hostitele. Vnitřní část hypostomu tvoří žlábek, kterým klíště vypouští do ranky své sliny a nasává hostitelovu krev.

V bezprostředním kontaktu s hostitelem jsou tedy především klíštěcí sliny (slinné žlázy), druhotně se uplatňuje např. hemolymfa obsahující self/non-self faktory (viz 2.4.2).

Sání klíšťatovitých (*Ixodidae*) je dlouhodobý proces, během něhož vpravuje klíště do těla hostitele sliny obsahující množství nejrůznějších látek. Ty působí jako antigeny a vyvolávají u hostitele silnou imunitní odpověď či alergickou reakci; samo sání pak podněcuje hemostázi zahrnující mechanismy srážení krve, snižující prostupnost cév a jejich zužování. Klíště se těmto mechanismům naopak brání sekrecí farmakologicky aktivních látek schopných bránit hemostázi a tlumit zánětlivou reakci a imunitní odpověď hostitele.

Sliny klíšťat obsahují antikoagulanty potlačující hemostázu, apyrázy a prostaglandiny bránící shlukování krevních destiček (shrnuje v Mans et al., 2004) a inhibitory koagulační kaskády jako jsou např. proteiny Ixolaris (Francischetti et al., 2002)

a Salp14 (Narasimhan et al., 2002). Ve slinách jsou přítomny rovněž histamin vázající proteiny bránící rozvinutí alergické reakce (Paesen et al., 1999, 2000; Couillin, 2004), látky s anestetickým účinkem a imunomodulační látky např. Salp15 (Anguita et al., 2002).

U některých druhů (např. *Ixodes holocyclus* či druhy z rodů *Amblyoma* a *Dermacentor*) se ve slinách nachází toxiny způsobující paralýzu svalů u člověka a dalších savců (Masina a Broady, 1999).

3.4.2. Imunitní systém klíštěte

Při sání se společně s hostitelovou krví do klíštěte dostávají i mikroorganismy, viry nebo jiné cizorodé molekuly, jejichž přítomnost pak aktivuje imunitní systém klíštěte. Během evoluce se u klíšťat vyvinulo několik obranných mechanismů proti patogenům. Stejně jako ostatní členovci mají i klíšťata dva různé typy přirozené imunity: buněčnou a humorální.

3.4.2.1. Buněčná imunita

Buněčnou složku imunity klíšťat představují hemocyty, které se dělí na tři základní typy: fagocytující hemocyty (plasmacyty), granulocyty typu I a granulocyty typu II (Kuhn a Haug, 1994). Toto členění je založeno na charakterizaci jejich ultrastruktury s částečným ohledem na přítomnost/absenci granulových inkluzí; ve skutečnosti je však morfologie a ultrastruktura hemocytů mnohem složitější (Borovičková a Hypša, 2005).

Hemocyty jsou buňky cirkulující v hemolymfě, kde zajišťují obranu proti vnikajícím patogenům (Sonenshine, 1991). Jedním z mechanismů obrany je fagocytóza patogenů hemocyty, která byla popsána u *D. variabilis* v případě *Borrelia burgdorferi* (Johns et al., 2000, 2001) a u *Hyalomma dromedarii* pro *Coxiella burnetii* (Bázliková et al., 1984). Kromě fagocytózy mohou hemocyty tvořit hemocytární agregáty s patogeny (nodulace) nebo enkapsulovat větší parazity (Ceraul et al., 2002).

3.4.2.2. Humorální imunita

Mechanismy imunity u členovců reagují na patogeny podle toho, jaké složky se nacházejí na jejich povrchu.

Rozpoznávanými molekulami jsou například lipopolysacharidy, peptidoglykany a β -1,3-glukany. Navázání buněčných receptorů rozpoznávajících motivy (nacházející se

např. na epiteliálních buňkách, granulocytech) na povrchové molekuly mikroorganismů vede k syntéze široké škály molekul (antimikrobiální peptidy, opsonizační faktory) a ke spuštění signálních kaskád (koagulace, aktivace reaktivních forem kyslíku – ROS, reactive oxygen species) zapojených v imunitě.

U klíšťat je humorální odpověď druhým souborem jejich imunitních reakcí a zahrnují antimikrobiální proteiny, jako jsou lysozymy, defenziny a lektiny. Tyto molekuly jsou po stimulaci mikroorganismy produkovány především hemocyty a následně jsou uvolňovány do hemolymfy.

Lysozymy jsou enzymy schopné štěpit β -1,4-glykosidické vazby obsažené v sacharidových oligomerech/polymerech, které jsou součástí peptidoglykanu buněčné stěny bakterií (Quasba a Kumar, 1997). V hemolymfě *D. variabilis* byl identifikován lysozym s antibakteriální aktivitou (Johns et al., 1998) a později byla prokázána i baktericidní aktivita hemolymfy proti *B. burgdorferi* (Johns et al., 2000). Z klíšťáka *O. moubata* byl izolován lysozym, jehož syntéza byla indukována sáním krve (Kopáček et al., 1999; Grunclová et al., 2003).

U klíšťat byla popsána celá řada defenzinů a defenzinům podobných peptidů (defensin-like), přesto mechanismy jejich působení zůstávají poměrně nejasné. Jsou to malé molekuly, které se u členovců vyznačují antimikrobiální aktivitou především proti G+ bakteriím, některé izoformy inhibují G- bakterie, houby a protozoa (Nakajima et al., 2003; Tsuji et al., 2007).

V plasmě a hemocytech klíšťete *D. variabilis* byl identifikován defenzin (Johns et al., 2001; Ceraul et al., 2003), u kterého byla kromě antimikrobiální aktivity proti G+ bakteriím zjištěna stejná aktivita i proti *B. burgdorferi*. Dva defenzinu podobné peptidy s antimikrobiální aktivitou proti G+ i G- bakteriím byly nalezeny u *Amblyoma hebraeum* (Lai et al., 2004), u klíšťete obecného *I. ricinus* byly nalezeny dvě izoformy defenzinu, které byly detekovány v dospělých po sání na zvířatech infikovaných spirochétami *B. burgdorferi* (Rudenko et al., 2007). Také u klíšťáků byly identifikovány defenziny, a to např. u *O. moubata* (Nakajima et al., 2002).

3.5. Lektiny

Významnou skupinou proteinů účastnících se procesů přirozené imunity u bezobratlých i u obratlovců jsou lektiny, původně označované jako hemaglutininy.

Termín lektin je odvozen od latinského slova „legere“ (vybrat si), které vyjadřuje schopnost těchto proteinů rozpoznávat povrchové molekuly erytrocytů různých krevních skupin a aglutinovat je (Boyd a Shapleigh, 1954). Novější definice označuje lektin jako protein nebo glykoprotein, který nese alespoň jedno vazebné místo umožňující reverzibilní specifickou vazbu s příslušným sacharidem (Pneumans a van Damme, 1995).

3.5.1. Význam a funkce lektinů

Lektiny jsou všudypřítomné molekuly nacházející se pravděpodobně u všech eukaryot, mnoha druhů bakterií, virů a hub. Díky schopností specificky vázat cukerné molekuly (ať už jako součást glykoproteinů, glykolipidů, polysacharidů anebo jako volné molekuly sacharidů) má tato rozmanitá skupina proteinů značný význam pro množství rozličných buněčných pochodů mimo jiné také proto, že některé lektiny bezobratlých/členovců jsou považovány za funkční analogy imunoglobulinů (u organismů, které postrádají specifickou imunitu).

Lektiny se díky specifickým interakcím se sacharidy účastní rozpoznávání vlastních resp. cizích molekul tak, že interagují s vlastními glykokonjugáty i s glykosylovanými složkami virových, bakteriálních či protozoálních patogenů. Podílejí se také na přenosu patogenních původců nález u parazitických členovců, kde mohou fungovat jako receptory, ‘homing‘ faktory, diferenciacní faktory, atd. (lektiny, které se nacházejí na povrchu přenášených patogenů, rozpoznávají cukernou část molekul receptorů na buňkách přenašeče, což může usnadnit vazbu/fixaci patogenů na jeho tkáň) a na obranných reakcích imunitního systému vektora. Vedle původních funkcí, jakými jsou agregace mikroorganismů a jejich opsonizace, získaly lektiny během evoluce i daleko sofistikovanější funkci při obraně proti patogenům, a to schopnost aktivovat komplement prostřednictvím jejich vazby na sacharidové složky (např. N-acetyl-D-glukosamin, kyselina N-acetylneuraminová) buněčné stěny bakterií (shrnuto v Grubhoffer et al., 2004).

Aktivace komplementu může probíhat třemi cestami: klasickou (spouštěná komplexem antigen-protilátka a některými negativně nabitými strukturami), alternativní (aktivovaná mikroorganismy bez účasti protilátek) a lektinovou.

Lektinové cesty aktivace komplementu se z velké rodiny lektinů účastní zejména kolektiny, pentraxiny a fikoliny jako tzv. receptory rozpoznávající motivy (PRR), a to společně s několika dalšími molekulami. Jakmile např. MBL (mannose-binding lectin) rozpozná a naváže pomocí CRD (carbohydrate recognition domain) domény sacharidový ligand na povrchu infekčního agens, přechází serinová proteáza vázaná na MBL (MASP, MBL-associated serine protease) ze své inaktivní monomerní formy do aktivní dimerní formy. Komplexy MBL/MASP tak získávají schopnost proteolyticky působit na složky komplementu (C4, C2 a C3), čímž dochází k jeho aktivaci (Matsushita et al., 2001).

V poslední době je lektinům věnován zvýšený zájem mimo jiné díky tomu, že se staly cennými nástroji pro studium struktury a funkce glykokonjugátů, glykoproteinů, glykolipidů a glykanových složek membránových i solubilních receptorů. Jsou používány v aglutinačních pokusech/analýzách, při vazbě na glykosylované molekuly v afinitních technikách (lektinový blotting, afinitní/lektinová precipitace, lektinová fluorescenční a elektronová mikroskopie). Lektiny jsou také používány jako ligandy pro izolaci a purifikaci glykosylovaných molekul (shrnutí v Jacobson a Doyle, 1996).

3.5.2. Rozdělení lektinů

Podle celkové struktury se lektiny dělí na tři podskupiny: Merolektiny, jejichž molekula obsahuje jednu doménu vážící cukr, Hololektiny se dvěma nebo více homologními doménami vážícími cukry a Chimerolektiny, které mají kromě domény vážící cukr ještě doménu, jinak biologicky aktivní nebo s vazebnou specifitou pro odlišný cukr (Pneumans a van Damme, 1995).

Lektiny živočichů tvoří několik velkých rodin lišících se strukturou a jsou běžně rozdělovány podle svých charakteristických konzervativních CRD: Calnexin, I-lektiny, L-lektiny, P-lektiny, R-lektiny, galektiny (S-lektiny), pentraxiny, C-lektiny a fikoliny (Dodd a Drickamer, 2001). Posledním čtyřem zmiňovaným skupinám je v posledních letech věnován zvýšený zájem díky jejich schopnosti zprostředkovávat imunitní funkce.

Tabulka 1: srovnání lektinových rodin (Dodd a Drickamer, 2001; Gabius, 1997).

Lektinová rodina	Vazebná specifita k sacharidům	Příklady funkcí
Calnexin	(GlcNAc) ₂ (Man) ₉ Glc ₁	třídění proteinů v endoplasmatickém retikulu
I-lektiny	kyselina sialová	buněčná adheze
L-lektiny	různé	třídění proteinů v endoplasmatickém retikulu
P-lektiny	manosa-6-fosfát, různé	procesy týkající se tvorby a úpravy glykoproteinů
R-lektiny	různé	směřování enzymu, degradace glykoproteinových hormonů
Galektiny	β-galaktosidy	propojení glykanů v extracelulární matrix
Pentraxiny	různé	vrozená imunita
C-lektiny	různé	buněčná adheze, degradace glykoproteinů, vrozená imunita
Fikoliny	N-acetyl-glukosamin (GlcNAc), N-acetyl-galaktosamin (GalNAc), kyselina sialová	vrozená imunita

3.5.2.1. Galektiny (S-lektiny)

Galektiny jsou proteiny nacházející v intra- i extracelulárním prostoru. Tyto ve vodě rozpustné lektiny sdílí konzervativní sekvence v CRD a mají afinitu k β-galaktosidům, která na rozdíl od C-lektinů není závislá na přítomnosti kationtů (Cooper, 2002; Yang a Liu, 2003). Významnou skutečností ve vztahu k funkci galektinů je značná variabilita jejich vazebných aktivit k sacharidům, přestože všem galektinům je společná jejich schopnost vázat laktosu. Vysoká diverzita jejich vazebné afinity je v souladu s adaptací na odlišné biologické funkce podobně, jako je tomu u C-lektinů (Vasta et al., 1999).

Galektiny byly rozděleny na tři strukturní typy: 'proto' zastoupené jednotlivými polypeptidy s jednou CRD, které zpravidla vytvářejí v nativním stavu homodimery (Galektiny -1 a -2) nebo zůstávají jako monodimery (Galektiny -5, -7, -10), 'tandem' je charakteristický dvěma galektinovými CRD v molekule polypeptidu (Galektiny -4, -6, -8, -9) a 'chimera' s jednou CRD v jednom polypeptidu a s doménou podobnou heterogenní jaderný ribonukleoprotein (hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein).

Galektiny zprostředkovávají interakce typu buňka-buňka, buňka-extracelulární matrix a jsou tedy zapojeny v různých biologických procesech jako je růst a diferenciace, migrace, apoptóza a imunita (Yang a Liu, 2003; Pace a Baum, 2004; Young a Meeusen, 2004), a také jsou využívány parazity k přežití v hmyzích (Kamhawi et al., 2004; Pace a Baum, 2004) a klíštěcích hostitelích (Huang et al., 2007).

3.5.2.2. C-lektiny

3.5.2.2.1. Kolektiny

Kolektiny byly objeveny před sto lety jako první lektiny živočichů, které jsou zapojeny v mechanismech imunity. Jsou to multimerní proteiny velké cca 350 kDa s podjednotky okolo 32 kDa. Typická multidoménová konstrukce kolektinu je tvořena N-koncovou doménou podobnou kolagenu (collagen-like domain) bohatou na cystein, střední části (spacer) a C-koncovou CRD doménou (Drickamer et al., 1986; Vasta et al., 1999).

Kolektiny patří mezi lektiny rozeznávající PAMP motivy, čímž se řadí do první linie obrany hostitele proti virům (Ezekowitz et al., 1988; Anders et al., 1990) a bakteriím (Kawasaki et al., 1989). Po rozpoznání infekčních agens vazbou na jejich povrchové sacharidy aktivují efektorové mechanismy jako je přímá opsonizace, neutralizace, aglutinace, aktivace komplementu a fagocytóza, které vedou k potlačení růstu mikroorganismů. Regulují zánětlivé a alergické reakce inhibicí anebo naopak posílením tvorby prozánětlivých cytokinů a produkce chemokinů makrofágy a spouští apoptózu infikovaných buněk. Tyto jejich funkce omezují šíření infekce a následně mění adaptivní imunitní odpověď (Gupta a Surolia, 2007).

Dosud bylo identifikováno 9 členů této skupiny: manosu vázající lektin (MBL, 'mannose binding lectin'), konglutinin, plicní surfaktanty SP-A a SP-D, kolektiny CL-43, CL-46, CL-P1, CL-L1 a CL-K1.

3.5.2.2.2. Selektiny

Tato skupina lektinů patří mezi buněčné povrchové receptory, které zprostředkovávají interakce endogenních ligandů, vyskytujících se zejména na povrchu lymfocytů a cirkulujících fagocytických buněk, s krevními destičkami a endoteliálními buňkami. CRD selektinů, rozpoznává glykanové struktury typu sialyl-Lewis X nebo sulfo-Lewis X (Lasky, 1992; Yuen et al., 1992; Vasta et al., 1999).

3.5.2.3. *Pentraxiny*

Pentraxiny patří do rodiny tzv. ‘immune-related‘ lektinů. Jejich název je odvozen od cyklické pentamerní struktury, která je charakteristická pro všechny členy této skupiny. Pentraxiny jsou obvykle složeny ze stejných, nekovalentně vázaných podjednotek o velikosti 20-30 kDa, podle jejichž primární struktury se dělí do dvou skupin – krátké a dlouhé pentraxiny. Tyto lektiny tvoří vysoce konzervovanou skupinu proteinů vykazujících značnou sekvenční homologii, podobnost molekulových hmotností i vazebných specifit. Stejně jako kolektiny a fikoliny se pentraxiny řadí mezi složky humorální imunity, kde působí jako PRRs nebo složky kaskády komplementu (shrnutí v Mantovani et al., 2008).

Významným a zároveň prvním z charakterizovaných pentraxinů je C-reaktivní protein (CRP) (Tillet a Francese, 1930), který má schopnost rozlišit vlastní molekuly od nevlastních (self/non-self), opsonizovat bakterie a aktivovat komplement (Garlanda et al., 2005).

3.5.2.4. *Fibrinogenu podobné proteiny (FREPs) a fikoliny*

Fibrinogenu podobné proteiny (FREPs, fibrinogen-related proteins) jsou molekuly, které obsahují fibrinogenu podobnou doménu (FReD, fibrinogen-related domain) v C-koncové oblasti. Jejich zástupce můžeme najít u obratlovců i bezobratlých.

Proteiny FREP byly popsány jako humorální faktory systému vrozené imunity, které jsou schopny rozpoznávat PAMPs; jejich další funkce zahrnují např. zapojení v regulaci vývoje embrya nebo účast při buněčné adhezi. Některé proteiny z této skupiny byly popsány jako lektiny, např. lidské fikoliny (Matsushita a Fujita, 2002) a FREP proteiny *Biomphalaria glabrata* (Adema et al., 1997).

Fikoliny jsou lektiny živočichů obsahující kolagenovou doménu a C-koncovou fibrinogenu podobnou doménu, která zodpovídá za vazbu sacharidů. Tento strukturní motiv byl poprvé zjištěn u vazebného proteinu pro transformační růstový faktor β (TGF- β) buněk prasečí dělohy (Ichio et al., 1993). Fikoliny byly nalezeny u člověka (Matsushita et al., 1996; Sugimoto et al., 1998), hlodavců (Fujimory et al., 1998), prasete (Ichio et al., 1993), ježka (Omori-Satoh, 2000), obojživelníků (Kakinuma et al., 2000) a u sumky (Kenjo et al., 2001). Fikoliny, které byly identifikovány v lidské, myší a prasečí plasmě a v ascitických tekutinách, mají společnou vazebnou specifitu pro N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc). Lidské fikoliny navíc fungují jako opsoniny a aktivují lektinovou dráhu komplementu podobně jako MBL (Matsushita a Fujita, 2001). Pozoruhodná je jejich tkáňová distribuce svědčící o rozdílných funkcích těchto vazebných molekul.

3.5.2.4.1. Fikoliny/proteiny FREP bezobratlých

Díky schopnosti rozeznávat cukerné složky nacházející se na povrchu patogenů (Natori, 2001) jsou lektiny řazeny mezi důležité složky imunity. U bezobratlých byla až dosud popsána celá řada lektinů včetně těch, které mají v C-koncové oblasti fibrinogenu podobnou doménu (FReD) s vysokou sekvenční homologií se savčími fikoliny.

První FReD byla nalezena u ostnokožce *Parasthycocus parvimensis* (Xu a Doolittle, 1990); další fikoliny byly identifikovány v hemolymfě sumky *Halocynthia roretzi* (AsFCN1-4) (Kenjo et al., 2001), u ostrorepa *Limulus polyphemus* (limulin) (Marchalonis a Edelman, 1968) a *Tachypleus tridentatus* (Tl-5A/5B) (Gokudan et al., 1999).

Proteiny z *T. tridentatus*, Tachylektiny 5A a 5B, rozeznávají N-acetylovou skupinu cukrů. Tyto molekuly mají fibrinogenovou doménu, ale kolagenová doména jim chybí (Gokudan et al., 1999). Tl-5A/B mají ve svých molekulách N-koncový segment bohatý na cystein a C-koncovou fibrinogenovou doménu vykazující vysokou aminokyselinovou sekvenční homologii s fikoliny. Tachylektin 5A aglutinuje G⁺ i G⁻ bakterie a zvyšuje antimikrobiální aktivitu defensinu ostrorepa. Tyto výsledky ukazují, že tachylektin 5A rozpoznává mikroorganismy svou lektinovou vazebnou aktivitou a hraje roli v systému vrozené imunity (Matsushita a Fujita., 2001; Fujita et al., 2004).

3.6. Klíštěcí lektiny

Klíšťata přenáší celou řadu patogenních mikroorganismů a jsou tak velmi významnými vektory původců infekčních nákaz. Přesto je současná znalost molekulových a buněčných faktorů rozpoznávání přenášených patogenů klíšťaty, včetně identifikace zodpovídajících proteinů v hemolymfě klíšťat, na samém začátku.

Přítomnost lektinů byla dosud prokázána u různých klíšťat (Grubhoffer et al., 1991; Kuhn et al., 1996) i klíšťáků (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000; Huang et al., 2007), a to v hemolymfě, střevu a slinných žlázách (shrnuto v Grubhoffer et al., 2004; Grubhoffer et al., v tisku). Částečně charakterizované klíštěcí lektiny vykazují obecně afinitu k sialové kyselině a N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc), ale specificky váží také další cukry. Pravděpodobně interagují také s glykosylovanými strukturami přenášených patogenů.

3.6.1. Fikoliny a fibrinogenu podobné proteiny klíšťat

U epidemiologicky významných klíšťat bylo popsáno několik ‘fibrinogen-related’ proteinů (FREP): Ixoderin A a B, Ixoderin A-like (*Ixodes ricinus*), Dorin M a OMFREP (*Ornithodoros moubata*) a Amblyomin (*Amblyomma americanum*) (Grubhoffer et al., v tisku). Tyto proteiny byly identifikovány na základě cDNA sekvencí a analyzovány RT-PCR. OMFREP je exprimován v hemocytech a slinných žlázách, Ixoderin A v hemocytech, slinných žlázách a ve střevu, zatímco Ixoderin B je exprimován hlavně ve slinných žlázách a jen slabě v hemocytech. K expresi Amblyominu a Ixoderin A-like dochází v hemocytech (Grubhoffer et al., v tisku). Tyto proteiny byly identifikovány na základě cDNA sekvencí, s výjimkou Dorinu M, který je jediným purifikovaným lektinem z výše uvedených. U Amblyominu a Ixoderinu A-like jsou zatím známy pouze částečné cDNA sekvence. Dalším částečně charakterizovaným proteinem je lektin z *I. ricinus* o velikosti 85 kDa. V současné době ale nelze říci, zda/jaká je podobnost mezi tímto lektinem a klíšťecími proteiny FREP (Ixoderin A/B, Dorin M, DMFREPs) (L. Grubhoffer, osobní sdělení)

Na základě srovnání sekvencí domén FReD těchto proteinů s Tachylektiny 5A a 5B se předpokládá, že klíšťecí FREP proteiny mohou hrát roli v mechanismech přenosu patogenů proteiny jako Dorin M a OMFREP jsou u klíšťete *O. moubata* pravděpodobně zapojeny v řízení mechanismů přenosu spirochét *B. duttoni*, původce návratné horečky (Kovář et al., 2000, Rego et al., 2005, 2006).

3.6.1.2. Dorin M

Prvním purifikovaným a charakterizovaným proteinem z výše uvedených je plasmový lektin Dorin M syntetizovaný v hemocytech *O. moubata*. Jedná se o molekulu tvořenou nekovalentně vázanými podjednotkami o velikosti přibližně 37 kDa (velikost nativní molekuly je 640 kDa) (Kovář et al., 2000).

Stejně jako Tachylektiny 5, má i Dorin M silnou hemaglutinační aktivitu a nejlepšími vyzkoušenými inhibitory HA jsou monosacharidy obsahující N-acetylovou skupinu: N-acetylneuraminová kyselina pro Tls-5 (Gokudan, 1999) a N-acetyl-neuraminyl laktosa u Dorinu M (Kovář et al., 2000). Z glykoproteinů jsou nejlepšími inhibitory hemaglutinační aktivity sialoglykoproteiny: bovinní submaxilární mucin (BSM), fetuin a ovomukoid (Kovář et al., 2000; Rego et al., 2005, 2006). Jedná se tedy o protein s vazebnou afinitou ke kyselině sialové, jejím konjugátům a N-acetyl-hexosaminům

U Dorinu M byla sledována rovněž jeho reaktivita s různými lektiny, která může napovídat o obsahu glykanů ve struktuře proteinu. Dorin M je glykoprotein, který reagoval s lektiny ConA (*Canavalia ensiformis* agglutinin) a LCA (*Lens culinaris* agglutinin) a v menším rozsahu s lektinem WGA (wheat germ agglutinin), ale nereagoval s lektiny PNA (peanut agglutinin), SBA (soybean agglutinin) a UEA (*Ulex europaeus* agglutinin). Modifikující glykany jsou tedy charakteristické vysokým obsahem manosy a komplexních N-glykanů, přičemž hmotnostní podíl sacharidů představuje asi 14% proteinu (Kovář et al., 2000). Po chemické deglykosylaci se molekulová hmotnost každé podjednotky 37 kDa snížila přibližně o 5 kDa (Kovář et al., 2000).

Protein byl také podroben MS analýze, přičemž bylo určeno 96,6% aminokyselinové sekvence, která obsahuje tři potenciální N-glykosylační místa. Všechny tři jsou modifikovány krátkými glykany. Dva z nich obsahují devět manosových zbytků a jsou typu 'core'. Třetí glykan obsahuje 4-5 manosových zbytků a deoxyhexosu, nejpravděpodobněji fukosu, připojenou k prvnímu GlcNAc. Čtvrté, neklasické N-glykosylační místo (Asn-Xxx-Cys) (ke glykosylaci dochází jen ve specifických případech u vyšších obratlovců), není glykosylováno díky konzervativnímu Cys189, který je jeho součástí. 'Fibrinogen-like' doména molekuly Dorinu M totiž obsahuje čtyři konzervativní cysteinové zbytky Cys 32, Cys 62, Cys 189 a Cys202. Protože tyto Cys zbytky tvoří disulfidické můstky v nativní formě 'fibrinogen-like' domény, cysteinová SH-skupina, která hraje hlavní roli při modifikaci glykanů v Asn-Xxx-Cys sekvenci, je blokována v pozici Cys189, což vysvětluje pouze tři glykanové modifikace Dorinu M (Man et al., rukopis v přípravě).

Dorin M byl rovněž klonován a sekvenován. Jeho nukleotidová sekvence obsahuje 1055 bazí s otevřeným čtecím rámcem obsahujícím 837 bazí kódujících 279 aminokyselin. V jeho molekule je přítomna doména FReD s vysokou homologií k fibrinogenové doméně podobného proteinu OMFREP (63%), tachylektinů 5A (38%) a 5B (32%) (Rego et al., 2006). Stejně jako tachylektiny, i Dorin M a OMFREP postrádají 'collagen-like' doménu v N-koncové části.

3.7. Glykosylace:

Mnoho proteinů, které jsou po translaci přemístěny do lumen nebo do membrány endoplasmatického retikula se v ER mění na glykoproteiny kovalentním připojením krátkých postranních řetězců oligosacharidů. Tento proces, který je specifický pro konkrétní buněčné struktury, je prováděn glykosylačními enzymy a je jedním z hlavních ko- a post-translačních kroků při syntéze membránových, sekrečních proteinů a většiny proteinů syntetizovaných v ER.

Existují 2 typy glykosylace: N- a O- glykosylace.

N-glykany jsou vázány přes N-acetyl- β -D-glukosamin na amidový dusík v L-asparaginu. Pro tuto glykosylaci musí být přítomná signální sekvence. U eukaryotických organismů je to sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr (Marshall, 1974), přičemž Xxx může být jakákoli aminokyselina s výjimkou Pro a Asp.

O-glykany jsou vázány přes N-acetyl- α -D-galaktosamin na hydroxylovou skupinu L-serinu nebo L-threoninu. Pro O-glykany neexistuje univerzální signální sekvence.

Studie zabývající se post-translačními úpravami proteinů a zejména jejich glykosylací ukazují, že mnoho typů modifikací proteinů známých u savců se nachází i u bezobratlých.

V rámci bezobratlých jsou z hlediska deglykosylace studovány hlavně buňky hmyzu, protože umožňují produkovat rekombinantní proteiny (Jarvis et al., 1998; Kost et al., 1999; Tomiya 2004) pomocí expresního bakulovirového systému.

Hmyzí buňky, které slouží jako hostitelé infekce bakulovirového vektoru, modifikují ta samá místa (rekombinantního) proteinu oligosacharidovými postranními řetězci (glykany), která jsou N-glykosylována v nativním proteinu v savčích buňkách. Nicméně zatímco savčí buňky produkují více komplexních N-glykanů obsahujících terminální kyselinu sialovou, hmyzí buňky většinou produkují jednodušší N-glykany (truncated) s terminálními zbytky manosy (Tomiya et al., 2004; Harrison a Jarvis, 2006).

Upravování glykoproteinů na komplexní typ s koncovou N-acetyl neuraminovou (sialovou) probíhá v několika subcelulárních organelách. Nedávné studie naznačují, že upravování N-glykanů ve hmyzích buňkách zpočátku nejspíše postupuje stejnou dráhou jako u savců, ale liší se v pozdějších fázích procesu (Tomiya et al., 2004). Rozsah a typ

glykosylace se u hmyzích a savčích buněk liší díky různé míře exprese rozmanitých glykosylačních enzymů včetně glykosyltransferáz zodpovědných za vytváření struktur komplexního typu a metabolických enzymů zapojených do vytváření odpovídajících glykosyl-nukleotidů (Tomiya et al., 2004). Navíc tato strukturní rozdílnost může ovlivnit biologickou aktivitu glykoproteinů syntetizovaných ve hmyzích buňkách *in vivo* u lidí a může dokonce vyvolat u lidí alergické reakce (Harrison a Jarvis, 2006).

Glykosylace patří mezi hlavní ko- a post- translační modifikace proteinů a přestože u jiných skupin bezobratlých je její význam velmi dobře znám, u klíšťat zatím nebyla dostatečně prozkoumána. Jedním z proteinů, u kterých byl výzkum zaměřen i na studium glykosylace a post-translačních modifikací primární struktury, je první purifikovaný lektin z plasmy *O. moubata*, Dorin M (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000).

Klíšťata přenáší celou řadu patogenních mikroorganismů a jsou tak velmi významnými vektory původců infekčních nákaz. Přesto je současná znalost molekulových a buněčných faktorů rozpoznávání přenášených patogenů klíšťaty včetně příslušných proteinů v hemolymfě klíšťat na samém počátku. Jedním z molekulových faktorů účastnících se procesů přirozené imunity jsou lektiny díky jejich schopnosti rozpoznávat cukerné zbytky na povrchu patogenů. Do těchto interakcí jsou zapojeny zejména fibrinogenu podobné proteiny (FREPs) s lektinovou aktivitou, jejichž charakterizace byla dosud provedena pouze u jediného proteinu.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Zvířata

Klíšťata rodu *Dermacentor marginatus* byla získána z laboratorních kolonií chovaných ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. K pokusům byly použity dospělé samice nasáté na morčatech.

4.1.2. Chemikálie a kity

4.1.2.1. Roztoky a pufrы

Tabulka 2: Připravené roztoky a pufrы

Příprava plasmы a myších erytrocytů	Fyziologický roztok	0,15 M NaCl
	Alsever	Na 1 litr: glukóza 20,5 g, citrát sodný 8 g, kyselina citronová 0,55 g, chlorid sodný 4,2 g, pH 7,2
Hemaglutinace a inhibice hemaglutinace	Aglutinační pufr	20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2
Gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	Elektroforézový pufr (5x)	0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 0,5% SDS
	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,05% CBB R-225 ve směsi methanol:kyselina octová:destilovaná voda (50:10:40)
	Odbarvovací roztok	methanol:kyselina octová:destilovaná voda (20:10:65)
	10% SDS	10% SDS v destilované vodě
	10% APS	10% APS v destilované vodě
	Zaostřovací pufr	1 M Tris, pH 6,8
	Separáčnй pufr	1,5 M Tris, pH 8,8
	Gelový pufr (5x)	1,875 M Tris/HCl, pH 8,8
Western blotting	Blotovací pufr	20% methanol, 25 mM Tris-base, 150 mM glycin
Imunoblotting	PBS	14 mM NaCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,27 mM KCl, pH 7,2
	5% mléko	5% odtučněné sušené mléko v PBS
	PBS-Tween 20	0,05% Tween 20 v PBS
	Vyvíjecí roztok	100 mM Tris-HCl (pH 7,2), 0,6 mM 3,3'-diaminobenzidin, 0,01 % peroxid vodíku
	Primární protilátky	králíčí imunní sérum proti Dorinu M, myší imunní sérum proti HA <i>D. marginatus</i> (Laboratoř molekulární biologie vektorů a patogenů, PaÚ BC AVČR)

Afinitní chromatografie	Bup H	0,1 M (NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄), 0,15 M NaCl, pH 7,2
Příprava vzorků pro imunofluorescenci	Fixáž	paraformaldehyd 1 g, 12,2 ml dH ₂ O, 12,5 ml 0,2 M fosfátový pufr
	0,2 M Fosfátový pufr (PB)	250 ml: 14,2 g Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O, 1,36 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
	Vypírací roztok	50 ml 0,2 M PB, glukosa 4 g, 50 ml dH ₂ O
imunoznačení pro fluorescenci	Blokovací pufr	4,5 ml PBS-Tween 20, 0,5 ml kozí sérum, 3% BSA
	DABCO	5 ml: 0,125 g DABCO, 4,5 ml 99% glycerol, 0,5 ml 1x PBS
Agarózová gelová elektroforéza	TAE	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

4.1.2.2. Kity

Tabulka 3: Kity

Gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	4x Vzorkový pufr + 0,8 M DTT (Fermentas)
	5x Vzorkový pufr (Fermentas)
	4-20 % gradientové gely (Pierce)
	30% Akrylamid mix (Merck)
	TEMED (SERVA)
Imunobloting	Sekundární protilátka: prasečí anti-myší IgG značená křenovou peroxidázou SwAM/Px (SEVAC Praha), 7,5 g/ml
Detekce glykoproteinů	GelCode [®] Glycoprotein Staining Kit (Pierce)
Lektinobloting	DIG Glycan Differentiation Kit (ROCHE)
Enzymatická deglykosylace	Endo H (New England Biolabs)
	PNGasa F (New England Biolabs)
Purifikace protilátek ze séra	Melon [™] Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Scientific)
Afinitní chromatografie	MicroLink [™] Protein Coupling Kit (Pierce)
Izolace RNA	TRI REAGENT [™] (Sigma)
Izolace mRNA	PolyAtract [®] System 1000 (Promega)
Syntéza cDNA	First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
PCR	PPP Master Mix (Top-Bio)
Příprava vzorků pro sekvenaci DNA	MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)
Agarózová gelová elektroforéza	5x Orange Loading Dye Solution (Fermentas)
	O'GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

Příprava vzorků pro imunofluorescenci	LR White Resin (Polysciences, Inc)
	DABCO (Sigma)
	DAPI (Sigma), 1g/ml
	sekundární protilátka: kozí anti-myší IgG značená FITC (Sigma), koncentrace 1 mg/ml
	sekundární protilátka: kozí anti-myší IgG značená Cy3 (Jackson Immunoresearch), koncentrace 7 mg/ml

4.1.2.3 Primery (*Generi BioTech*)

Tabulka 3: Primery

označení primeru	sekvence
8AS17 - Rev	5' - KYR TAC CAC CAK SCN CC - 3'
2S19 - Forw	5' - CWG MYG GMG GRG GDT GGA C - 3'

4.2. Metody

4.2.1. Příprava plasmy

Hemolymfa byla odebírána po odstřížení části přední končetiny klíštěte. Kapky hemolymfy byly sbírány do fyziologického roztoku (hemolymfa z asi 8 klíšťat do objemu 50 µl). Po shromáždění hemolymfy ze všech klíšťat byl celý roztok centrifugován 20 minut při 14000 ot./min, 4 °C. Odebraný supernatant pak představoval čistou plasmu, která byla uchovávána při -20 °C.

4.2.2. Příprava myších erytrocytů

Myší krev byla odebrána do Alseveru; červené krvinky pak byly třikrát promyty fyziologickým roztokem při pokojové teplotě (centrifugace při 3000 ot./min, 10 min). Po poslední centrifugaci (3000 ot./5 min) byl odebrán supernatant a ke zbylým erytrocytům byl přidán fyziologický roztok tak, aby výsledná koncentrace erytrocytů byla 2 %. Připravený roztok byl použit k testům hemaglutinační aktivity a inhibice hemaglutinace.

4.2.3. Hemaglutinace a inhibice hemaglutinace

Určení hemaglutinační aktivity (HA) bylo prováděno v mikrotitračních deskách (96 jamek, typ U) pravidelným ředěním dvojkovou řadou 50 µl vzorku v 50 µl aglutinačního pufru a následným přidáním 50 µl 2%-ní suspenze erytrocytů. Titr HA byl odečten po 1h inkubace při pokojové teplotě a vyjádřen jako reciproká hodnota nejvyššího ředění vzorku plasmy, při kterém bylo ještě možné zaznamenat pozitivní aglutinační reakci.

Vazebná specifita plasmatických lektinů byla stanovena pomocí testu inhibice hemaglutinace s vybranými inhibitory (sacharidy, glykokonjugáty). V mikrotitračních deskách bylo dvojkovou řadou naředěno 50 µl inhibitoru v aglutinačním pufru, do kterého bylo přidáno 50 µl plasmy naředěné na titr HA 1,5. Nakonec bylo přidáno 50 µl 2 % roztoku erytrocytů.

Koncentrace inhibitoru potřebná ke snížení HA o 50 % byla odečtena jako nejnižší koncentrace inhibitoru schopná zcela inhibovat HA 1,5.

4.2.4. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Separace proteinů podle molekulové velikosti probíhala polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. SDS-PAGE byla provedena podle Laemmliho (1970) na připravených jednokontračních gelech a 5-17,5 % gradientových gelech, a na 4-20 % gradientových gelech (Pierce). Jednokontrační a 5-17,5 % gradientové gely byly použity s Tris-glycinovým elektroforézovým pufrem pro detekci glykoproteinů, imunobloting, deglykosylace a pro afinitní chromatografii; 4-20 % gradientové gely byly použity s Tris-HEPES elektroforézovým pufrem pro lektinobloting. Gely byly připraveny následujícím způsobem:

Tabulka 4: Příprava jednokontračních gelů

Jednokontrační gel			
zaostřovací část (5 %)	objem	separační část (12 %)	objem
30 % akrylamid mix	0,33 ml	30 % akrylamid mix	2 ml
1M Tris (pH 6,8)	0,25 ml	1,5M Tris (pH 8,8)	1,3 ml
destilovaná voda	1,4 ml	destilovaná voda	1,7 ml
10 % SDS	0,02 ml	10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,02 ml	10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	TEMED	0,002 ml

Tabulka 5: Příprava gradientových gelů

Gradientový gel			
„lehký“ gel (5 %)	objem	„těžký“ gel (17,5 %)	objem
30 % akrylamid mix	3,75 ml	30 % akrylamid mix	10,2 ml
gelový pufr (5x)	4,5 ml	gelový pufr (5x)	3,5 ml
destilovaná voda	14,94 ml	destilovaná voda	2,55 ml
glycerol	-	glycerol	3,5 ml
10 % SDS	0,225 ml	10 % SDS	0,175 ml
10 % APS	0,09 ml	10 % APS	0,03 ml
TEMED	0,005 ml	TEMED	0,005 ml

Elektroforéza probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli při 100V. Vzorky byly kvůli vysoké koncentraci proteinů naředěny 1:5 ve fyziologickém roztoku, smíchány s odpovídajícím množstvím 4x vzorkového pufru (s DTT – redukující) popřípadě 5x vzorkového pufru (bez DTT – neredukující) a zahřívány 3 minuty při 95 °C. K určení molekulových velikostí byl použit proteinový standard (SDS-PAGE) a značený proteinový standard (blotovací techniky).

Gely byly barveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250.

Při použití Tris-HEPES elektroforézového pufru (SDS-PAGE pro lektinoblot) lze pozorovat mírně odlišnou migraci proteinů v porovnání s dělením proteinů v Tris-glycinovém pufru (SDS-PAGE pro ostatní blotovací techniky).

4.2.5. Blotovací techniky

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu (NC) (Schleicher & Schuell) pomocí aparatury Trans-blot (Bio-Rad) metodou podle Towbina et al. (1979). Membrána byla použita k identifikaci proteinů protilátkami, k detekci glykoproteinů a k určení glykanů na jejich povrchu.

4.2.5.1. Immunoblotting

Membrána byla promyta PBS puftrem (cca 50 ml), nakrájena na proužky a inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě v 5 % odstředěném sušeném mléce v PBS.

Proužky membrány byly následně inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C s králičím polyklonálním imunním sérem proti Dorinu M, ředěném 1:50 v 5 % mléce, promyty v PBS-Tween 20 (1 ml na proužek) a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C s protilátkou SwAM/Px ředěnou 1:1000 v 5 % mléce. Po

inkubaci byly proužky membrány opět promyty v roztoku PBS-Tween 20 (1 ml na proužek). Reakce probíhala ve vyvíjecím roztoku obsahujícím peroxid vodíku.

4.2.5.2. Detekce glykoproteinů

Glykosylované proteiny byly detekovány kitem GelCode® Glycoprotein Staining (Pierce). Proteiny plasmy *D. marginatus* byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a barveny přesně podle instrukcí výrobce.

4.2.5.3. Lektinobloting

K určení vazebné specifity proteinů byly použity lektiny (DIG Glycan Differentiation Kit, ROCHE) konjugované se steroidním hapténem digoxigeninem (DIG). Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Dle postupu, doporučeného výrobcem, bylo provedeno značení jednotlivými lektiny (GNA, SNA, DSA, MAA, PNA) a následná inkubace s anti-DIG protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Po důkladném promytí byla membrána ponořena do roztoku NTB/BCIP, v kterém probíhala reakce.

Jako pozitivní kontrola sloužily glykosylované proteiny karboxypeptidáza Y (pro GNA), transferin (pro SNA), fetuin (pro SNA, MAA, DSA) a asialofetuin (pro PNA, DSA).

Tabulka 6: původ a vazebná specifita použitých lektinů

lektin	Původ	vazebná specifita
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	terminální manosa
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	sialová kyselina, terminálně připojená (2-6) ke galaktose nebo N-acetyl-galaktosaminu
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	sialová kyselina terminálně připojená (2-3) ke galaktose
PNA	peanut agglutinin	galaktóza-β(1-3)-N-acetyl-galaktosamin
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin	galaktóza-β(1-4)-N-acetyl-glukosamin N-acetyl-glukosamin

4.2.6. Příprava myšního polyklonálního séra

Proteiny plasmy *D. marginatus* byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a obarveny pomocí CBB R-250. Příslušné proteiny byly vyřezány z gelu a homogenizovány s 60 µl PBS (1x). K homogenátu bylo přidáno nekompletní Freundovo Adjuvans (SERVA) v poměru 1:1 a směs (80 µl) byla podkožně injikována BALB/c myším. Imunizace byla opakována celkem 4x vždy po 14 denních intervalech. 14 dní po poslední imunizaci byla myším odebrána krev a po koagulaci byla centrifugována (10000 ot./min, 4 °C). K odebranému séru byl přidán stejný objem glycerolu. Takto připravené protilátky byly uchovávány při -20 °C.

Imunní séra byly použity k charakterizaci proteinů po deglykosylaci, izolaci proteinů pomocí afinitní chromatografie a imunoznačení pro fluorescenci atd.

4.2.7. Enzymatická deglykosylace

Proteiny plasmy byly deglykosylovány enzymy PNGasou F a Endo H (New England Biolabs). V případě deglykosylace PNGasou F bylo 68 µl plasmy smícháno s 15 µl denaturačního pufru a s 35 µl destilované vody. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo přidáno 15 µl G7 pufru, 15 µl NP-40 a 2 µl PNGasy F. Deglykosylace probíhala přes noc při 37 °C. Pro enzym Endo H bylo smícháno 68 µl plasmy se 7,5 µl denaturačního pufru a 72 µl destilované vody. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Po přidání 2 µl Endo H probíhala deglykosylace přes noc při 37 °C.

4.2.8. Afinitní chromatografie

4.2.8.1. Purifikace protilátek ze séra

Myší polyklonální monospecifická protilátka proti proteinu DMFREP2 byla ze séra purifikována MelonTM Gel IgG Spin Purification Kitem (Thermo Scientific). Sérum bylo naředěno 1:10 a nanášeno na kolonu v Melon Gel Purification pufru. Následná purifikace probíhala přesně podle firemních instrukcí.

4.2.8.2. Purifikace proteinů afinitní chromatografií

Pro afinitní chromatografii byl použit MicroLink™ Protein Coupling Kit (Pierce) a izolace probíhala podle instrukcí výrobce v případě a) nebo s malými změnami v případě b).

a) Jako ligand byl na základě inhibice HA vybrán BSM, který byl navázán na AminoLink® Plus Coupling Gel Spin kolony. Takto připravená kolona s imobilizovanými proteiny byla inkubována s naneseným vzorkem a promyta centrifugací kvůli odstranění ostatních nenavázaných proteinů plasmy. V posledním kroku byly izolované proteiny vymyty elučním pufrem obsahujícím primární aminy.

Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly posléze zakoncentrovány: k jednotlivým frakcím byla přidána 20% TCA (trichloroctová kyselina) v acetonu ve stejném objemu, jaký měly jednotlivé frakce. Po srážení 1 hodinu ve 4°C, jsem směs centrifugovala při 14000 ot./min 30 min ve 4°C. Pelet byl promyt ledovým acetonem. Po centrifugaci (14000 ot./min, 30 min, 4°C) byl supernatant odsán a proteiny vysušeny. Vysrážené proteiny byly rozpuštěny v 50 µl deionizované vody. Takto připravené vzorky byly analyzovány SDS-PAGE.

b) Pro imunoafinitní chromatografii byla na kolonu jako ligand navázána purifikovaná protilátka Ab2. Chromatografie probíhala stejným způsobem jako v případě a) s tím rozdílem, že kolona byla promyta 0,3 M roztokem NaCl a elučním pufrem s 1 M močovinou. Frakce byly zakoncentrovány centrifugací (3000 ot./min) na kolonách Ultrafree®-CL (cut-off 30 000 NMWL), smíchány s neredukujícím vzorkovým pufrem a vizualizovány akrylamidovou elektroforézou. Identita izolovaných proteinů byla potvrzena inumoblotem s protilátkami Ab2.

4.2.9. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita nasátá klíš'ata *D. marginatus* (25 samic).

4.2.9.1. Příprava vzorků

Klíšťata byla rozdělena na dvě skupiny po 12 a 13 kusech a zhomogenizována ve zkumavce v roztoku TRI REAGENT™ (Sigma) (13 klíšťat) a TRI REAGENT BD™ (Sigma) (12 klíšťat) v poměru 1 ml roztoku na 50 – 100 mg tkáně. Oba vzorky se nechaly stát 5 min při pokojové teplotě a posléze k nim bylo přidáno 0,2 ml. Po promíchání byly vzorky inkubovány 5 min při pokojové teplotě a centrifugovány při 12000 ot./min po dobu 15 minut při 4°C. Horní čiré fáze obou vzorků obsahující RNA byly odebrány do nové mikrozskumavky.

4.2.9.2. Vlastní izolace RNA

Ke vzorkům bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu na 1 ml TRI REAGENTU™ použitým při jejich přípravě. Vzorky byly promíchány a inkubovány 5-10 min při pokojové teplotě. Směs byla následně centrifugována 10 minut při 12000 ot./min a 4°C. Supernatant byl odebrán a k peletu obsahujícím RNA byl přidán 1 ml 75% etanolu na 1 ml TRI REAGENTU™. Vzorky byly promíchány a 10 minut centrifugovány při 12000 ot./min a 4°C. Pelet RNA byl vysušen a ihned použit pro izolaci mRNA.

4.2.10. Izolace mRNA

mRNA byla izolována kitem PolyAtract® System 1000 (Promega) z celkové izolované RNA dle návodu výrobce. Při izolaci byly využity paramagnetické částice konjugované s polyT oligonukleotidem, který selektivně váže polyadenylovaný konec mRNA. Po promytí byla mRNA rozpuštěna v destilované vodě (bez přítomných DNáz a RNáz).

4.2.11. Syntéza cDNA

Byla provedena pomocí First Strand cDNA Synthesis Kitu (Fermentas) s použitím oligo(dT)₁₈ primeru (0,5 µg/µl) dle návodu výrobce. Připravená cDNA byla uchovávána při -70 °C.

4.2.12. PCR

cDNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce se specifickými degenerovanými primery (2S19-Forw, 8AS17-Rev) navrženými podle nukleotidové sekvence Dorinu M (GenBank AF527411).

Příprava reakční směsi:	PPP Premix	10 µl
	2S19-Frow (0,01 mM)	1 µl
	8AS17-Rev (0,01 mM)	1 µl
	cDNA	1 µl
	DEPC voda	7 µl

Amplifikační reakce byla prováděna v 0,2 ml tenkostěnné zkumavce, v přístroji Mastercycler (Eppendorf) za následujících podmínek:

1. Denaturace DNA.....96 °C.....2 minuty
2. 35 cyklů: denaturace DNA.....96 °C....45 sekund
nasedání primerů.....48 °C....45 sekund
elongace...72 °C....30 sekund
3. Konečná elongace.....72 °C.....2 minuty

4.2.13. Elektroforéza

Pro analýzu amplifikované DNA bylo 20 µl vzorku smícháno s 5 µl vzorkového pufru (5x koncentrovaného) obsahujícího fluorescenční barvivo SYBR Green (také 5x koncentrované) a směs byla nanášena na 1 % agarózový gel v TAE pufru. Jako marker byl použit O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Elektroforéza probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli při 150 V po dobu 30 min. DNA byla vizualizována na UV iluminátoru.

4.2.14. Imunofluorescence

4.2.14.1. Příprava vzorků

Z nasátých samic *D. marginatus* byly odebrány hemocyty a vypitvány střeva a slinné žlázy. Materiál byl fixován v roztoku 4% formaldehydu a 0,1% glutaraldehydu 3 hodiny při 4°C. Vzorky byly promyty ve vypíracím roztoku přes noc při 4°C. Hemocyty a

orgány byly zalaty do 10 % želatiny při 37 °C a po ztuhnutí byly promyty ve vypíracím roztoku. Posléze byly odvodněny následujícím způsobem:

30% etanol	15 min
50% etanol	15 min
70% etanol	15 min
80% etanol	15 min
90% etanol	15 min
95% etanol	15 min

Vzorky byly prosyceny v roztocích pryskyřice LR White s 95 % etanolem:

pryskyřice + 95% etanol 1:2	1 h
pryskyřice + 95% etanol 1:1	1 h
pryskyřice + 95% etanol 2:1	1 h
čistá pryskyřice	přes noc

Hemocyty a jednotlivé orgány byly zalaty pryskyřicí do želatinových kapslí. Polymerizace trvala 2 dny při 50°C. Polotenké řezy (500 nm) byly nakrájeny na mikrotomu (Reichert), přeneseny na podložní sklíčko (SuperFrost® Plus) a usušeny.

4.2.14.2. Imunozačnění

Řezy na podložním sklíčku byly inkubovány při pokojové teplotě v blokovacím roztoku 1,5 hodiny; dále v primární protilátce ředěné 1:20 v PBS přes noc při 4 °C. Následně byly vzorky promyty 6x po 4 minutách v PBS-Tween 20, inkubovány 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě se sekundární protilátkou ředěnou 1:60 (IgG konjugovaná s FITC) nebo 1:100 (IgG konjugovaná s Cy3) a opět promyty PBS-Tween 20. Jádra buněk byla barvena DAPI v PBS (1:1000) po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě. Vzorky byly poté promyty PBS-Tween 20 a po usušení zalaty do média DABCO. Řezy byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX-60) a fotografie snímány kamerou Olympus C-3030 ZOOM. Obrázky byly upraveny a složeny v programu Adobe Photoshop.

5. VÝSLEDKY

5.1. Hemaglutinační aktivita a inhibice hemaglutinace

Hemaglutinační aktivita (HA) (přítomnost lektinů) byla detekována s použitím 2% suspenze myších červených krvinek, které se v předchozích pokusech na bezobratlých a klíšťatech *I. ricinus* a *O. moubata* ukázaly být nejvhodnější.

Pro zjištění vazebné specifity lektinů byl proveden také test inhibice HA, jehož výsledky ukazuje tabulka 1. Jako inhibitory sloužily jednoduché sacharidy (D-glukosamin, D-galaktosamin, D-manosamin, L-fukosa, trehalosa, stachyosa, D-deoxy-D-galaktosa, sacharosa, N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin, N-acetyl-D-manosamin, N-acetyl-D-neuraminová kyselina), polysacharidy (kyselina polysialová), i glykoproteiny (bovinní submaxilární mucin – BSM, prasečí submaxilární mucin – PSM, fetuin, asialofetuin a ovomukoid).

Tabulka 7: Inhibice hemaglutinace

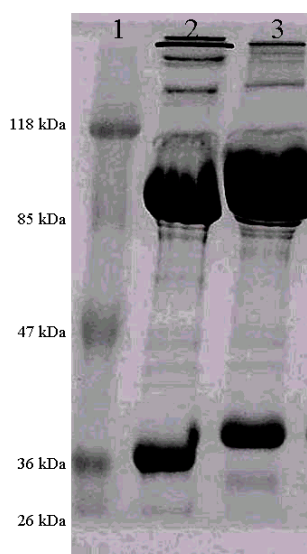
Inhibitor	Koncentrace odpovídající 50% inhibici (mol/l)
D-glukosamin	-
D-galaktosamin	-
D-manosamin	-
L-fukosa	-
Trehalosa	-
Stachyosa	-
2-deoxy-D-galaktosa	-
Sacharóza	-
N-acetyl-D-glukosamin	0,125
N-acetyl-D-galaktosamin	0,125
N-acetyl-D-manosamin	0,125
N-acetyl-D-neuraminová kyselina	0,063
	koncentrace (mg/ml)
Polysialová kyselina	0,208
Fetuin	1,67
Asialofetuin	3,33
PSM	5
BSM	0,00244
Ovomukoid	0,208

koncentrace inhibitorů. v zásobních roztocích byla 0,5 mol/l (sacharidy) a 5 mg/ml (glykokonjugáty)

Nejlepším inhibítozem ze sacharidů se ukázala být kyselina neuraminová, dobrý inhibiční efekt ukázaly i N-acetyl-D-hexosaminy. Z testovaných glykoproteinů silně inhibovaly hemaglutinaci sialoglykoproteiny (BSM, fetuin, ovomukoid), z nichž nejsilnějším inhibítozem byl bovinní submaxilární mucin (BSM). HA dále inhibovaly polysialová kyselina, PSM a asialofetuin. Z výsledků pokusu lze usoudit, že lektiny přítomné v hemolymfě *D. marginatus* jsou specifické pro kyselinu sialovou a její konjugáty.

5.2. SDS-PAGE

Elektroforeticky separované neredukované i redukované proteiny plasmy ukazuje Obr. 1. Proteiny plasmy byly smíchány s redukujícím respektive neredukujícím vzorkovým pufrem a následně byly rozděleny podle jejich molekulové velikosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Po obarvení gelu barvivem Coomassie Brilliant Blue CBB R-250 byl získán elektroforetický profil proteinů plasmy *D. marginatus*.



Obrázek 1: SDS-PAGE s neredukovanými a redukovanými plasmovými proteiny barvenými CBB.

1 – molekulový standard

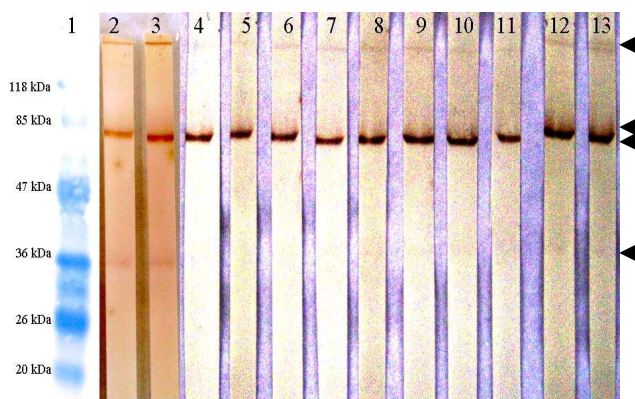
2 – neredukované proteiny plasmy

3 – redukované proteiny plasmy

Z obrázku je zřejmé, že proteiny v redukujícím prostředí odpovídající proteinům v neredukujícím mají větší velikost (způsobeno rozrušením S-S můstků), a že je plasma tvořena směsí velkého množství proteinů s širokým spektrem molekulových velikostí.

5.3. Immunobloting

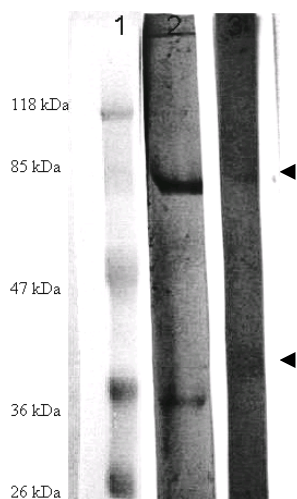
Proteiny FREP/lektiny *D. marginatus* rozdělené v SDS-PAGE za neredukujících podmínek byly identifikovány metodou imunoblotingu s primárními protilátkami proti FREP *O. moubata* a s primárními protilátkami proti HA plasmě *D. marginatus*. K pokusu byly použity dvě polyklonální monospecifické myší (BALB/c) protilátky proti HA *D. marginatus* (jamky 2, 3) a deset králičích protilátek proti Dorinu M (jamky 4-13) (Obr. 2).



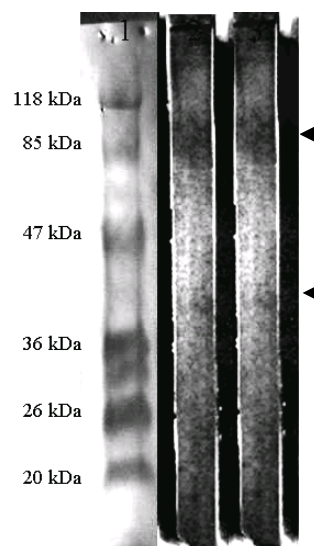
Obrázek 2: Imunobloting neredukovaných proteinů plasmě. 1 – značený molekulový standard
2, 3 – detekce myšími protilátkami proti HA *D. marginatus* (ředění 1:10)
4 – 13 – detekce králičími protilátkami proti Dorinu M (*O. moubata*) (ředění 1:10)

Všechny protilátky reagovaly s proteiny velkými přibližně 36 kDa (pojmenován DMFREP1), 79/80 kDa (DMFREP2/3) a 177 kDa (DMFREP4). Proteiny DMFREP 2 a 3 jsou pravděpodobně izoformy jednoho proteinu, protože se jejich molekulové hmotnosti liší pouze o 1 kDa. Současně byla ověřena použitelnost protilátek proti Dorinu M další pokusy.

Obdobně byly detekovány i redukované proteiny FREP s použitím králičí monospecifické protilátky proti Dorinu M a polyklonálních myších protilátek proti HA hemolymfy *D. marginatus*. Obr. 3 ukazuje porovnání redukovaných a neredukovaných proteinů rozpoznaných protilátkou anti-Dorin M; na Obr. 4 je reakce protilátek anti-HA *D. marginatus* s redukovanými proteiny.



Obrázek 3: Imunobloting redukovaných proteinů plasmy.
 1 – značený molekulový standard
 2 – detekce protilátkou anti-Dorin M (ředění 1:10)
 3 – detekce protilátkou anti-Dorin M (ředění 1:10)

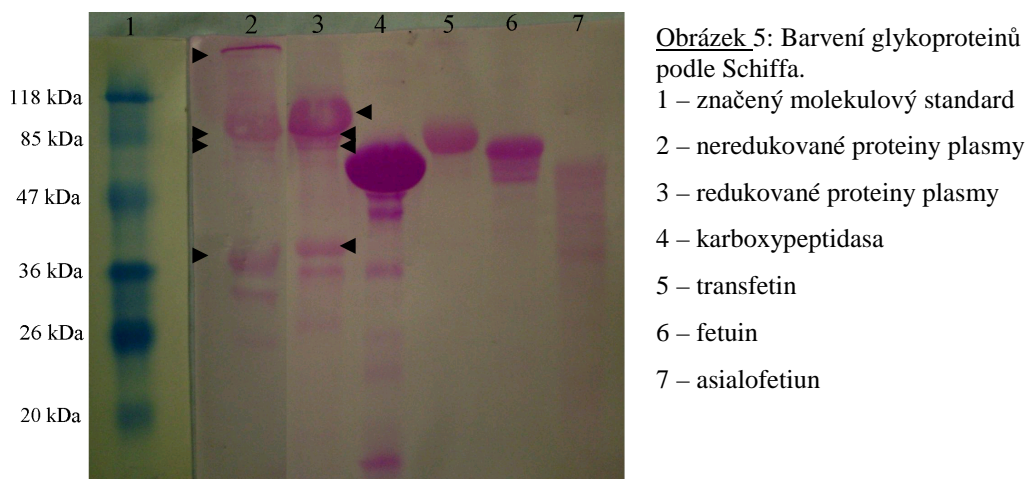


Obrázek 4: Imunobloting redukovaných proteinů plasmy.
 1 – značený molekulový standard
 2 – detekce protilátkou anti-HA *D. marginatus* č. 1 (ředění 1:50)
 3 – detekce protilátkou anti-HA *D. marginatus* č. 2 (ředění 1:50)

U redukovaných proteinů byly protilátkou proti Dorinu M i myšími protilátkami proti HA plasmy *D. marginatus* rozpoznány pouze dva proužky o velikostech přibližně 40 kDa a 90 kDa.

5.4. Detekce glykoproteinů

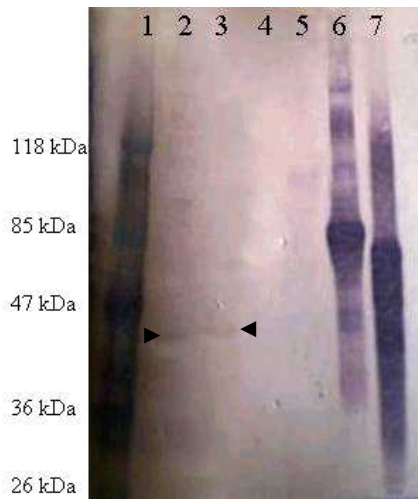
Předpoklad, že identifikované proteiny FREP jsou glykosylovány byl potvrzen barvením glykoproteinů podle Schiffa (GelCode[®] Glycoprotein Staining Kit – Pierce). Proteiny plasmy byly rozděleny SDS-PAGE v neredukujících i redukujících podmínkách (Obr. 4). Jako pozitivní kontrola byly použity standardní glykoproteiny (ROCHE).



Všechny čtyři proteiny FREP nesou ve své molekule glykany, neboť při barvení na glykoproteiny poskytovaly pozitivní reakci.

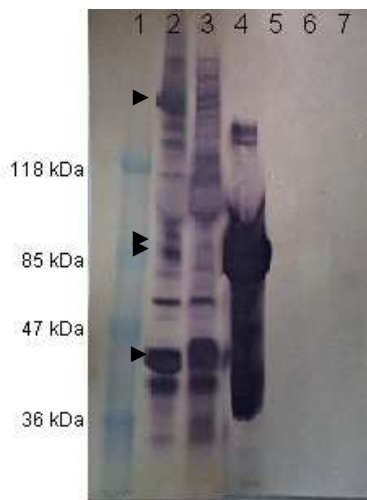
5.5. Lektinobloting

Na základě zjištění, že identifikované proteiny FREP jsou glykosylovány, byl proveden lektinobloting s vybranými lektiny (SNA, DSA, MAA, GNA, PNA – DIG Glycan Differentiation Kit, ROCHE) pro určení charakteru a složení jejich glykanů (Obr. 5, 6, 7). Jako pozitivní/negativní kontrola sloužily glykoproteiny karboxypeptidáza Y (pozitivní reakce s GNA), transferin (pozitivní reakce s SNA), fetuin (pozitivní reakce s SNA, MAA, DSA) a asialofetuin (pozitivní reakce s PNA, DSA).



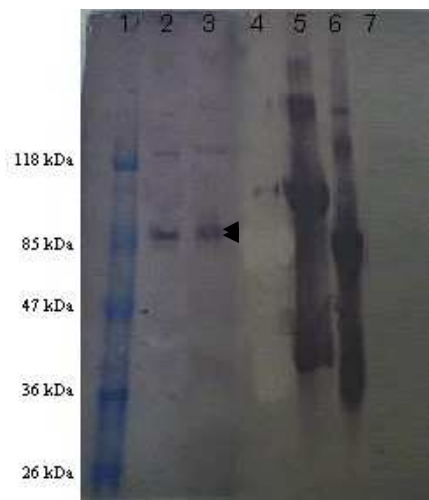
Obrázek 8: lektinobloting – lektin DSA.

- 1 – značený molekulový standard
- 2 – plasma DM neredukovaná
- 3 – plasma DM redukováná
- 4 – fetuin
- 5 – asialofetuin



Obrázek 6: lektinobloting – lektin GNA.

- 1 – značený molekulový standard
- 2 – plasma DM neredukovaná
- 3 – plasma DM redukováná
- 4 – karboxypeptidáza Y
- 5 – transferin
- 6 – fetuin
- 7 – asialofetuin



Obrázek 7: lektinobloting – lektin SNA.

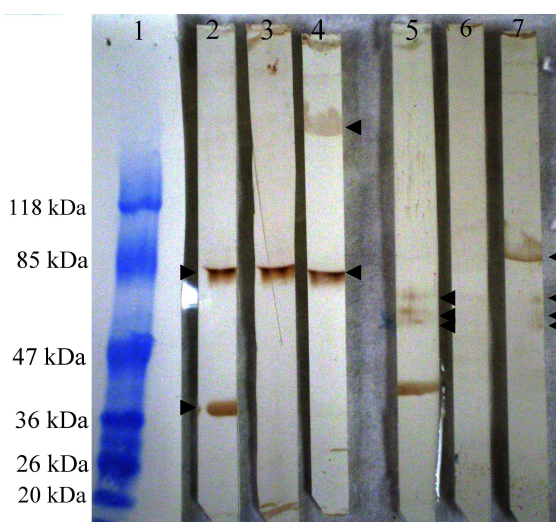
- 1 – značený molekulový standard
- 2 – plasma DM neredukovaná
- 3 – plasma DM redukováná
- 4 – karboxypeptidáza Y
- 5 – transferin
- 6 – fetuin
- 7 – asialofetuin

Značení pomocí lektinů ukázalo, že protein DMFREP1 reagoval pozitivně s lektiny GNA a DSA; proteiny DMPREP2/3 byly rozeznány lektiny GNA a SNA a protein DMFREP4 byl na membráně detekován pouze při značení lektinem GNA

S lektiny MAA a PNA proteiny FREP nereagovaly.

5.6. Příprava myších (BALB/c) polyklonálních sér

Proti proteinům DMFREP identifikovaných imunoblotingem byly připraveny myší polyklonální monospecifické protilátky Ab1,2,3 (Obr 9.). Protilátka Ab1 byla připravena proti proteinu DMFREP1, Ab2 proti proteinu DMFREP2 a Ab3 proti proteinu DMFREP4.



Obrázek 9: imunobloting neredukovaných proteinů plasmy s využitím protilátek proti DMFREP1, 2 a 4.

1 – značený molekulový standard

2 – detekce protilátkou Ab1 (ředění 1:1000)

3 – detekce protilátkou Ab2 (ředění 1:1000)

4 – detekce protilátkou Ab3 (ředění 1:1000)

5 – detekce protilátkou Ab1 (ředění 1:1000)

6 – detekce protilátkou Ab2 (ředění 1:1000)

7 – detekce protilátkou Ab3 (ředění 1:1000)

Je zřejmé, že Ab1 v neredukovaném a redukovaném vzorku rozeznává kromě proteinu DMFREP1, proti kterému byla připravena, i DMFREP2 a 3; v redukovaném vzorku se místo těchto proteinů objevily na membráně tři proužky o velikosti přibližně 58 kDa, 60kDa a 66 kDa;

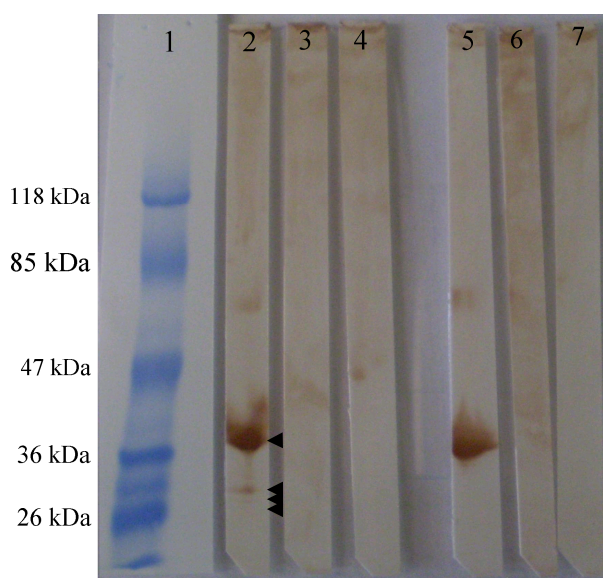
Ab 2 reaguje v neredukovaném vzorku s proteiny DMFREP2 a 3, přestože byla připravena pouze proti DMFREP2; v redukovaném vzorku protilátka Ab 2 nerozeznává žádný protein.

Ab 3 připravená proti DMFREP4 reagovala kromě tohoto proteinu ještě s neredukovanými DMFREP2 a 3. V redukovaném vzorku došlo k reakci Ab3 s proteiny o velikosti asi 90 kDa a 86 kDa a se třemi proteiny 58 kDa, 60 kDa a 66 kDa, které byly detekovány i protilátkou Ab1.

Obrázek 7 také mimo jiné ukazuje, že Ab1, 2 i 3 reagují nejsilněji s DMFREP2 a 3 i přesto, že proti těmto proteinům (proti izoformě DMFREP2) byla přímo připravena pouze Ab2.

5.7. Enzymatická deglykosylace

Glykany vázané na zkoumané proteiny byly charakterizovány pomocí deglykosylace těchto proteinů glykosidázami PNGasou F a Endo H. Deglykosylované proteiny byly detekovány imunoblotingem za využití odpovídajících protilátek proti proteinům DMFREP, díky čemuž byly posléze určeny velikosti neglykosylovaných proteinů i podíl glykanů na molekulové hmotnosti nativních (glykosylovaných) proteinů (Obr. 10, 11).



Obrázek 10: imunobloting deglykosylovaných neredukovaných proteinů plasmy.

1 – značený molekulový standard

2 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab1

3 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab2

4 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab3

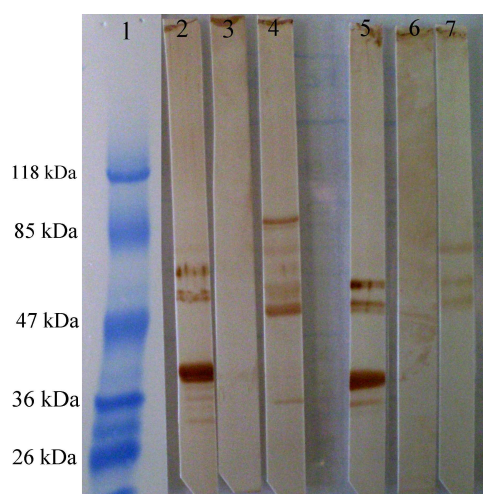
5 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab1

6 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab2

7 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab3

Protilátka Ab1 detekovala v neredukovaném vzorku plasmy deglykosylované enzymem PNGasa F čtyři proteiny o velikosti 29 kDa, 31 kDa, 32 kDa, 36 kDa; po deglykosylaci proteinů Endo H rozpoznala Ab1 pouze DMFREP1.

Ostatní protilátky nereagovaly s žádným proteinem ošetřeným PNGasou F ani Endo H.



Obrázek 11: lektinoblotting deglykosylovaných redukováných proteinů plasmy.

1 – značený molekulový standard

2 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab1 (ředění 1:1000)

3 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab2 (ředění 1:1000)

4 – deglykosylace PNGasou F a detekce protilátkou Ab3 (ředění 1:1000)

5 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab1 (ředění 1:1000)

6 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab2 (ředění 1:1000)

7 – deglykosylace Endo H a detekce protilátkou Ab3 (ředění 1:1000)

U redukováných vzorků detekovala protilátka Ab1 po ošetření proteinů plasmy enzymem PNGasou F pět proteinů o velikosti 31 kDa, 33 kDa, 34 kDa, 37 kDa a 40 kDa. Ve vzorku deglykosylovaném enzymem EndoH reagovala protilátka Ab1 se třemi proužky o velikosti 32 kDa, 33kDa a 40 kDa. Ve vzorcích deglykosylovaných oběma enzymy a rozdělených SDS-PAGE za redukujících podmínek interagovala protilátka Ab1 také se třemi proteiny o velikostech 54 kDa, 58 kDa a 63 kDa, které rozeznala i ve vzorku plasmy neošetřené glykosidázami.

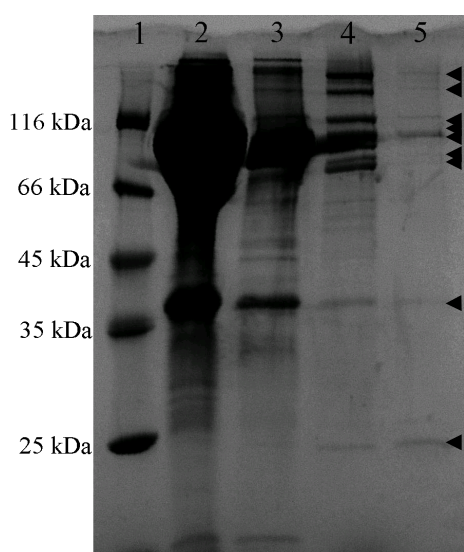
Protilátka Ab2 nedávala žádnou specifickou reakci.

Ab3 detekovala u redukováných proteinů rozdělených na membráně několik proužků. U vzorku plasmy deglykosylované enzymem PNGasa F poskytovala protilátka Ab3 reakci se sedmi proteiny o velikostech 54 kDa, 58 kDa, 63 kDa, 74 kDa, 86kDa a 90 kDa; u vzorku plasmy ošetřeného enzymem EndoH detekovala stejná protilátka čtyři proteiny s molekulovou velikostí 54 kDa, 58 kDa, 63 kDa a 78 kDa. Zdá se tedy, že proteiny 54 kDa, 58 kDa a 63 kDa rozpoznávané Ab3 odpovídají proužkům, které detekovala i protilátka Ab1 po deglykosylaci oběma enzymy (Obr. 11, proužky 2, 5).

5.8. Afinitní chromatografie

Pro purifikaci proteinů FREP z plasmy klíštěte *D. marginatus* bylo použito několik metod.

Na základě vazebné specifity těchto proteinů k sacharidům a glykoproteinům byl zvolen jako makromolekulární ligand bovinní submaxilární mucin, glykoprotein s nejvyšším inhibičním efektem HA. Proteiny v jednotlivých frakcích byly smíchány s redukujícím vzorkovým pufrům a rozděleny SDS-PAGE elektroforézou (obr. 12).



Obrázek 12 : SDS-PAGE s frakcemi z afinitní chromatografie (ligand BSM).

1 – molekulový standard

2 – redukované proteiny plasmy, které se nezachytily na koloně

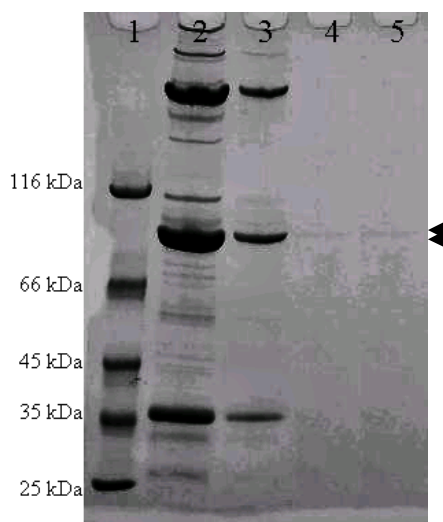
3 – frakce vymytá z kolony pomocí 0,5 M NaCl

4 – frakce vymytá z kolony pomocí Bup H

5 – purifikované proteiny.

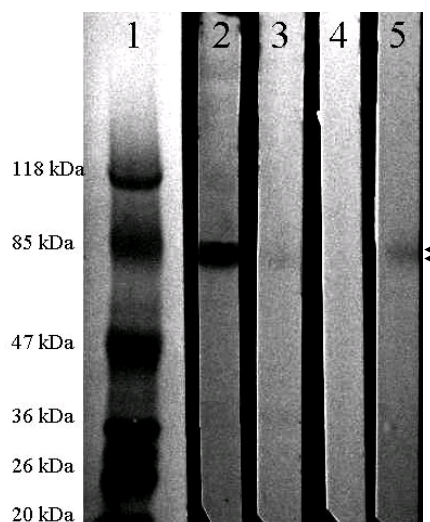
Gel s redukovanými frakcemi z afinitní chromatografie ukazuje, že se touto metodou podařilo zachytit všechny identifikované proteiny FREP, společně s dalšími třemi proteiny o velikosti 150 kDa, 145 kDa a 25 kDa.

Další metodu izolace zkoumaných proteinů FREP byla imunoafinitní chromatografie se specifickou polyklonální myší protilátkou proti DMFREP2. Zachycené proteiny byly analyzovány SDS-PAGE (Obr. 13) a imunoblotingem (Obr 14).



Obrázek 13: SDS-PAGE s frakcemi z afinitní chromatografie s použitím protilátky Ab2.

- 1 – značený molekulová standard
- 2 – neredukované proteiny plasmy, které se nezachytily na koloně
- 3 – frakce vymytá z kolony 0,5 M NaCl
- 4 – frakce vymytá z kolony Bup H pufrem
- 5 – frakce vymytá z kolony Elučním pufrem



Obrázek 14: imunobloting neredukovaných proteinů plasmy

- 1 – značený molekulová standard
- 2 – neredukované proteiny plasmy, které se nezachytily na koloně, detekce Ab2
- 3 – frakce vymytá z kolony 0,5 M NaCl, detekce Ab2
- 4 – frakce vymytá z kolony Bup H pufrem, detekce Ab2
- 5 – frakce vymytá z kolony Elučním pufrem, detekce Ab2

Protein zachycený kolonou se shoduje svou molekulovou velikostí s proteinem DMFREP2/3, což bylo potvrzeno i imunoblotem s Ab2, kde byl ve frakci s elučním pufrem detekován pouze DMFREP2/3.

5.9. Imunofluorescence

Proteiny DMFREP byly lokalizovány v orgánech a hemocytech částečně nasátého klíštěte *D. marginatus* (Obr. 1., 2.). Imunofluorescence ukázala, že DMFREP1 je přítomen v epiteliálních buňkách acinů typu III (obr. 1. B., ale nelokalizuje se do granul těchto acinů; naopak se nachází v sekrečních granulích acinů typu II, na membránách buněk (Obr. 1. C) a na povrchu acinů typu II (Obr. 1.C, Obr. 2. A). DMFREP1 se také nachází ve střevních buňkách (Obr.1. A) a cytoplasmě některých hemocytů (Obr. 2. A-B).

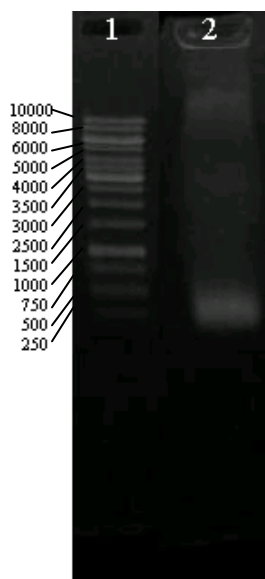
DMFREP2 se nachází uvnitř střevních buněk (obr. 1. D-E) a stejně jako DMFREP1 i v cytoplasmě některých hemocytů. Překvapivě byl DMFREP2 lokalizován jen u hemocytů nacházejících se v těsné blízkosti slinných žláz (Obr.2. C). Žádná reakce nebyla zaznamenána na řezech hemocytů získaných přímo z hemolymfy klíštěte. Pozitivně reagovaly také chitinové struktury tracheol (Obr.1. F).

DMFREP4 byl lokalizován na povrchu (Obr.1. G) a uvnitř některých buněk střev (obr. 1. H); dále v buňkách slinného vývodu (Obr, 1. I) a jeho chitinové výstelce (obr. 1. J).

Kontrolní řezy byly značeny pouze sekundární protilátkou a nebyla na nich detekována žádná pozitivní reakce (Obr. 1. K, L).

5.10. Sekvence genů proteinů FREP

S využitím degenerovaných primerů navržených na základě známé sekvence fibrinogenové domény Dorinu M byl z izolované mRNA pomocí reverzní transkripce a PCR amplifikován úsek DNA, kódující část molekuly proteinů FREP u *D. marginatus*.



Obrázek 15: elektroforéza s amplifikovaným úsekem DNA
1 - molekulový standard
2 - amplifikovaná DNA

6. DISKUZE

Cílem práce bylo detekovat přítomnost lektinů/proteinů FREP v plasmě klíštěte *D. marginatus* testem HA, identifikovat konkrétní proteiny FREP pomocí specifických protilátek proti proteinům FREP jiných druhů klíšťat a charakterizovat tyto proteiny metodami analytické biochemie a fluorescenční mikroskopie. Další cíl zahrnoval přípravu polyklonálních monospecifických protilátek a izolaci proteinů FREP afinitní chromatografií.

6.1. Lektiny/proteiny FREP v plasmě *D. marginatus*

Jelikož je charakteristickou vlastností lektinů schopnost aglutinovat erytrocyty, byl pro detekci lektinů v plasmě *D. marginatus* použit test hemaglutinační aktivity. Stejně jako u jiných druhů klíšťat, např. u *I. ricinus* (Grubhoffer et al., 1991; Kuhn et al., 1996), *O. moubata* (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000) a u *Argas polonicus* (Grubhoffer et al., 2001) byla v plasmě *D. marginatus* tímto pokusem prokázána přítomnost lektinů.

Konkrétní lektiny/proteiny FREP byly identifikovány imunoblotingem s králičími polyklonálními protilátkami proti Dorinu M a myšími polyklonálními protilátkami proti HA plasmu *D. marginatus*. Oba typy protilátek reagovaly se čtyřmi proteiny: DMFREP1, DMFREP2, DMFREP3, DMFREP4. Nejsilnější signál/interakce antigenu s protilátkou byla u obou typů protilátek s proteiny DMFREP2 a 3, což ukazuje, že se tyto proteiny nejvíce podobají Dorinu M.

U proteinů rozdělených SDS-PAGE v redukujících podmínkách detekovaly oba typy protilátek pouze dva proteiny velké asi 40 kDa a 90 kDa s velmi slabým signálem, přestože ředění primárních protilátek bylo stejné jako při pokusu s neredukovanými proteiny.

Z pokusu nicméně vyplývá, že tyto plasmové proteiny *D. marginatus* patří mezi lektiny, a že jsou podobné Dorinu M, proteinu FREP klíšťáka *O. moubaty*, protože jsou rozpoznávány oběma typy protilátek. Proteiny jsou si tedy pravděpodobně podobné i svou strukturou. Tyto výsledky jsou dále potvrzeny nalezením dvou 'Dorin M-like' proteinů u *Dermacentor variabilis*, které obsahují FReD doménu a shodují se ve 25% s Ixoderiny a 22% a 24% s lektiny *O. moubata* (Dorin M a OMFREP). Jeden z proteinů, obsahující podobný signální peptid, který je přítomen i u jiných druhů klíšťat, hmyzu i člověka, byl potvrzen jako Dorin M MS analýzou. Druhý protein ukazuje malou podobnost se známými

lektiny a dosud nebyl identifikován (Dr. J. Anderson, N.I.H., Bethesda, USA, osobní sdělení).

Proti identifikovaným proteinům FREP byly připraveny myší (BALB/c) monospecifické polyklonální protilátky a jejich reaktivita byla vyzkoušena imunoblotingem s neredukovanými i redukovanými proteiny plasmy kvůli přesnější charakterizaci DMFREPů. Zdá se, že DMFREP1, který je po rozdělení plasmy při SDS-PAGE v neredukujících podmínkách velký 36 kDa, nemá žádné podjednotky. Obsahuje ale v molekule Cys-Cys můstky, díky kterým dochází při působení DTT k rozvolnění struktury proteinu a tím i k pomalejší migraci v polyakrylamidovém gelu. Imunobloting potvrdil, že u DMFREP2 a 3 se jejich molekulové velikosti liší pouze o 1 kDa (79/80 kDa), z čehož lze usoudit, že se pravděpodobně jedná o izoformy jednoho proteinu. Redukující podmínky odhalily, že se v těchto izoformách pravděpodobně nacházejí intra/intermolekulové Cys-Cys můstky, přičemž DMFREP2 se skládá ze dvou podjednotek 58 a 66 kDa a DMFREP3 nese podjednotky velké 60 a 66 kDa. Poslední z proteinů FREP *D. marginatus*, DMFREP4 je protein o velikosti asi 177 kDa skládající se ze dvou podjednotek 90 a 86 kDa.

Co se týče podobnosti molekul/epitopů proteinů DMFREP, výsledky imunoblotu ukazují, že nejméně stejných epitopů sdílí DMFREP1 a 4, protože byly rozpoznány pouze protilátkami, připravenými přímo proti těmto proteinům. Naopak izoformy DMFRED 2/3 vzájemně sdílejí stejné nebo velmi podobné epitopy a strukturně se podobají také proteinům DMFREP1 i DMFREP4.

Toto rozmezí molekulových hmotností u detekovaných proteinů DMFREP není nijak překvapivé, protože v hemolymfě jiných klíšťat i klíšťáků byly imunoblotingem s protilátkami proti HA rovněž detekovány proteiny hemolymfy s podobnými molekulovými hmotnostmi v rozmezí 30 až 85 kDa (Grubhoffer et al., 1991; Kuhn et al., 1996; Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000).

6.2. Vazebná specifita proteinů DMFREP a charakteristika jejich glykanů

Lektiny se řadí mezi proteiny rozpoznávající sacharidy, proto byl k určení jejich vazebné specifity použit test inhibice hemaglutinace. Jako inhibitory byly vybrány sacharidy a glykoproteiny, které se ukázaly být vhodné při inhibici hemaglutinace u plasmy a plasmového proteinu Dorinu M klíšťáka *O. moubata* (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000).

Stejně jako jiné lektiny bezobratlých (Olafsen, 1996), má i Dorin M (Kovář et al., 2000) a proteiny DMFREP *D. marginatus* největší vazebnou specifitu k sialoglykoproteinům jako je BSM a ovomukoid. Naproti tomu např. nesialovaný glykoprotein asialofetuin vázal lektiny plasmy mnohem slaběji než fetuin; PSM s nízkým obsahem sialové kyseliny neinteragoval s lektiny plasmy téměř vůbec na rozdíl od vysoce sialovaného BSM.

Lektiny se specifitou pro kyselinu sialovou se kromě klíšťat vyskytují např. i u ostrorepa a stejně jako limulin, lektin ostrorepa *Limulus polyphemus*, mohou také klíšťecí lektiny rozpoznávat širokou škálu G- bakterií díky jejich specifickým vazebným místům pro stavební složky buněčné stěny N-acetyl-D-glukosamin, D-galaktosu a 2-keto-deoxyoktonát (Vasta a Marchalonis, 1983; Grubhoffer et al., 1991; Kuhn et al., 1996).

Z vybraných sacharidů inhibovaly HA pouze sacharidy s N-acetylovými skupinami, což naznačuje, že by se mohlo jednat o lektiny specificky rozpoznávající N-acetylovou skupinu stejně jako např. tachylektiny TI-5A a TI-5B *T. tridentatus*, u kterých je tato skupina klíčovou pro jejich rozpoznávací funkci (Gokudan et al., 1999) a interakci s patogenními organismy (Kairies et al., 2001).

Tento názor potvrzují shodné výsledky, které byly pozorovány u plasmy a plasmového lektinu *O. moubata*, který navíc jeví vysokou sekvenční homologii s TIs-5A/B v doméně zodpovědné za vázání cukrů (Kovář et al., 2000; Rego et al., 2005, 2006).

Z těchto pokusů a z dřívějších studií lektinů v hemolymfě/plasmě lze tedy obecně říci, že plasmovým lektinům klíšťat je společná vazebná specifita pro kyselinu sialovou, sialoglykoproteiny a N-acetylované deriváty D-hexosaminů.

Jediným dosud purifikovaným a charakterizovaným klíšťecím lektinem je Dorin M, glykoprotein s vysokým obsahem manosy nebo komplexních N-glykanů (Kovář et al.,

2000). Na základě jeho podobnosti s plasmovými proteiny DMFREP1-4 byla provedena detekce glykoproteinů, která potvrdila, že všechny čtyři proteiny jsou glykosylovány.

Složení glykanů bylo určeno pomocí lektinů značených digoxigeninem. Značení lektiny ukázalo, že glykany všech čtyř proteinů obsahují manosu, protože reagovaly s lektinem GNA; DMFREP1 obsahuje ještě terminální galaktózu vázanou v N- nebo O-glykanech, neboť reagoval s lektinem DSA a DMFREP2 a 3 kDa mají v glykanech kromě manosy i terminální kyselinu sialovou (vázanou na N- nebo O-glykanovou strukturu), která byla prokázána reakcí těchto FREP s lektinem SNA. Po porovnání výsledků s definovanými vazebnými specifitami a s výsledky charakterizace glykanů u jiných druhů klíšťat lze říci, že všechny tři glykoproteiny jsou s vysokou pravděpodobností modifikovány glykosylací typu N a obsahují v glykanu vysoký podíl manosy.

U Dorinu M byly získány podobné výsledky, kde reagoval pozitivně s lektiny ConA a LCA a glykany s vysokým obsahem manózy byly u něj potvrzeny i hmotnostní spektrometrií (Man et al., publikace v přípravě). Podobný typ glykosylace byl rovněž popsán i u lektinů z hemolymfy *O. tartakovski* (Grubhoffer et al., 1991), kde lektin o velikosti 30 kDa reagoval s lektiny Con A a PSA, které dokazují přítomnost manosy a komplexních N-glykanů.

K odštěpení glykanů z molekuly proteinu byly použity glykosidázy PNGasa F a Endo H. PNGasa F (N-Glykosidasa F) je amidáza, která odstraňuje všechny typy N-glykanů tak, že odštěpuje celou sacharidovou strukturu a zároveň tím mění původně glykosylovaný asparagin na asparát; Endoglykosidáza H (Endo H) je rekombinantní glykosidáza odstraňující pouze struktury s vysokým obsahem manosy a některé hybridní typy N-glykanů, a to mezi N-acetyl-glukosaminy, z nichž jeden je vázán na asparagin. Tento enzym tedy nechává na všech původně glykosylovaných místech monosacharid N-acetyl-glukosamin (Robbins et al., 1984; Maley et al., 1989).

Proteiny po deglykosylaci byly následně detekovány protilátkami proti FREP proteinům *D. marginatus*. DMFREP1 deglykosylovaný PNGasou F i Endo H má velikost 31 kDa, což značí, že velikost sacharidové části glykoproteinu je asi 9 kDa. U DMFREP2/3 byly deglykosylovány všechny tři podjednotky, a to na velikosti 54, 58 a 63 kDa; jejich glykany mají tedy velikost 4, 2 a 3 kDa. Podjednotky DMFREP4 změnily po ošetření oběma enzymy svou velikost z 90 a 86 kDa na 78 kDa, jejich glykany jsou tedy 8 a 12 kDa velké.

6.3. Izolace proteinů FREP

Proteiny FREP byly izolovány z plasmy afinitní chromatografií s BSM jako makromolekulárním ligandem a i s využitím protilátek proti proteinům FREP.

Bovinní submaxilární mucin byl vybrán na základě testů inhibice hemaglutinace; tento protein byl využit i při úspěšné izolaci Dorinu M (Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář et al., 2000).

Tímto způsobem se podařilo izolovat všechny čtyři proteiny DMFREP. Spolu s nimi se purifikovaly i další proteiny o velikosti 25 kDa, 145 a 150 kDa. Tyto proteiny se pravděpodobně vážaly na kolonu nespecificky, neboť nebyly detekovány žádnou protilátkou ani lektinem.

Imunoafinitní chromatografií s využitím specifické protilátky Ab2 byl vyizolován pouze jediný protein, který byl imunoblotem potvrzen jako DMFREP2/3.

6.4. Lokalizace proteinů DMFREP v tkáních *D. marginatus*

Stejně jako v případě určení místa výskytu Dorinu M v tkáních *O. moubata* (Rego et al., 2005), byly proteiny DMFREP1, 2 a 4 lokalizovány v tkáních *D. marginatus* pomocí specifických polyklonálních protilátek za využití fluorescenční mikroskopie. Při porovnávání lokalizace těchto proteinů byla pozorována variabilita v jejich přítomnosti ve slinných žlázách, kde se nacházel DMFREP1 a 3, a hemocytech, ve kterých byly detekovány DMFREP 1 a 2. Pro všechny tyto proteiny je naopak společný jejich výskyt ve střevních buňkách.

Co se týče rozmístění proteinů DMFREP v jednotlivých tkáních, z těchto výsledků lze usoudit, že Dorinu M je svou lokalizací nejvíce podobný DMFREP1, který se nachází stejně jako Dorin M ve slinných žlázách a hemocytech. Zajímavá je rovněž přítomnost DMFREP1 v různých buňkách u různých acinů (epiteliálních buňkách acinů typu III, v sekrečních granulích acinů typu II), z čehož lze usuzovat na rozdílné funkce tohoto proteinu. S použitím transmisní elektronové mikroskopie byl lokalizován plasmový lektin (85 kDa) klíštěte *I. ricinus* v granulích obou typů granulárních hemocytů, na jejich membráně a v bazální lamině obklopující hemocel. Tento lektin byl rovněž detekován na buňkách připojených ke střevním vychlípeninám a granulárních inkluzích nefrocytů (Kuhn et al., 1996).

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prokázat přítomnost lektinů/proteinů FREP v plasmě klíštěte *D. marginatus*, tyto proteiny identifikovat pomocí protilátek proti FREP jiných druhů klíšťat a HA plasmy *D. marginatus* a charakterizovat je metodami biochemie. Další cíle zahrnovaly přípravu polyklonálních protilátek proti těmto proteinům, izolace proteinů FREP afinitní chromatografií a lokalizace proteinů FREP v tkáních *D. marginatus* imunofluorescencí.

V plasmě klíštěte *Dermacentor marginatus* byly detekovány proteiny s lektinovou aktivitou DMFREP1, DMFREP2, DMFREP3 a DMFREP4, které jsou podobné Dorinu M, plasmovému lektinu *O. moubata*. Všechny proteiny DMFREP jsou glykosylovány, pravděpodobně glykosylací typu N, a mají vazebnou specifitu pro N-acetyl hexosaminy, sialoglykoproteiny a kyselinu sialovou.

DMFREP1 je protein o velikosti 40 kDa, který obsahuje ve svých glykanech manosu a terminální galaktosu. Po enzymatické deglykosylaci má tento protein velikost 31 kDa.

DMFREP2 a DMFREP3 jsou pravděpodobně izomery s molekulovou velikostí 79/80 kDa. DMFREP2 se skládá ze dvou podjednotek 58 a 66 kDa; DMFREP3 nese podjednotky velké 60 a 66 kDa. Oba izomery jsou glykoproteiny s manosou a terminální kyselinu sialovou. U DMFREP2/3 byly deglykosylovány všechny tři podjednotky na velikosti 54, 58 a 63 kDa; jejich glykany mají tedy velikost 4, 2 a 3 kDa.

Poslední z proteinů FREP *D. marginatus*, DMFREP4, je glykoprotein o velikosti asi 177 kDa skládající se ze dvou podjednotek 90 a 86 kDa, který nese ve svých glykanech manosu. Po ošetření oběma enzymy změnilly podjednotky DMFREP4 svou velikost z 90 a 86 kDa na 78 kDa, což ukazuje, že glykany jsou 8 a 12 kDa velké.

Proteiny DMFREP byly vyizolovány afinitní chromatografií s ligandem BSM, který všechny tyto proteiny specificky váží. Proti DMFREP1, 2 a 4 byly připraveny specifické polyklonální protilátky Ab1, Ab2 a Ab 3 a pomocí Ab 2 byl izolován DMFREP2.

Imunofluorescencí bylo prokázáno, že se všechny proteiny nachází ve střevu, DMFREP1 a 2 byly lokalizovány v hemocytech a DMFREP1 a 4 ve slinných žlázách klíštěte *D. marginatus*.

8. LITERATURA

Adema, C.D., Hertel, L.A., Miller, R.D., Loker, E.S.: A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8691-96, 1997.

Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H., März, L.: Insect cells as a hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16, 109-23, 1999.

Anders, E.M., Hartley, C.A., Jackson, D.C.: Bovine and mouse serum beta inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4485-9, 1990.

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P.W., Rincón, M., Kantor, F.S., Fikrig, E.: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16, 849-59, 2002.

Bázliková, M., Kazár, J., Schramek S.: Phagocytosis of *Coxiella burnetii* by *Hyalomma dromedarii* tick haemocytes. *Acta Virol.* 28, 48-52, 1984.

Beati, L., Raoult, R.: *Rickettsia massiliae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 839-40, 1993.

Borovičková, B., Hypša, V.: Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp. Appl. Acarol.* 35, 317-33, 2005.

Borregaard, N., Elsbach, P., Ganz, T., Garred, P., Svejgaard, A.: Innate immunity: from plants to humans. *Immunol. Today* 21, 68-70, 2000.

Boyd, W.C., Shapleigh, E.: Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119, 419, 1954.

Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Corwin, D.: Pathobiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodid ticks. *Rev. Infect. Dis.* 11, 1442-50, 1989.

Ceraul, S.M., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L.: Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 39, 376-83, 2002.

Ceraul, S.M., Sonenshine, D.E., Ratzlaff, R.E., Hynes, W.L.: An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1099-103, 2003.

Cooper, D.N.: Galectinomics: Finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 209-31, 2002.

Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C.: Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-65, 2002.

Dodd, R.B., Drickamer, K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11, 71-9, 2001.

Domopoulos, G., Christophides, G.K., Meister, S., Schultz, J., White, K.P., Barillas-Mury, C., Kafatos, F.C.: Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8814-9, 2002.

Drickamer, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263, 9557-60, 1988.

Drickamer, K., Dordal, M.S., Reynolds, L.: Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *J. Biol. Chem.* 261, 6878-87, 1986.

Ezekowitz, R.A., Day, L.E., Herman, G.A.: A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J. Exp. Med.* 167, 1034-46, 1988.

Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.: Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99, 3602-12, 2002.

Fujimori, Y., Harumiya, S., Fukumoto, Y., Miura, Y., Yagasaki, K., Tachikawa, H., Fujimoto, D.: Molecular cloning and characterization a mouse ficolin-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 796-800, 1998.

Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y.: The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* 198, 185-202, 2004.

Gabius, H.J.: Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243, 543-76, 1997.

Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., Mantovani, A.: Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 337-66, 2005.

Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S.N., Iwanaga, S., Kawabata, S.: Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10086-91, 1999.

Grubhoffer, L.: Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Nuttal, P.A., Bownam, A.S., editors. *Ticks: Biology, disease and control*. Cambridge University Press, 406-58, 2008.

Grubhoffer, L., Vereš, J., Dusbábek, F.: Lectins as the molecular factors of recognition and defense reactions of ticks. In: Dusbábek, F. and Bukva V., editors. *Modern Acarology vol. 2*. SPBA Academic Publishing, The Hague, 381-8, 1991.

Grubhoffer, L., Kovář, V.: Arthropod lectins: affinity approaches in analysis and reparation of carbohydrate binding proteins. In: Wiesner, A., Dunphy, G.B., Marmars, V.J., Morishima, I., Sugamaram, M., Yamakava, M., editors. *Techniques in Insect Immunology FITC-5*. New Haven USA, SOS Publications, 47-57, 1998.

Grubhoffer, L., Kovář, V., Rudenko, N.: Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology* 129, S113-S25, 2004.

Grubhoffer, L., Jindrák, L.: Lectins and tick-pathogen interactions: a minireview. *Folia Parasitol.* 45, 9-13, 1998.

Grunclová, L., Fouquier, H., Hypša, V., Kopáček, P.: Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 651-60, 2003.

Gudderra, N.P., Neese, P.A., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M.: Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycohemoglobin-carrier protein from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: *Ixodidae*) and observations on a similar protein in the soft tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari: *Argasidae*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 299-311, 2001.

Gupta, G., Suroliya, A.: Collectins: sentinels of innate immunity, *BioEssays* 29, 452-64, 2007.

Harrison, R.L., Jarvis, D.L.: Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv. Virus Res.* 68, 159-91, 2006.

Holmskov, U., Thiel, S., Jensenius, J.C.: Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 547-78, 2003.

Huang, X., Tsuji, N., Myiوشي T., Nakanuta-Tsuruta, S., Hiabayashi J., Fujisaki K.: Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Glycobiology* 17, 313-23, 2007.

Hubálek, Z., Halouzka, J.: West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 643-50, 1999.

Hubálek, Z., Juricová, Z., Halouzka, J.: *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.* 37, 255-60, 1990.

Hubálek, Z., Mittermayer, T., Halouzka, J., Černý, V.: Isolation of "exotic" Bhanja virus (Bunyaviridae) from ticks in the temperate zone. *Arch. Virol.* 101, 191-7, 1988.

Ichijo, H., Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, L.J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Miyazono, K.: Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J. Biol. Chem.* 268, 14505-13, 1993.

Jacobson, R.L., Doyle, R.J.: Lectin-Parasite Interaction. *Parasitol. Today* 12, 55-61, 1996.

James, A.M., Oliver, J.H.: Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 639-49, 1997.

Janeway, C.A.: Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature* 341, 108, 1989.

Jarvis, D.L., Kawar, Z.S., Hollister, J.R.: Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 528-33, 1998.

Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L.: Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: *Ixodidae*): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J. Med. Entomol.* 35, 458-64, 1998.

Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L.: Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: *Ixodidae*) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J. Med. Entomol.* 37, 265-70, 2000.

- Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L.: Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 857–65, 2001.
- Kairies, N., Beisel, H.G., Fuentes-Prior, P., Tsuda, R., Muta, T., Iwanaga, S., Bode, W., Huber, R., Kawabata, S.: The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13519-24, 2001.
- Kakinuma, Y., Endo, Y., Takahashi, M., Nakata, M., Matsushita, M., Takenoshita, S., Fujita, T.: Molecular cloning and characterization of novel ficolins from *Xenopus laevis*. *Immunogenetics* 55, 29-37, 2003.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G.: A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119, 329-41, 2004.
- Kawabata, S., Tsuda, R.: Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 414-21, 2002.
- Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I.: A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. *J. Biochem.* 106, 483-9, 1989.
- Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., Fujita, T.: Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biol. Chem.* 276, 19959-65, 2001.
- Kim, Y.K., Shin, H.S., Tomiya, N., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J., Cha, H.J.: Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 452-61, 2005.
- Kingsford, L., Hill, D.W.: The effect of proteolytic cleavage of La Crosse virus G1 glycoprotein on antibody neutralization. *J. Gen. Virol.* 64, 2147-56, 1983.
- Kopáček, P., Vogt, R., Jindrák, L., Weise, C., Šafařík, I.: Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 989-97, 1999.
- Kopáček, P., Weise, C., Saravan, T., Vítová, K., Grubhoffer, L.: Characterisation of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 465-75, 2000.
- Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L.: Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30, 195-205, 2000.
- Kost, T.A., Condreay, J.P.: Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 428-33, 1999.
- Kozuch, O., Nosek, J.: Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol.* 15, 334, 1971.
- Kuhn, K.H., Uhlíř, J., Grubhoffer, L.: Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). *Parasitol. Res.* 82, 215-21, 1996.
- Kuhn, K.H., Haug, T.: Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterisation of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Cell Tissue Res.* 277, 493-504, 1994.

Labuda, M., Alves, M.J., Elecková, E., Kozuch, O., Filipe, A.R.: Transmission of tick-borne bunyaviruses by co-feeding ixodid ticks. *Acta Virol.* 41, 325-8, 1997.

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5, 1970.

Lai, R., Lomas, L.O., Jonczyk, J., Turner, P.C., Rees, H.H.: Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem. J.* 379, 681-5, 2004.

Lasky, L.A.: Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258, 964-9, 1992.

Le, Y., Lee, S.H., Kon, O.L., Lu, J.: Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett.* 425, 367-70, 1998.

Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Languieux, M., Kafatos, F.C.: Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709-18, 2001.

Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H. Jr.: Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180, 195-204, 1989.

Mans, B.J., Neitz, A.W.: Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1-17, 2004.

Mantovani, A., Garlanda, C., Doni, A., Bottazzi, B.: Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J. Clin. Immunol.* 28, 1-13, 2008.

Marchalonis, J.J., Edelman, G.M.: Isolation and characterisation of a haemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J. Mol. Biol.* 32, 453-65, 1968.

Markeshin, S.I.a., Smirnova, S.E., Evstafev, I.L.: An assessment of the status of natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Crimea. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 4, 28-31, 1992.

Marshall, R.D.: The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkage of glycoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* 40, 17-26, 1974.

Masina, S., Broady, K.W.: Tick paralysis: development of a vaccine. *Int. J. Parasitol.* 29, 535-41, 1999.

Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T.: A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271, 2449-54, 1996.

Matsushita, M., Endo, Y., Hamasaki, N., Fujita, T.: Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int. Immunopharmacol.* 1, 359-63, 2001.

Matsushita, M., Fujita, T.: Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* 180, 78-85, 2001.

Matsushita, M., Fujita, T.: The role of ficolins in innate immunity. *Immunology* 205, 490-7, 2002.

Mushegian, A., Medzhitov, R.: Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J. Cell. Biol.* 155, 705-10, 2001.

Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D., Yamakawa, M.: Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1624, 125-30, 2003.

Nakajima, Y., Taylor, D., Yamakawa, M.: Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 135-40, 2002.

Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig E.: A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* 11, 641-50, 2002.

Nosek, J., Kotorov, M.B., Chunikhin, S.P., Kožuch, O., Čiampor, F.: The replication and eclipse-phase of the tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus*. *Folia Parasitol.* 31, 187-9, 1984.

Nuttal, P. A.: Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl. Bakteriol.* 289, 492-505, 1999.

Nuttall, P.N., Labuda, M.: Tick-borne Encephalitis subgroup. In: Sonenshine, D.E., Mather T.N., editors. *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford: Oxford University Press, 351-481, 1994.

Olafsen, J.A.: Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In: Cooper, E.L., editors. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 24, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49-76. 1996.

Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D.: The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon* 38, 1561-80, 2000.

Pace, G.E., Baum, L.G.: Insect galectins: roles in immunity and development. *Glycoconj. J.* 19, 607-14, 2004.

Piesman, J., Gage, K.L.: Ticks and mites and the agents they transmit. In: *The biology of disease vectors* (eds. Beaty, B.J., Marquardt, W.C.), pp. 160-174, Niwot, Colorado, University Press of Colorado, 1996.

Pietrobelli, M., Cancrini, G., Moretti, A., Tampieri, M.P.: Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? *Parassitologia* 1, 33-8, 2007.

Plummer, T.H. Jr., Tarentino, A.L.: Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* 1, 357-63, 1991.

Pneumans, W.J., van Damme, E.J.M.: Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-52, 1995.

Qasba, P.K., Kumar, S.: Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 255-306, 1997.

Rego, R.O., Hajdušek, O., Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L., Hypša V.: Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 991-1004, 2005.

Rego, R.O., Kovář, V., Kopáček, P., Weise, C., Man, P., Šauman, I., Grubhoffer, L.: The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 291-9, 2006.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L.: Gene organization of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. *Insect Mol. Biol.* 16, 501-7, 2007.

Řeháček, J., Mrenová, M.: Detecion of tick-bone encephalitis virus in tick hemocytes by the fluorescent antibody technique. *Acta Virol.* 10, 374, 1966.

Řeháček, J., Kováčová, E., Lisak, V., Rumin, W.: Occurence of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia slovacica* and organisms resembling bacillary rickettsiae in their natural foci in Slovakia 20 years after their first detection. *Folia Parasitol.* 37, 285-6, 1990.

Sonenshine, D.E.: *Biology of ticks*. Vol. 1. Oxford University Press, New York, 1991.

Sonenshine, D.E.: *Biology of ticks*. Vol. 2. Oxford University Press, New York, 1993.

Smetanová, K., Schwarzová, K., Kocianová, E.: Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia spp.*, and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078, 312-5, 2006.

Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K., Hamasaki, N.: Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J. Biol. Chem.* 273, 20721-7, 1998.

Tillet, W., Francis, T.: Serologic reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 52, 561-71, 1930.

Tomiya, N., Narang, S., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J.: Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj. J.* 21, 343-60, 2004.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4, 1979.

Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J.H. Jr., Fujisaki, K.: Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect. Immun.* 75, 3633-40, 2007.

Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H., O'Leary, N.: C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 401-20, 1999.

Vasta, G.R., Quesenberry, M.S., Ahmed, H.: A tunicate Fucose-binding lectin is a homologue of the mammalian binding proteins. In: Söderhäll, K., Iwanaga, S., Vasta, G.R., editors. *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 189-227, 1996.

Wikel, S.K.: Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol.* 29, 851-9, 1999.

Yang, R.Y., Liu, F.T.: Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 267-76, 2003.

Young, A.R., Meeusen, E.N.: Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj. J.* 19, 601-6, 2004.

Yuen, C.T., Lawson, A.M., Chai, W., Larkin, M., Stoll, M.S., Stuart, A.C., Sullivan, F.X., Ahern, T.J., Feizi, T.: Novel sulfated ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on an ovarian cystadenoma glycoprotein. *Biochemistry* 31, 9126-31, 1992.

Zdobnov, E.M., von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., Copley, R.R., Christophides, G.K., Thomasova, D., Holt, R.A., Subramanian, G.M., Mueller, H.M., Dimopoulos, G., Law, J.H., Wells, M.A., Birney, E., Charlab, R., Halpern, A.L., Kokoza, E., Kraft, C.L., Lai, Z., Lewis, S., Louis, C., Barillas-Mury, C., Nusskern, D., Rubin, G.M., Salzberg, S.L., Sutton, G.G., Topalis, P., Wides, R., Wincker, P., Yandell, M., Collins, F.H., Ribeiro, J., Gelbart, W.M., Kafatos, F.C., Bork, P.: Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 149-59, 2002.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

BSM - bovine submaxillary mucin, bovinní submaxilární mucin

CBB - Coomassie Brilliant Blue

ConA - *Conavalia ensiformis* agglutinin, lektin z *Conavalia ensiformis*

CRD - carbohydrate recognition domain, cukr rozpoznávající doména

CRP - C-reactive protein, C-reaktivní protein

DSA.- *Datura sativa* agglutinin, lektin z *Datura sativa*

FReD - fibrinogen-related domain, fibrinogenu podobnou doménu

FREP - fibrinogen-related proteins, fibrinogenu podobné proteiny

GlcNAc - N-acetyl-D-glukosamin

(GlcNAc)₂(Man)₉Glc₁ - heterooligosacharidový motiv s N-acetyl-D-glukosaminem, D-manosou a D-glukosou

GNA - *Galanthus nivalis* agglutinin, lektin z *Galanthus nivalis*

HA - hemaglutinační aktivita

LCA - *Lens culinaris* agglutinin, lektin z *Lens culinaris*

MASP - MBL-associated serine protease, serinová proteáza vázaná na MBL

MAA - *Maackia amurensis* agglutinin, lektin z *Maackia amurensis*

MBL - mannose-binding lectin, manosu vázající lektin

MHC - major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

PAMPs - pathogen-associated molecular patterns, molekulové motivy spojené s patogenem

PNA - peanut agglutinin, lektin z podzemnice olejné

PRRs - pattern recognition receptors, receptory rozpoznávající motivy

PSA - *Pisum sativum* agglutinin, lektin z *Pisum sativum*

PSM - porcine submaxillary mucin, prasečí submaxilární mucin

RAG - recombination-activating gene, gen aktivující rekombinaci

ROS - reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SBA - soybean agglutinin, lektin ze semen sóji

SNA - *Sambucus nigra* agglutinin, lektin ze *Sambucus nigra*

TCA - trichloroctová kyselina

TCR - T-cell receptor, T-buněčný receptor

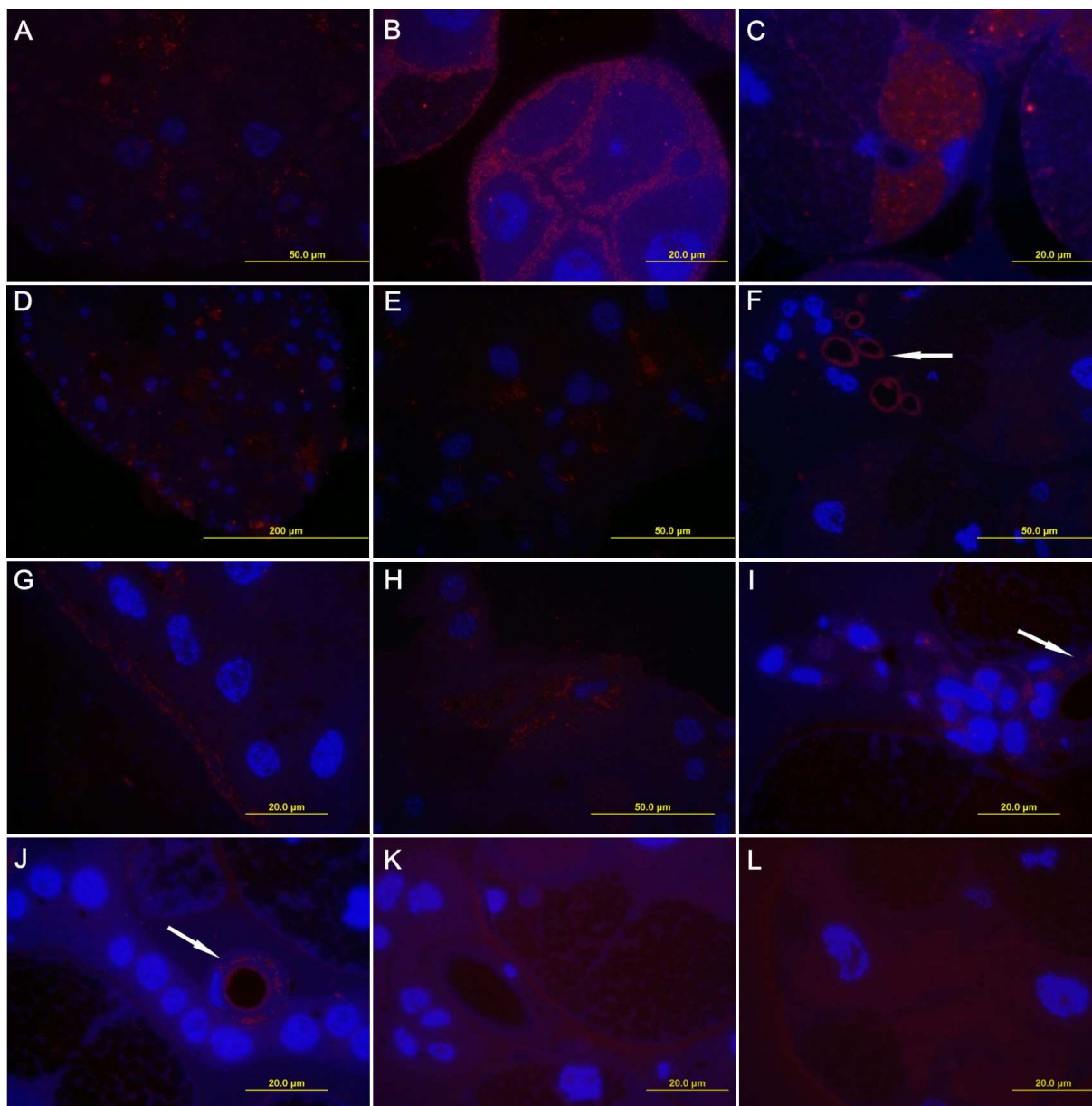
TGF-β, transforming growth factor β, transformační růstový faktor β

TI-5A/B (TLS 5) - Tachylectin 5A/B

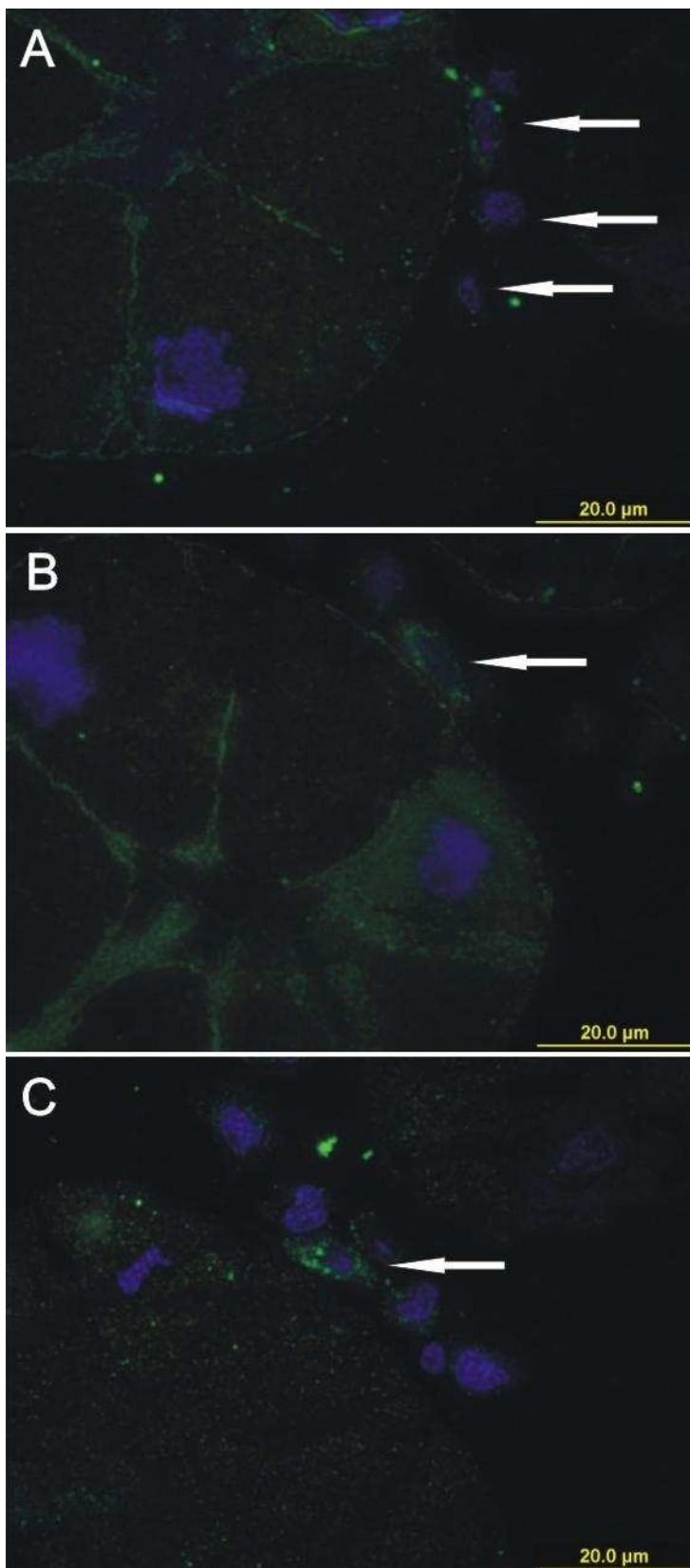
UEA - *Ulex europaeus* agglutinin, lektin z *Ulex europaeus*

WGA - wheat germ agglutinin, lektin z pšeničných klíčků

10. PŘÍLOHY



Obrázek 1: Lokalizace proteinů DMFREP na polotenkých řezech orgánů částečně nasátého klíštěte *D. marginatus*. DMFREP1 byl přítomen v střevních buňkách (A), epitelálních buňkách acinu typu III (B) a sekrečních granulích acinu typu II (C). DMFREP2 se nacházel uvnitř střevních buněk (D, E) a pozitivní reakce protilátky byla zaznamenána na chitinových strukturách tracheal (F, šipka). DMFREP4 byl lokalizován na povrchu (G) a uvnitř některých buněk střev (H) a dále v buňkách slinného vývodu (Obr. I, šipka) a jeho chitinové výstelce (Obr. I, J). Kontrolní řezy, které byly značeny pouze sekundární protilátkou (K, L). Ab1 (A-C), Ab2 (Obr. D-F), Ab3 (Obr. G-J). Jádra byla obarvená DAPI. Střeva (A,D,E,G,H), slinné žlázy (B, C, F, I-L).



Obrázek 2: Lokalizace DMFREP1 a 2 na řezech slinných žláz a hemocytů částečně nasátého klíštěte *D. marginatus*. DMFREP1 (A, B, šipka) a DMFREP 2 (C, šipka) byly lokalizovány cytoplasmě některých hemocytů, které se nacházely v těsné blízkosti slinných žláz. Jádra byla obarvená DAPI.