

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



**Identifikace a biochemická charakterizace lektinů
v hemolymfě tří druhů klíš'at' rodu *Rhipicephalus***

Magisterská diplomová práce

Bc. Miroslav Fišer

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba

2009

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Hlavní cíle práce.....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1 Ekologie klíšťat.....	3
3.1.1 Klíšťata rodu <i>Rhipicephalus</i>	4
3.2 Imunitní odpověď.....	6
3.2.1 Komplementový systém.....	7
3.3 Lektiny.....	9
3.3.1 Rozdělení lektinů.....	10
3.3.1.1 Galektiny.....	13
3.3.1.2 C-lektiny (kolektiny a selektiny).....	13
3.3.1.3 Pentraxiny.....	15
3.4 Lektiny bezobratlých živočichů.....	15
3.4.1 Hemolymfa klíšťat.....	16
3.4.2 Klíštěcí lektiny.....	16
3.4.2 Fibrinogenu podobná doména.....	18
3.5 Glykosylace.....	19
4. Materiál a metody.....	22
4.1 Materiál.....	22
4.1.1 Klíšťata.....	22
4.2 Metody.....	22
4.2.1 Příprava plasmy.....	22
4.2.2 Příprava erytrocytů.....	22
4.2.3 Příprava protilátek proti hemaglutinační aktivitě (HA).....	23
4.2.4 Hemaglutinace a inhibice hemmaglutinace.....	23
4.2.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	24
4.2.6 Blotovací techniky.....	25
4.2.6.1 Imunobloting.....	25
4.2.6.2 Detekce glykoproteinů.....	26
4.2.6.3 Lektinový afinobloting.....	26
4.2.7 Enzymatická deglykosylace.....	27

4.2.8 Imunoafinitní chromatografie	27
4.2.9 Hmotnostní spektrometrie	28
5. Výsledky.....	29
5.1 Hemaglutinace a inhibice hemaglutinace.....	29
5.2 Příprava protilátek proti hemaglutinační aktivitě (HA)	31
5.3 Imunobloting	32
5.4 Detekce glykoproteinů	33
5.5 Enzymatická deglykosylace	33
5.6 Lektinový afinobloting	35
5.7 Hmotnostní spektrometrie	37
6. Diskuse	41
7. Závěr.....	45
8. Literatura	46
9. Příloha	52

Fišer, M., 2009: Identifikace a biochemická charakterizace lektinů v hemolymfě tří druhů klíšťat rodu *Rhipicephalus* [Identification and biochemical characterization of lectins in the hemolymph of three species of tick in the genus *Rhipicephalus*. MSc. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Lectins are tissue specific carbohydrate binding proteins with possible functions in invertebrate immunity and pathogen transmission. The main goal of this study was to identify hemolymph lectins in three different tick species. Three proteins with molecular weights of 58 kDa, 75 kDa and 180 kDa were detected in all investigated species using antibodies directed against hemagglutination activity of *Rhipicephalus appendiculatus* hemolymph. These proteins were characterized by biochemical methods such as Schiff/periodate staining, lectin blotting, enzymatic deglycosylation, hemagglutination analysis, immunoblotting, and mass spectrometry.

Tato práce byla financována z grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6007665801; LC-06009, Grantové agentury České republiky GAČR 524/06/1479 a 206/09/1782, Grantové agentury Akademie věd České republiky KJB 600960906 a Grantové agentury Jihočeské univerzity 04-GAJU-45

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, dne 7. května 2009

.....

Na tomto místě je mou milou povinností poděkovat svým školitelům Prof. Liboru Grubhofferovi a Mgr. Jánů Štěrbovi za umožnění vykonávat svou vlastní vědeckou činnost, za užitečné rady a ochotu kdykoliv a s čímkoliv pomoci. Mé díky patří také celému kolektivu laboratoře a hlavně Verunce, jejíž sladký úsměv mě do laboratoře táhl i ve dnech pracovních neúspěchů. Nejvíc bych chtěl samozřejmě poděkovat své rodině za to, že stála vždycky při mně.

1. Úvod

Krevsající členovci a mezi nimi především klíšťata, jsou přenašeči obrovského množství různých infekčních agens. Mezi tyto patogeny, vyvolávající široké spektrum onemocnění, patří bakterie, viry i prvoci.

Protein-sacharidové interakce vznikající mezi proteiny vektora a povrchovými strukturami jím přenášeného patogena, jsou tedy velmi důležitým mechanismem, jak v obraně vektora proti tomuto patogenu tak v jeho schopnosti toto agens přenášet. Zásadní roli v těchto interakcích hrají právě lektiny – proteiny schopné selektivně rozpoznávat a vázat se na glykosylované složky nejen cizích, ale i tělu vlastních molekul. U organismů postrádajících specifickou imunitu jsou považovány za funkční analogy imunoglobulinů, ale podstatnou roli hrají také ve vrozené imunitě obratlovců. Lektiny se účastní různých procesů v imunitním systému živočichů zahrnujících aglutinaci, opsonizaci pro fagocytózu nebo aktivaci komplementového systému.

Identifikace těchto proteinů hemolymfy klíšťat zahrnutých v imunitní odpovědi je v porovnání s jinými medicínsky významnými vektory, jako například komáry, teprve v začátcích.

2. Hlavní cíle práce

- identifikovat lektiny v hemolymfě tří druhů klíšťat rodu *Rhipicephalus* pomocí specifických protilátek proti lektinům z jiných klíšťat,
- zjistit přítomnost glykosylací na těchto proteinech,
- připravit protilátky proti hemaglutinační aktivitě (HA) hemolymfy klíšťat,
- určit vazebnou specifitu lektinů hemolymfy pro různé sacharidy a glykoproteiny.

3. Literární přehled

3.1 Ekologie klíšťat

Klíšťata jsou celosvětově rozšířenými ektoparazity suchozemských obratlovců, kteří hrají roli přenašečů nebezpečných patogenů lidí i zvířat. Do řady nemocí vyvolaných klíšťaty přenášenými patogeny patří například klíšťová encefalitida (virus klíšťové encefalitidy), Lymeská borelióza (*Borrelia burgdorferi*), theilerióza (*Theileria parva*), babesióza (*Babesia sp.*), lidská granulocytární anaplazmóza (*Anaplasma phagocytophilum*), ehrlichiózy (*Ehrlichia sp.*) a další. Tito krev sající paraziti patří mezi roztoče a na světě je jich dosud známo kolem 900 různých druhů (Bowman *et al.*, 2008). Řadí se do kmenu *Arthropoda*, třídy *Arachnida*, řádu *Acari*, podřádu *Ixodida*.

Klíšťata dělíme do tří čeledí –

- 1) *Ixodidae* – klíšťata “hard ticks“, mající zádový štít (scutum)
- 2) *Argasidae* – neboli klíšťáci “soft ticks“
- 3) *Nuttalliellidae*

Zástupci jednotlivých čeledí se liší svým životním cyklem, ekologií i spektrem patogenů, které jsou schopni přenášet (Sonenshine, 1993). Čeleď *Nuttalliellidae* je zastoupena pouze jediným druhem – *Nuttalliella namaqua*, čeleď *Argasidae* obsahuje 186 druhů ve čtyřech rodech a nejpočetnější čeleď *Ixodidae* je zastoupena 12 rody a čítá asi 720 druhů. Jedním z těchto rodů je i rod *Rhipicephalus* zahrnující 79 druhů (Bowman *et al.*, 2008).

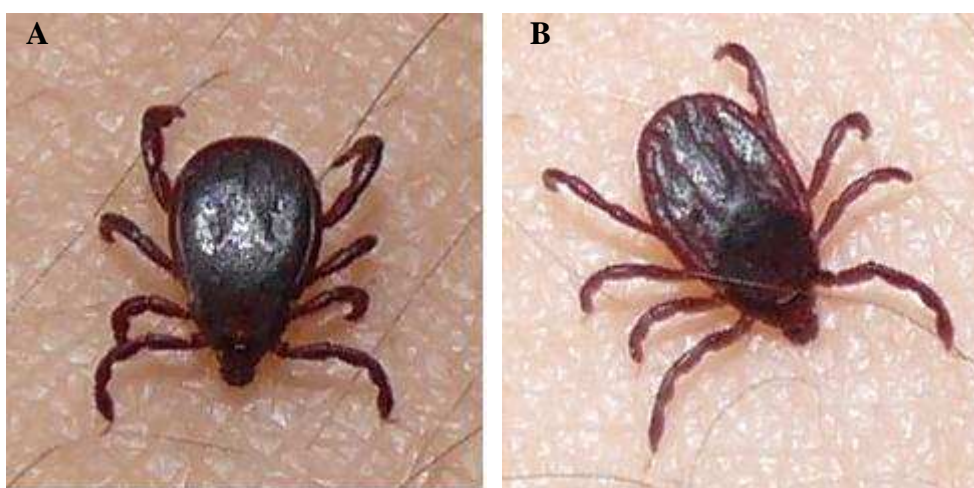
3.1.1 Klíšťata rodu *Rhipicephalus*

Klíšťata rodu *Rhipicephalus* mají stejně jako všichni zástupci čeledi *Ixodidae* tvrdé sklerotizované scutum, pokrývající u samců celou dorzální část, zatímco u samic tvoří jen malý štítek těsně za hlavičkou. Od klíšťat ostatních rodů se odlišují společnými znaky, jimiž jsou například poměrně krátké palpy a hypostom a hexagonální *basis capituly* (bazální část hlavičky, na kterou je připojen hypostom) (Walker, 2000).

Většina klíšťat rodu *Rhipicephalus* jsou klíšťata tříhostitelská, výjimku tvoří například poddruhy *Rhipicephalus evertsi* a *R. glabroscutatum*, které jsou dvouhostitelské (Goodman, 2005). Životní cyklus tříhostitelských klíšťat zahrnuje čtyři stádia: vajíčko, larvu, nymfu a imágo a v závislosti na druhu klíštěte, klimatických podmínkách či dostupnosti vhodných hostitelů může trvat od dvou měsíců až po dva roky.

Klíště *Rhipicephalus appendiculatus*

Klíště *R. appendiculatus* je stejně jako další dva zástupci tříhostitelské klíště, jehož výskyt je geograficky omezen na africký kontinent. Je vektorem parazitického prvoka *Theileria parva* (Theiler 1911) způsobujícího fatální onemocnění skotu známé jako theilerióza. Toto onemocnění dobytka vyskytující se převážně v jižní, centrální a východní Africe má závažný dopad na tamní ekonomiku (Norval *et al.*, 1992).



Obrázek 3.1 Samec *R. appendiculatus* (A), samice *R. appendiculatus* (B)

Klíště *Rhipicephalus pulchellus*

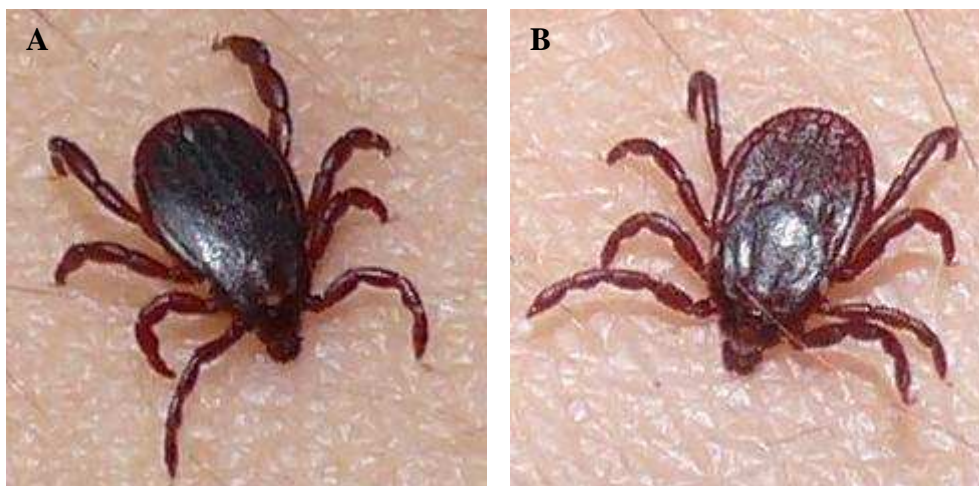
Klíště *R. pulchellus*, jehož scutum je zdobeno typickými ornamenty, je parazitem zeber a dobytka v savanách Etiopie a Somálska. Je vektorem prvoka *Theileria taurotragi* (Sebitosy, 2006) způsobujícího onemocnění skotu, či *Theileria equi* vyvolávajícího onemocnění zeber. Dále může být přenašečem *Trypanosoma theileri*, *Rickettsia conorii* nebo několika virů z čeledi *Bunyaviridae* (Cynthia et al., 2005).



Obrázek 3.2 Samec *R. pulchellus* (A), samice *R. pulchellus* (B)

Klíště *Rhipicephalus sanguineus*

Klíště *R. sanguineus* je rozšířené téměř po celém světě a nejčastějším hostitelem pro všechny tři stádia tohoto klíštěte je pes. Jeho životní cyklus je velmi krátký a v teplém klimatu může trvat dokonce jen dva měsíce (Samuel, 2001). Klíště je vektorem více patogenů, z nichž nejčastější je *Ehrlichia canis* způsobující psí ehrlichiozu, což je akutní až chronická nemoc charakterizovaná infekcí monocytů a lymfocytů. Dále je vektorem původců psí babesiozy (*Babesia canis*), středozevní horečky (*Rickettsia conorii*) (Marquardt, 2000), či anaplasmózy skotu (*Anaplasma marginale*) (Carter, 2004). Zřídka je toto klíště přenašečem tularémie (*Francisella tularensis*) a Q horečky (*Coxiella burnetii*) na člověka (Sonenshine, 1993).



Obrázek 3.3 Samec *R. sanguineus* (A), samice *R. sanguineus* (B)

3.2 Imunitní odpověď

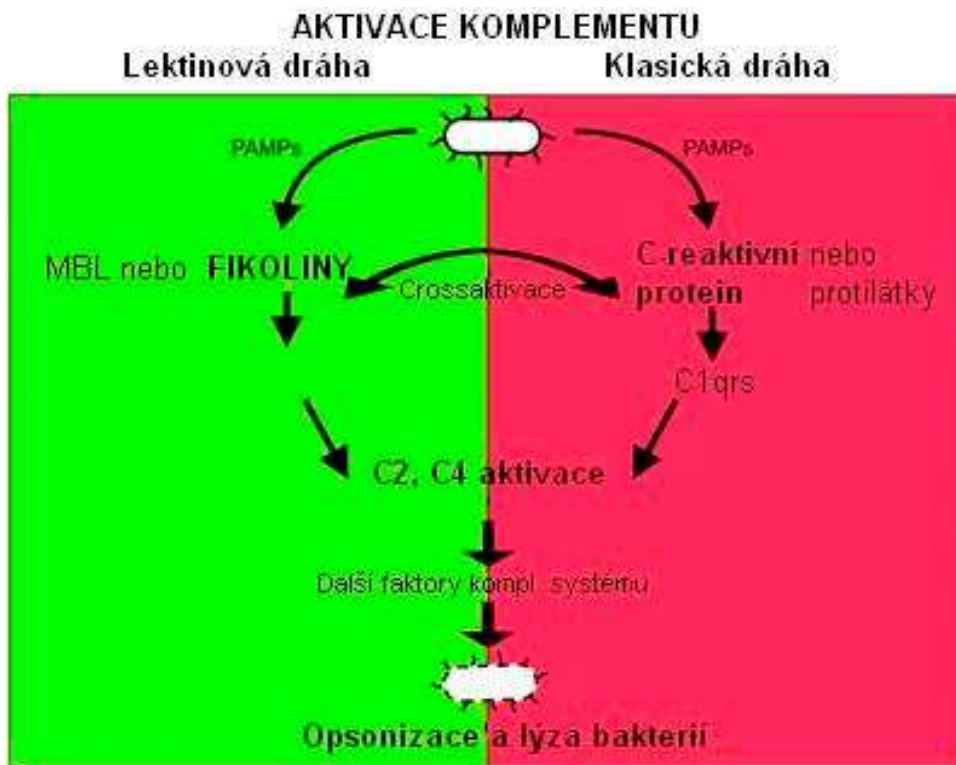
Imunitní systém živočichů je tvořen dvěma základními systémy. Je to vrozená a získaná imunita. Geny kódující molekuly, které hrají podstatnou roli v získané imunitě, jako jsou geny pro imunoglobuliny (Ig), T-buněčný receptor (TCR, T-cell receptor), složky hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) či gen aktivující rekombinaci (RAG, recombination-activating gene), byly identifikovány pouze u žraloků a dalších vyšších obratlovců. Vrozená imunita je evolučně starší a má zásadní funkci v počáteční fázi imunitní odpovědi. Původně byla považována za nespecifickou, zprostředkovanou pomocí fagocytózy. Ve skutečnosti je však vysoce specifická. Dokáže rozlišovat mezi vlastními molekulami organismu a molekulami cizími a to díky receptorům rozpoznávajícím konzervované, pro patogen charakteristické molekulové struktury (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), jež má společné mnoho tříd mikroorganismů (Fujita *et al.*, 2004).

Lektiny jsou velmi důležitou skupinou proteinů, mající roli ve vrozené imunitě jak obratlovců tak bezobratlých živočichů a jsou považovány za funkční analogy imunoglobulinů u organismů postrádajících specifickou imunitu (Vasta *et Marchalonis*, 1984). Jejich původní funkcí byla agregace mikroorganismů a opsonizace pro fagocytózu (Vasta *et al.*, 1994), později však lektiny získaly mnohem významnější funkci v obraně proti mikroorganismům, a to aktivací komplementového systému (Iwanga, 2002).

3.2.1 Komplementový systém

Jako komplement je označována soustava asi 30ti sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou, tak s dalšími imunitními mechanismy. Hlavní složku tvoří 9 sérových proteinů označených C1 – C9. Klíčovou úlohu zde hraje C3 komponenta, která se po aktivaci serinovými proteázami kovalentně váže na povrch mikrobů nebo imunních komplexů. Aktivovaná C3 komponenta tak označuje cizí částice pro fagocytózu a také spouští kaskádovitou aktivaci dalších složek komplementu (Smith *et al.*, 1999). Meziprodukty této reakce mají výrazné biologické funkce jakými jsou opsonizace či chemotaxe leukocytů. Konečným produktem komplementové kaskády je komplex napadající membránu (MAC, membrane attack complex), který perforuje membrány mikroorganismů a způsobuje jejich lýzu (Hořejší *et* Batůňková, 2001).

Komplementový systém může být aktivován třemi různými cestami a je zapojen jak do vrozené tak do získané imunitní odpovědi. Klasickou cestou je komplement aktivován komplexy antigen-protilátka a je hlavním efektoem v protilátkami zprostředkované imunitě. Zbývající dva způsoby aktivace komplementu jsou součástí vrozené imunity. Alternativní cesta, která je nezávisle na protilátkách aktivována molekulami na povrchu bakterií a Lektinová cesta zahrnuje rozpoznávání sacharidu na povrchu patogena pomocí manózu vázajícího lektinu (MBL, mannose-binding lectin) či pomocí skupiny lektinů označovaných jako fikoliny (Matsushita *et al.*, 2001).



Obrázek 3.4: Cross-aktivace Lektinové cesty komplementu interakcí C-reaktivního proteinu s fikoliny (převzato z Ng *et al.*, 2007).

Lektinová cesta aktivace komplementu

Jak již bylo zmíněno, komplement může být aktivován pomocí manózu vázajícího lektinu (MBL, Mannose-binding lectin), který patří do rodiny kolektinů, či pomocí fikolinů. MBL i fikoliny po vazbě na sacharidy povrchových složek mikrobu aktivují proteázy asociované s MBL (MASPs, Mannose-binding lectin associated serine proteases) (Hoffmann *et al.*, 1999), schopné dále štěpit komponenty komplementové kaskády C4, C2 a C3.

Manózu vázající lektin

Manózu vázající lektin je lektin typu C, který hraje významnou roli v počáteční fázi imunitní odpovědi. Patří do rodiny kolektinů, které ve své struktuře obsahují kolagenu podobnou doménu a doménu rozpoznávající sacharidy (CRD, carbohydrate-recognition domain) (Taylor *et al.*, 1990). Pomocí CRD váže MBL za přítomnosti iontů vápníku sacharidy obsahující 3- a 4-hydroxylové skupiny navázané na pyranózu za přítomnosti iontů vápníku. Vazebnou doménu tvoří pět konzervovaných aminokyselinových zbytků: Glu184, Asn186, Glu191, Asn205 a Asp206. Hlavními

ligandy pro MBL jsou D-manóza a *N*-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), ale také další, strukturně odlišné sacharidy. Patří mezi ně například D-galaktóza a kyselina sialová. Tato selektivita umožňuje rozpoznání sacharidů na patogenních organismech jako jsou bakterie, houby, parazitičtí prvoci nebo viry (Matsushita *et al.*, 2001).

Fikoliny

Fikoliny, podobně jako MBL obsahují kolagenu podobnou doménu i CRD. CRD fikolinů je podobná C-koncové části beta a gama řetězce fibrinogenu, odtud název fibrinogenu podobná doména (FReD, Fibrinogen-related domain) (Lu, 1997). Fikoliny byly identifikovány u bezobratlých (sumka), i obratlovců (žába, ježek, hlodavci, prase a člověk) (Matsushita *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1998). Lektiny z těchto organismů mají společnou specifitu pro GlcNAc. V lidském séru byly identifikovány dva typy fikolinů s lektinovou aktivitou: L-fikoliny a H-fikoliny. Oba typy sérových lektinů dokáží v asociaci s MASPs aktivovat lektinovou cestu komplementu. Fibrinogenu podobná doména některých fikolinů má podobnou funkci jako CRD lektinů typu C, a proto fikoliny a jim podobné proteiny mají funkci rozpoznávacích receptorů (Fujita, 2004).

3.3 Lektiny

Roku 1888 estonský vědec Peter Herman Stillmark zjistil, že extrakt z fazolí obsahuje protein, který aglutinuje červené krevní buňky. Tímto aglutininem byl vysoce toxický protein nazvaný ricin. Jak bylo později zjištěno, takové proteiny se schopností aglutinovat se vyskytují ve virech, bakteriích, většině rostlin i u některých živočichů. Zájem o tyto proteiny poprvé vzrostl ve spojení s krevními transfuzemi a určováním krevních skupin a to díky vlastnosti různých lektinů aglutinovat jen určité krevní skupiny. Na základě této skutečnosti byly tyto aglutininy přejmenovány na lektiny. Jejich název je odvozený z latinského „legere“, v překladu číst/vybírat (Boyd et Shapleigh, 1954).

Později byl název lektin vztáhnut obecně k proteinům vázajícím sacharidy, které jsou schopny aglutinovat nejen červené krvinky, ale i jiné buňky. Dnes jsou lektiny

definovány jako proteiny neimunního původu s nejméně jednou doménou, reverzibilně vázající specifický oligosacharid nebo glykoprotein, které ale enzymaticky tyto sacharidy/glykoproteiny nemění (Peumans *et Van Damme*, 1995).

Lektiny jsou důležité molekuly humorální i buněčné imunitní odpovědi, účastníci se rozpoznání patogenů a obrany proti nim opsonizací fagocytózy. Na druhou stranu mohou být také velmi důležité jako receptory či „homing“ faktory pro přenos patogenů jejich vektory. Lektiny mohou kromě glykosylovaných složek virů, bakterií nebo jiných patogenů interagovat také s glykokonjugáty vlastními (přehledně v Grubhoffer *et al.*, 2008).

3.3.1 Rozdělení lektinů

Lektiny můžeme klasifikovat na základě jejich funkce či struktury. Z funkčního hlediska rozlišujeme lektiny rozpoznávající endogenní či exogenní ligandy.

Lektiny rozpoznávající endogenní ligandy:

Hrají podstatnou roli při oplodnění a procesech důležitých pro vývoj jedince. Uplatňují se také v interakcích buňka-buňka nebo buňka-extracelulární matrix.

Lektiny rozpoznávající exogenní ligandy:

Se pravděpodobně vyvinuly jako nástroj pro rozpoznávání molekul organismu vlastních od molekul cizích (self/non-self). Mohou se vyskytovat navázané na povrchu buněk nebo rozpuštěné v tělesných tekutinách (Arason, 1996).

Na základě strukturních vlastností dělíme lektiny do tří základních skupin:

Merolektiny:

Merolektiny jsou proteiny obsahující pouze jednu sacharid vázající doménu. Jsou to malé proteiny tvořené jedním polypeptidem, které nejsou díky své jednovazebnosti schopny aglutinace buněk či precipitace glykokonjugátů.

Hololektiny:

Obsahují dvě nebo více stejných nebo velmi podobných domén vázajících sacharidy. Díky několika vazebným místům jsou tyto lektiny schopny aglutinovat či precipitovat své ligandy.

Chimerolektiny:

Tvoří jedna či více domén vázajících sacharidy a kromě těchto obsahují i další, nepříbuzné domény s jinou biologickou funkcí (Peumans, 1995).

Dále je možno na základě struktury lektiny dělit na: Calnexiny, M-lektiny, L-lektiny, P-lektiny, I-lektiny, R-lektiny, F-lektiny, C-lektiny, Galektiny, Pentraxiny, Fikoliny a mnoho dalších. Nejvíce pozornosti je v současné době věnováno posledně čtyřem jmenovaným (viz níže). Fikolinům, proteinům s kolagenu podobnou i fibrinogenu podobnou doménou, je věnována pozornost v kapitole 3.2.1 Komplementový systém.

Lektinová rodina	Typický sacharidový ligand	Buněčná lokalizace	Funkce
Kalnexiny	Glc ₁ Man ₉	ER	Třídění proteinů v ER
Lektiny typu M	Man ₈	ER	Degradace glykoproteinů
Lektiny typu L	Různé	ER, Golgiho komplex	Třídění proteinů v ER
Lektiny typu P	Man 6-P	Sekreční dráhy	Třídění glykoproteinů, degradace glykoproteinů v ER, značení substrátů pro enzymy
Lektiny typu C	Různé	Buněčná membrána, extracelulární tekutina	Buněčná adheze (selektiny), vrozená imunita (kolektiny)
Galektiny	β-Galaktosidy	Cytoplazma, extracelulární tekutina	Propojení glykanů v extracelulární matrix
Lektiny typu I (Siglektiny)	Kyselina sialová	Buněčná membrána	Buněčná adheze
Lektiny typu R	Různé	Golgiho komplex, buněčná membrána	Značení substrátů pro enzymy, degradace hormonálních glykoproteinů
Fikoliny	GlcNAc, GalNAc	Buněčná membrána, extracelulární tekutina	Vrozená imunita
Lektiny typu F	Oligosacharidy s terminální fukózou	Extracelulární tekutina	Vrozená imunita
Intelektiny	Gal, galaktofuranosa, pentózy	Extracelulární tekutina, buněčná membrána	Vrozená imunita, oplodnění a embryogeneze

Tabulka č.1 Přehled lektinových rodin a vlastností jejich členů (Drickamer, K.: <http://www.imperial.ac.uk/animalleclectins/ctld/lectins.html>)

3.3.1.1 Galektiny

Galektiny, původně nazývané lektiny typu S, jsou evolučně konzervované, sacharid vázající proteiny, které pro svou aktivitu vyžadují jeden anebo více volných cysteinových zbytků ve vazebném místě (Drickamer, 1988; Varki, 1999). Mají funkci regulátorů homeostázy imunitních buněk a účastní se interakcí hostitel-patogen. Členové této rodiny jsou charakterizováni přítomností CRD s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí ve své struktuře a afinitou k beta galaktosidům (Vasta, 2004). Galektiny jsou prezentovány na povrchu i uvnitř buněk a fungují tedy jak extracelulárně tak intracelulárně. Extracelulárně se mohou vázat na glykokonjugáty na povrchu jiných buněk obsahujících galaktózu.

Galektiny účinkují na různých úrovních vrozené i získané imunitní odpovědi díky schopnosti ovlivňovat přežívání či aktivaci imunitních buněk nebo Th1/Th2 cytokinovou rovnováhu. Dále mohou přispívat k rozpoznání patogena hostitelem a mohou sloužit jako receptory pro specifické interakce mezi nimi (Rabinowich *et* Gruppi, 2005).

3.3.1.2 C-lektiny (kolektiny a selektiny)

V imunitním systému mají lektiny typu C funkci receptorů, rozpoznávajících sacharidové složky, které se často nacházejí na povrchu různých patogenů. Některé tyto molekuly se podílejí na prezentaci antigenů dendritickými buňkami (Ebner *et al*, 2004).

Klasické lektiny typu C obsahují CRD doménu, ale vazba sacharidů je závislá na iontech vápníku (odtud jejich název). Jsou produkovány buď jako transmembránové proteiny nebo sekretovány jako proteiny rozpustné. Mezi rozpustné C-lektiny patří zástupci rodiny kolektinů jako jsou „surfactant protein“ A (SP-A) a „surfactant protein“ D (SP-D), vylučované plicními epitelálními buňkami a manózu vázající protein prezentovaný v plazmě (Kawasaki *et al.*, 1983). Transmembránové lektiny typu C se dělí na dvě skupiny na základě orientace jejich N-konce, který směřuje buď dovnitř nebo vně cytoplazmy. Příklady transmembránových lektinů jsou selektiny, příslušníci rodiny manózových receptorů a protein DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) (Cambi *et al.*, 2005).

Kolektiny

Název kolektin je odvozen ze dvou slov – kolagen a lektin. Tyto proteiny tvoří trimery, které se mohou seskupovat do větších oligomerů. Každý polypeptidový řetězec je tvořen čtyřmi různými doménami - na cystein bohatou N-koncovou oblast, kolagenu podobnou doménou, alfa helixem a na něj navazující C-koncovou doménou vážící sacharidy (Hakansson *et al.*, 2000).

Dosud bylo popsáno osm členů této skupiny lektinů, ale k nejlépe prozkoumanými zástupcům patří SP-A, SP-D a MBL. Tyto rozpustné proteiny účastní se vrozené imunitní odpovědi aktivují, po rozpoznání infekčního agens, efektorové mechanismy jako je přímá opsonizace, neutralizace, aglutinace, aktivace komplementu a fagocytóza (Gupta *et al.*, 2007).

Selektiny

Selektiny jsou pravděpodobně nejlépe prostudovanou skupinou lektinů typu C a to díky jejich roli adhezivních molekul, které zprostředkovávají časnou fázi infiltrace leukocytů do tkání. Jsou to membránové proteiny exprimované na endoteliálních buňkách, leukocytech a krevních destičkách. Interakce mezi selektinem cévní stěny a ligandem na povrchu buňky (leukocytu) hraje klíčovou roli v takzvaném rolování leukocytů, což je postupné přilnutí a průchod leukocytů cévní stěnou (Rodgers *et al.*, 2000).

V současnosti jsou známy tři selektiny – L-selektin exprimovaný na leukocytech, E-selektin, vyskytující se na endoteliálních buňkách a P-selektin identifikovaný na povrchu krevních destiček. Každý z nich obsahuje CRD v N-koncové oblasti a doménu podobnou epidermálnímu růstovému hormonu (epidermal growth factor-like domain). CRD všech tří typů selektinů mají afinitu ke strukturám modifikovaným kyselinou sialovou a fukózou, známým jako sialovaný Lewisův antigen NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R (SLe^x) (Varki *et al.*, 1999).

3.3.1.3 Pentraxiny

Pentraxiny jsou skupina vysoce konzervovaných proteinů vyznačujících se multimerní strukturou. Termín pentraxin byl poprvé použit pro C-reaktivní protein (CRP), skládající se z pěti podjednotek. Pentraxiny rozpoznávají široké spektrum patogenů, ale také strukturálně pozměněné a metabolizované vlastní molekuly a buněčné struktury. Dělí se na krátké a dlouhé pentraxiny. Zástupci krátkých pentraxinů jsou CRP a serum amyloid P komponenta (SAP), označované u myši a člověka jako proteiny akutní fáze (Bottazzi *et al.*, 2006). Jsou většinou produkovány v játrech jako reakce na signální molekuly zánětu, především interleukin 6. Prototypem dlouhých pentraxinů je PTX3. Jeho C-koncová doména je homologní s touto doménou u krátkých pentraxinů, ale N-koncová doména (obsahující 178 AMK) nevykazuje žádnou podobnost s jakýmkoli jinými proteiny. Zatímco sekvence CRP a SAP se liší druh od druhu, sekvence PTX3 je u všech druhů, ve kterých se vyskytuje vysoce konzervovaná (Mantovani *et al.*, 2008)

3.4 Lektiny bezobratlých živočichů

Lektiny bezobratlých živočichů hrají důležitou roli v rozpoznávání cizích molekul, čímž tvoří systém podobný vrozené imunitě obratlovců. Tyto proteiny jsou nejspíš zahrnuty v eliminaci bakterií a to omezením jejich pohyblivosti, jejich aglutinací a označením pro fagocytující buňky (Olafsen, 1996). Účastní se však také mechanismů v přenosu patogenů, jenž byly studovány u krev-sajícího hmyzu (Ingram *et Molyneux*, 1991).

Zastoupení lektinů u bezobratlých je velice široké a zahrnuje lektinové rodiny jako jsou C-type lektiny, galektiny a pentraxiny, popsané původně u savců (Vasta *et al.*, 2004). Většina lektinů izolovaných z bezobratlých živočichů pochází z hemolymfy a jsou, společně s dalšími faktory imunitního systému, produkovány hemocyty a buňkami tukového tělíska. Studie na imunitním systému bezobratlých ukázaly mnoho aspektů, společných s imunitní odpovědí obratlovců.

Nejlépe prozkoumané lektiny členovců pochází z ostrorepa amerického (*Limulus polyphemus*), ostrorepa východoasijského (*Tachypleus tridentatus*) a ze štírů *Centruroides sculpturatus* a *Parauroctonus mesanensis* (Vasta *et Marchalonis*, 1984).

Limulin, lektin izolovaný z ostrorepa *L. polyphemus* je asi 400 kDa velký glykoprotein skládající se ze šesti nekovalentně vázaných podjednotek o velikosti 67 kDa, z nichž každá je tvořena třemi polypeptidy. Lektin izolovaný z ostrorepa *T. tridentatus* je 533 kDa velký heterooligomer tvořený dvěma podjednotkami o velikostech 30 a 32 kDa. Téměř všechny tyto plasmové lektiny jsou specifické pro N-acetyl neuraminovou kyselinu a další N-acylaminosacharidy (přehledně v Grubhoffer *et al.*, 2008). Lektiny purifikované z hemolymfy *T. tridentatus*, nazvané tachylektiny 5A/5B (Tl-5A/5B), obsahují C-koncovou fibrinovou (FBG, fibrinogen) doménu s vysokou strukturní a sekvenční podobností k FBG doméně savčích fikolinů (Gokudan *et al.*, 1999).

3.4.1 Hemolymfa klíšťat

Hemolymfa klíšťat je cirkulující tělní tekutina skládající se z plasmy a různých typů buněk nazývaných hemocyty. Patří mezi ně prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, sferulocyty a oenocytoidy. Tyto buňky jsou hlavní složkou hemolymfy a představují 50-60 % jejího obsahu. Podstatné jsou zejména prohemocyty, které jsou považovány za kmenové buňky, z nichž se diferencují ostatní druhy hemocytů a plasmocyty, účastníci se fagocytózy (Sonenshine, 1991).

Nebuněčná část hemolymfy – plasma je komplexní tekutina obsahující proteiny, aminokyseliny, sacharidy, mastné kyseliny, hormony a anorganické soli. Je nezbytná pro transport hormonů, nutričních molekul či produktů buněčného metabolismu. Slouží také jako opora různých tkání a osmoticky aktivní vnitřní prostředí. V neposlední řadě se plasma účastní koagulačních mechanismů v klíšťeti (Sonenshine, 1991).

Hlavní rozpustnou složkou plasmy tvoří proteiny. Některé z nich se pravděpodobně účastní také regulace osmotického tlaku. Naše současné znalosti těchto proteinů v hemolymfě klíšťat jsou však minimální.

3.4.2 Klíšťecí lektiny

Klíšťecí proteiny s lektinovou aktivitou byly zkoumány u tvrdých i měkkých klíšťat. Tyto lektiny mají afinitu především ke kyselině sialové, různým derivátům hexosaminů, galaktóze a glykokonjugátům obsahujícím tyto cukry. Aktivita většiny těchto lektinů je závislá na příjmu hostitelské krve a předpokládá se, že interagují s glykosylovanými složkami přenášených patogenů (přehledně v Grubhoffer *et al.*,

2008).

Skupinu zatím asi nejlépe prozkoumaných lektinů lymfy tvoří viteliny a vitelogeniny (Gudderra *et al.*, 2002), jejichž tvorba je u klíštěte indukovaná příjmem potravy - krve. Několik zástupců těchto proteinů bylo charakterizováno u klíšťat - *Dermacentor variabilis* (Rosell *et Coons*, 1991) či *Ixodes scapularis* (James *et Oliver*, 1997), i klíšťáků *Ornithodoros moubata* (Chinzei *et al.*, 1983) nebo *O. parkeri* (Taylor *et Chinzei*, 2001). Obecně je sacharidové, lipidové a aminokyselinové složení vitelinů podobné jako u hmyzu, s tím rozdílem, že tyto proteiny u klíšťat obsahují ve své struktuře i hem a jsou tedy nazývány hemolipoglykoproteiny (Rosell *et Coons*, 1991). Hem získávají tyto proteiny z hemoglobinu hostitelské krve (O'Hagan, 1974). Vitelogenin cirkuluje v plazmě a je prekurzorem žlutkových proteinů potřebných k vývoji vajíček. Během vitelogenese je vitelogenin syntetizován v tukovém tělese a následně uvolňován do hemolymfy. Poté je selektivně absorbován vyvíjejícím se oocytom a následně skladován jako vitelin ve zrajícím vajíčku, kde slouží jako nutriční zdroj vyvíjejícího se embrya (Sappington *et al.*, 1995).

U klíštěte *Rhipicephallus appendiculatus*, vektora původce theileriózy (*T. parva*), byla charakterizována hemaglutinační aktivita hemolymfy, střeva a slinných žláz. Hemaglutinace hovězích červených krvinek (RBCs, red blood cells) dosahovala vyššího titru než u krvinek lidských a králíčích a její hodnota byla stejná při použití vzorku z nasátých i nenasátých klíšťat. Na druhou stranu u lidských a králíčích krvinek dosahovala hemaglutinační aktivita vyšších hodnot při použití vzorku z nasátých klíšťat než z klíšťat nenasátých (Kamwendo, 1993).

Podobné výsledky byly pozorovány u hemaglutininů izolovaných ze střeva klíštěte *Ixodes ricinus*. Jejich hemaglutinační aktivita byla efektivně inhibována sacharidy (N-acetyl-D-galaktosamin, N-acetyl-D-glukosamin), glykokonjugáty (fetuín, kyselina hyaluronová, laminarin) a také lipopolysacharidem (LPS), který je běžnou součástí buněčné stěny gram-negativních bakterií. To by mohlo nasvědčovat možné interakci hemaglutininů s bakteriemi (v tomhle případě *Borrelia burgdorferi*) ve střevě klíštěte.

Pomocí myších polyklonálních protilátek proti hemaglutinační aktivitě střeva *I. ricinus* byly identifikovány čtyři proteiny o molekulových hmotnostech 37, 60, 65 a 73 kDa (Uhlíř *et al.*, 1996). Dva tyto proteiny s lektinovou aktivitou byly izolovány a blíže identifikovány. První byl 65 kDa veliký protein se specifitou pro hovězí mucin (BSM,

bovine submaxillary mucine) a druhý 37 kDa velký protein se specifitou pro laminarin (beta-1,3-glukan) (přehledně v Grubhoffer *et al.*, 2008).

Lektin s hemaglutinační aktivitou byl také identifikován ve slinných žlázách tohoto klíštěte a byl charakterizován jako protein o velikosti 70 kDa (přehledně v Grubhoffer *et al.*, 2008).

Hemaglutinační aktivita závislá na iontech vápníku byla prokázána v hemolymfě klíštěte *I. ricinus*. Pomocí SDS-PAGE byl určen 85 kDa velký protein, vykazující vazebnou specifitu pro kyselinu sialovou, N-acetyl-D-glukosamin a D-galaktosu (Grubhoffer *et al.*, 1991). Tento protein s hemaglutinační aktivitou byl lokalizován v hemocytech klíštěte *I. ricinus*, kde je pravděpodobně produkován a skladován (Kuhn *et al.*, 1996). Tento lektin se specifitou pro kyselinu sialovou může hrát roli v interakcích klíštěte s patogeny; kyselina sialová byla detekována na povrchu spirochét *B. burgdorferi*, jejichž vektorem je právě klíště *I. ricinus* (Hulínská *et al.*, 1992).

3.4.2 Fibrinogenu podobná doména

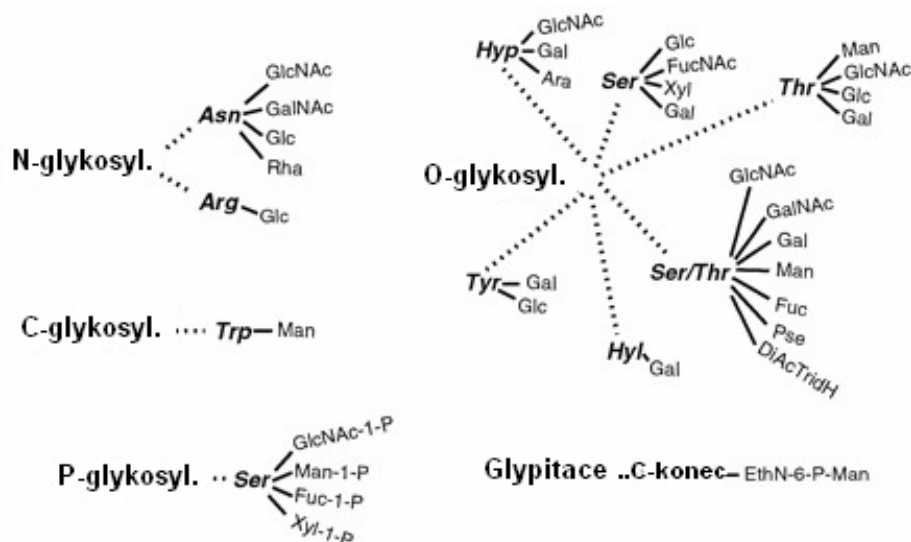
Zástupci FReD (Fibrinogen-related domain) rodiny byly identifikovány u bezobratlých živočichů i obratlovců (Xu and Doolittle 1990; Kenjo *et al.* 2001). První purifikovaný a plně charakterizovaný lektin klíštěcí hemolymfy byl izolován z klíštěte *Ornithodoros moubata*. Tento lektin, pojmenovaný Dorin M má vysokou hemaglutinační aktivitu a nejvyšší afinitu ke kyselině sialové, N-acetyl-D-hexosaminům a sialoglykoproteinům (Grubhoffer *et Kovář*, 1998). Je syntetizován hemocyty; ve větším množství je ale produkován také ve slinných žlázách klíštěte. Dorin M je glykoprotein obsahující N-vázané glykany, který tvoří v nativní formě komplexy o molekulové velikosti kolem 640 kDa. Pomocí SDS-PAGE byly identifikovány dvě nekovalentně vázané podjednotky o velikostech kolem 37 kDa. Aminokyselinová sekvence Dorinu M vykazuje silnou homologii s ostatními lektiny bezobratlých živočichů obsahujícími fibrinovou doménu jako jsou například tachylektiny 5A a 5B z ostrorepa *Tachypleus tridentatus* (Rego *et al.*, 2006). Dva podobné proteiny Ixoderin A a Ixoderin B s fibrinogenu podobnou doménou byly identifikovány u klíštěte *Ixodes ricinus*. Porovnáním sekvencí klíštěcích proteinů OMFREP (*O. moubata* fibrinogen related protein), Dorinu M a Ixoderinu A s tachylektiny byla zjištěna blízká příbuznost jejich fibrinogenu podobných domén a

tudíž je předpokládána jejich funkce v imunitním systému (Rego *et al.*, 2005).

3.5 Glykosylace

Sacharidy nám slouží jako zdroj energie a stavební materiál pro buněčné struktury. Bylo ale zjištěno, že hrají také významnou roli v buněčné komunikaci (Sharon, 1984; Brandley, 1991). Jejich nesmírný význam totiž spočívá, na rozdíl od nukleových kyselin a proteinů, v jejich obrovské diverzitě. Nukleotidy a proteiny jsou lineární polymery, které jsou tvořeny jedním základním typem vazby mezi jednotlivými monomery, takže tři různé aminokyseliny či nukleotidy mohou tvořit jen šest různých trimerů. Na druhou stranu monosacharidy mohou tvořit alfa nebo beta vazbu s jakýmkoliv uhlíkem jiného monosacharidu, což znamená, že tři různé hexózy mohou tvořit až 27 648 různých trisacharidů. Pro využití této diverzity bývá k proteinům a lipidům připojen jeden či více oligosacharidových řetězců různé délky a struktury (Sebitosy *et al.*, 2006).

Glykoprotein je glykokonjugát, ve kterém je k polypeptidovému řetězci proteinu kovalentně vázán jeden či více sacharidů. Na rozdíl od sekvencí proteinů, které jsou primárním genovým produktem, je struktura glykanového řetězce produktem sekundárním což znamená, že glykany připojené k proteinům nejsou kódovány přímo v genomu. Za strukturu glykanového řetězce jsou zodpovědné enzymy, které tyto glykany modifikují a připojují je k proteinům. Biosyntéza hlavních tříd glykanů je u eukaryot prostorově omezena na endoplazmatické retikulum (ER) a Golgiho aparát; v endoplasmatickém retikulu také dochází ke kotranslační a posttranslační modifikaci proteinů. Rozlišujeme pět typů glykosylace (Obr. 3.5) z nichž dva nejdůležitější jsou N- a O-glykosylace (Varki, 1999).



Obrázek 3.5: Typy glykosylací (převzato ze Spiro, 2002)

N-glykan je cukr kovalentně vázaný na asparaginový zbytek polypeptidového řetězce N-glykosidickou vazbou. Bylo charakterizováno pět takovýchto typů vazeb, z čehož vazba N-acetylglukosamin na asparagin je nejběžnější. Pro připojení N-glykanu není důležitý jen asparagin, ale celá aminokyselinová sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr, kde Xxx může být jakákoliv aminokyselina, kromě prolinu. Tyto sacharidy jsou velmi důležité, protože ovlivňují celkovou strukturu vzniklého glykoproteinu a mnoho jeho vlastností jako je konformace, rozpustnost či antigenita. Často ovlivňují také aktivitu proteinů/enzymů.

Vazba N-glykanu na Asn-Xxx-Ser/Thr sekvenci se děje na vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula (ER). Nově tvořené membránové glykoproteiny zůstávají zakotveny v membráně ER a jen jejich část je vystavená jeho lumen a potranslačně glykosylována. Glykoproteiny postrádající transmembránovou doménu jsou glykosylovány kotranslačně. V ER a Golgiho aparátu následně dochází k dalším úpravám glykanů sérií reakcí katalyzovaných glykosidázami a glykosyltransferázami. Produkce a aktivita většiny těchto enzymů je citlivá na fyziologický stav a biochemické vlastnosti prostředí buněk, ve kterých glykoprotein vzniká, čímž je pak dána také diverzita glykoproteinů v různých buňkách (Varki, 1999).

O-glykan je cukr vázaný O-glykosidickou vazbou. Nejčastěji jsou tyto glykany vázány skrz *N*-acetylgalactosamin (GalNAc) na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu polypeptidového řetězce. O-glykany vázané přes GalNAc bývají nazývány muciny. Kromě mucinů existují další skupiny O-glykanů, které mohou být na serin nebo/a threonin polypeptidového řetězce navázány přes: *N*-acetylfukosamin, *N*-acetylglukosamin, xylózu, manózu, fukózu, galaktózu, glukózu a 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexózu (Spiro, 2002).

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Klíšťata

K pokusům byla použita plasma tří druhů klíšťat – *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus*, získaných z interního chovu Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích udržovaného Janem Erhartem. Plasma byla odebírána polonasátým (4-5 dní sání) samicím klíšťat, sajících na morčatech.

4.2 Metody

4.2.1 Příprava plasmy

fyziologický roztok - 0,15 M NaCl

Hemolymfa byla získávána z klíšťat po odstřižení části jejich předních končetin a mírném stisknutí klíštěte. Hemolymfu jsem odebíral do fyziologického roztoku, přičemž do 100 μ l jsem odebral lymfu z asi 20 klíšťat (zhruba 50 μ l – ředění 1:3). Směs jsem následně centrifugoval 10 minut při 14 000 ot./min. a 4°C. Plasma, kterou představoval odebraný supernatant byla poté skladována při -20°C.

4.2.2 Příprava erytrocytů

fyziologický roztok - 0,15 M NaCl
heparinová zkumavka (Deltalab)

Pro pokusy byly použity králíčí i myší (Balb/c) červené krvinky. Krev byla vždy odebírána do zkumavky s heparinem. Následně byla krev při pokojové teplotě centrifugována 10 minut při 2000 ot./min. a byl odebrán supernatant. Usazené krvinky byly poté třikrát promyty fyziologickým roztokem (po každém promytí centrifugace při 2000 ot./min., 10 min., RT). Po poslední centrifugaci byl odebrán supernatant a ke krvinkám byl přidán fyziologický roztok tak aby konečná koncentrace krvinek byla 2%.

4.2.3 Příprava protilátek proti hemaglutinační aktivitě (HA)

fyziologický roztok - 0,15 M NaCl
nekompletní Freudovo Adjuvans (SERVA)

Pro přípravu protilátek proti HA bylo použito 100 μ l 2% myších krvinek, ke kterým bylo přidáno 87,5 μ l fyziologického roztoku a 12,5 μ l klíštěcí plazmy. Suspenze byla ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě k aglutinaci. Poté byla centrifugována 5 minut při 2000 ot./min. a 4 °C a po skončení byl odebrán supernatant. Následně byly krvinky třikrát promyty fyziologickým roztokem (po každém promytí centrifugace při 2000 ot./min., 10 min., 4°C). Po poslední centrifugaci byl odebrán supernatant a ke krevinkám bylo přidáno nekompletní Freudovo Adjuvans v poměru 1:1. Poté bylo 50 μ l suspenze subkutánně injikováno do inbredních BALB/c myší. Imunizace byla prováděna celkově čtyřikrát v desetidenních intervalech.

4.2.4 Hemaglutinace a inhibice hemmaglutinace

aglutinační pufr - 20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2
mikrotitrační panely typ U (Miles Laboratories, 60 jamek)

Pro stanovení hemaglutinační aktivity (HA) a inhibici hemmaglutinace byly použity mikrotitrační panely typ U.

Hemaglutinace

Hemaglutinace byla prováděna v mikrotitračních panelech pravidelným ředěním klíštěcí plasmy (10 μ l) dvojkovou řadou v aglutinačním pufru (10 μ l). Poté bylo přidáno 10 μ l 2 % suspenze králičích erytroctů a vše inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Titr hemaglutinační aktivity byl poté vyjádřen jako reciproká hodnota nejvyššího ředění vzorku, při kterém byla ještě zaznamenána pozitivní aglutinační reakce.

Inhibice hemmaglutinace

Pomocí inhibice hemmaglutinace byla sledována vazebná specifita lektinů klíštěcí plasmy pro jednotlivé inhibitory aglutinace, jimiž byly: N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin, N-acetyl-D-manosamin, N-acetyl-D-neuraminová kyselina, L-fukóza, stachyóza, bovinní submaxilární mucin (BSM), prasečí submaxilární mucin

(PSM) a fetuin. V mikrotitračních panelech bylo v 5 μ l aglutinačního pufru dvojkovou řadou ředěno 5 μ l 1M roztoků jednotlivých inhibitorů za následného přidání 5 μ l klíčecí plasmy naředěné na titr 1,5 a 10 μ l 2% suspenze krvinek.

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

4.2.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Tris-glycinový elektroforézový pufr - 0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 0,5% SDS

Zaostřovací pufr - 1 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8

Separáční pufr - 1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8

10 % APS

TEMED (SERVA)

30 % akrylamid (MERCK)

Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

4x Vzorkov  pufr + 0,8 M DTT (Fermentas)

5x Vzorkov  pufr (Fermentas)

Pro separaci proteinů klíčecí plasmy na základě jejich molekulové velikosti byla použita polyakrylamidová gelová elektroforéza. Ta byla prováděna dle Laemmliho (1970) na připravených 8% jednokontračních gelech za použití Tris-glycinového elektroforézového pufru. Gely byly připraveny následujícím způsobem:

Tabulka 2. **Jednokrační 8% gel**

zaostřovací gel (5 %)	objem (ml)	separační gel (8 %)	objem (ml)
30 % akrylamid	0,17	30 % akrylamid	1,3
destilovaná voda	0,57	destilovaná voda	2,4
zaostřovací pufr	0,25	separační pufr	1,25
10 % APS	0,01	10 % APS	0,05
TEMED	0,001	TEMED	0,003

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Klíštěcí plasma byla naředěna destilovanou vodou v poměru 1:5 a následně smíchána s odpovídajícím množstvím 4x koncentrovaného vzorkového pufru s redukujícím účinkem (obsahuje DTT) nebo 5x koncentrovaného vzorkového pufru s neredukujícím účinkem (bez DTT). Směsi byly následně inkubovány 3 minuty při 95°C.

Elektroforéza probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli při 125V. Pro určení molekulových velikostí byly použity proteinové standardy.

4.2.6 Blotovací techniky

0,1% Ponceau S (ROCHE)

PBS - 14 mM NaCl, 0,15 mM KH₂PO₄, 1,8 mM Na₂HPO₄, 0,27 mM KCl, pH 7,4
blokující roztok (AppliChem)

primární protilátky - králičí imunní sérum proti Dorinu M a proti lektinu *I. ricinus* (Laboratoř molekulární biologie vektorů a patogenů, PaÚ BC AVČR), myšší imunní sérum proti HA hemolymfy *R. appendiculatus*

sekundární protilátky – (Vector, Invitrogen)

PBS-Tween 20 - 0,05% Tween 20 v PBS

Blotovací pufr - 20% methanol, 25 mM Tris-base, 150 mM glycin

Vyvíjecí roztok - 100 mM Tris-HCl (pH 7,2), 0,6 mM 3,3'-diaminobenzidin, 0,01 % peroxid vodíku

Pro přenesení elektroforeticky rozdělených proteinů na PVDF (polyvinyliden fluorid) membránu byla použita metoda podle Towbina *et al.* (1979) a blotovací aparatura Trans-blot (Bio-Rad). Membrána s navázanými proteiny byla následně použita k identifikaci proteinů specifickými protilátkami, popřípadě pro jodistanové/Schiffovo barvení a pro barvení za použití lektinů.

4.2.6.1 Immunobloting

Po přenesení elektroforeticky rozdělených proteinů na membránu byla membrána promyta PBS pufrem a 5 minut barvena v Ponceau S. Následně byla nařezána na proužky a odbarvena opětovným promytím v PBS. Poté byly proužky inkubovány 2 hodiny v blokujícím roztoku, promyty v PBS a opět inkubovány 3 hodiny s králičím polyklonálním sérem proti Dorinu M (1:100), lektinu hemolymfy *I. ricinus* (1:100) nebo s myším polyklonálním sérem proti hemaglutinační aktivitě hemolymfy

klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (1:200) ředěném v blokujícím roztoku. Proužky byly promyty v 0,05% PBS-Tween 20 a inkubovány 1 hodinu se sekundárními protilátkami SwAM/Px nebo SwAR/Px ředěnými 1:1000 v blokujícím roztoku. Posledním krokem bylo promytí proužků v 0,05% PBS-Tween 20 a vizualizace specifických proteinů vyvíjecím roztokem obsahujícím peroxid vodíku. Všechny reakce probíhaly za pokojové teploty.

4.2.6.2 Detekce glykoproteinů

Na membránu navázané glykosylované proteiny byly detekovány kitem GelCode® Glycoprotein Staining Kit (Pierce) barvením založeným na Schiffově reakci, které bylo prováděno přesně podle instrukcí výrobce.

4.2.6.3 Lektinový afinobloting

Pro určení sacharidů, obsažených v glykanech navázaných na plasmové glykoproteiny, byly použity lektiny (DIG Glycan Differentiation Kit, ROCHE) konjugované se steroidním haptenem digoxigeninem (DIG). Po přenesení elektroforeticky rozdělených proteinů na PVDF membránu bylo provedeno značení jednotlivými lektiny (GNA, SNA, DSA, MAA, PNA – viz. níže) a následná inkubace s anti-DIG protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou dle postupu, doporučeného výrobcem. Po důkladném promytí membrány byla provedena vizualizace za použití roztoku NBT/BCIP.

Původ a specifita jednotlivých lektinů

GNA - *Galanthus nivalis* agglutinin – specifický pro terminální manosu

SNA - *Sambucus nigra* agglutinin – specifický pro sialovou kyselinu terminálně připojenou $\alpha(2-6)$ ke galaktose nebo N-acetyl-galaktosaminu

MAA - *Maackia amurensis* agglutinin – specifický pro sialovou kyselinu terminálně připojenou $\alpha(2-3)$ ke galaktose

PNA - peanut agglutinin – specifický pro galaktóza- $\beta(1-3)$ -N-acetyl-galaktosamin

DSA - *Datura stramonium* agglutinin – specifický pro galaktóza- $\beta(1-4)$ -N-acetyl-glukosamin, N-acetyl-glukosamin

4.2.7 Enzymatická deglykosylace

Pomocí enzymů PNGáza F a Endo H (New England Biolabs) byly deglykosylovány proteiny klíštěcí plazmy. Pro reakci s PNGázou F bylo použito 13,6 μ l plazmy, 3 μ l denaturačního pufru a 7 μ l destilované vody. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37°C a poté k ní bylo přidáno 3 μ l G7 pufru, 3 μ l NP-40 pufru a 0,5 μ l PNGázy F.

Pro deglykosylaci enzymem Endo H bylo pro reakci použito 13,6 μ l plazmy, 1,5 μ l denaturačního pufru a 14,4 μ l destilované vody. Směs byla také inkubována 1 hodinu při 37°C a následně k ní bylo přidáno 2 μ l enzymu Endo H.

Po přidání deglykosylačních enzymů byly směsi inkubovány přes noc při 37°C a následně skladovány při -20°C.

4.2.8 Imunoafinitní chromatografie

1% PBS-Tween 20 - 1% Tween 20 v PBS
0.01% PBS-Tween 20 - 0,01% Tween 20 v PBS
magnetické kuličky Dynabeads (Invitrogen)
eluční pufr (Pierce)

Pro purifikaci lektinů, identifikovaných protilátkami proti hemaglutinační aktivitě *R. appendiculatus* byly použity magnetické kuličky Dynabeads s navázaným proteinem G. 50 μ l klíštěcí plazmy všech tří druhů klíšťat bylo inkubováno 3 hodiny při pokojové teplotě s 5 μ l protilátek proti HA *R. appendiculatus*, 1 μ l 1% PBS-Tween 20 a 44 μ l PBS. Poté byla směs přidána k magnetickým kuličkám a inkubována 1 hodinu při RT. Kuličky s navázanými lektiny byly následně šestkrát promyty v 0,01 % PBS-Tween. Posledním krokem bylo uvolnění lektinů navázaných na kuličkách pomocí elučního pufru.

Purifikované lektiny byly následně separovány na základě svých molekulových hmotností metodou SDS-PAGE a barveny za použití barviva Coomassie Brilliant Blue CBB R-250. Obarvené proteiny byly z gelu vyřezány a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (viz. níže).

4.2.9 Hmotnostní spektrometrie

PageBlue (Fermentas)

40% ACN v 100 mM (NH₄)₂CO₃, pH 8,0

roztok trypsinu - 0,1 μg/μl trypsinu (Sigma ALdrich) v 9% ACN/100 mM (NH₄)₂CO₃, pH 8,0

Zip Tip (Millipore)

50% ACN v 0,1% kyselině mravčí (FA)

C-18 koloně (Waters)

K další analýze plazmových proteinů detekovaných protilátkami proti HA *R. appendiculatus* a FReP *I. ricinus* a *O. moubata* bylo použito hmotnostní spektrometrie, což je fyzikálně chemická metoda, která nám umožňuje určit molekulové hmotnosti molekul a molekulových fragmentů, převedených do formy nabitých částic.

Vzorky byly analyzovány Mgr. Petrem Koníkem v Laboratoři strukturní biologie PŘF JU na hmotnostním spektrometru vybaveném kapalinovou chromatografií nano nanoACQUITY-ESI-Q-ToF-PREMIER (Waters).

Proteiny plazmy klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* v neredukované i redukované podobě byly pomocí SDS-PAGE ve stejnosměrném elektrickém poli rozděleny na základě svých molekulových velikostí. Následně byly barveny za použití barviva PageBlue.

Obarvené proteiny, odpovídající lektinům detekovaným protilátkami byly z SDS-PAGE gelu vyřezány, promyty deionizovanou vodou a dvakrát odbarveny v 40% ACN. Gel byl poté vysušen v ve vakuu a rehydrován 20 μl roztoku trypsinu. Štěpení probíhalo přes noc při 37°C. Vzniklé peptidy byly následně pomocí špiček Zip Tip převedeny do 20 μl 50% ACN, roztok byl zahuštěn na 10 μl a naředěn 10 μl 0,1% FA.

Trypsické štěpy byly separovány na C-18 koloně a separovány v gradientu 3 – 60% ACN v 0,1% FA, ionizovány metodou ESI a m/z hodnoty pro jednotlivé peptidy byly získány v Q-ToF hmotnostním spektrometru. V případě potřeby byla provedena MS/MS analýza.

Data byla analyzována softwarem ProteinLynxGlobalServer 2.3 (Waters). Pro identifikaci peptidů byly použity databáze NCBI hypotetických i identifikovaných proteinů členů čeledi *Ixodidae* a obecná databáze SWISSPROT (obsahující většinu známých proteinů).

5. Výsledky

5.1 Hemaglutinace a inhibice hemaglutinace

Pro určení míry hemaglutinační aktivity hemolymfy klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* byla použita 2 % suspenze králičích červených krvinek. Jak se ukázalo, účinné hemaglutinace erytrocytů bylo dosaženo i za použití 192x ředěné plazmy a to v případě všech tří druhů klíšťat.

Ke stanovení vazebné specifity proteinů plazmy schopných aglutinovat červené krvinky byl proveden test inhibice hemaglutinace. Jako inhibitory byly použity sacharidy (N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin, N-acetyl-D-manosamin, N-acetyl-D-neuraminová kyselina, L-fukosa, stachyosa) a glykoproteiny (BSM - bovinní submaxilární mucin, PSM - prasečí submaxilární mucin, Fetuin).

Rhipicephalus appendiculatus

Inhibitor	Koncentrace odpovídající 50% inhibici (mol/l)
N-acetyl-D-neuraminová kyselina	0,0312
N-acetyl-D-manosamin	0,0624
N-acetyl-D-glukosamin	0,125
N-acetyl-D-galaktosamin	0,5
L-fukosa	0,5
Stachyosa	0,5
BSM	0,0312
PSM	0,250
Fetuin	0,5

Rhipicephalus pulchellus

Inhibitor	Koncentrace odpovídající 50% inhibici (mol/l)
N-acetyl-D-neuraminová kyselina	0,0312
N-acetyl-D-galaktosamin	0,5
N-acetyl-D-manosamin	0,5
N-acetyl-D-glukosamin	-
L-fukosa	-
Stachyosa	-
BSM	0,0312
PSM	0,5
Fetuin	-

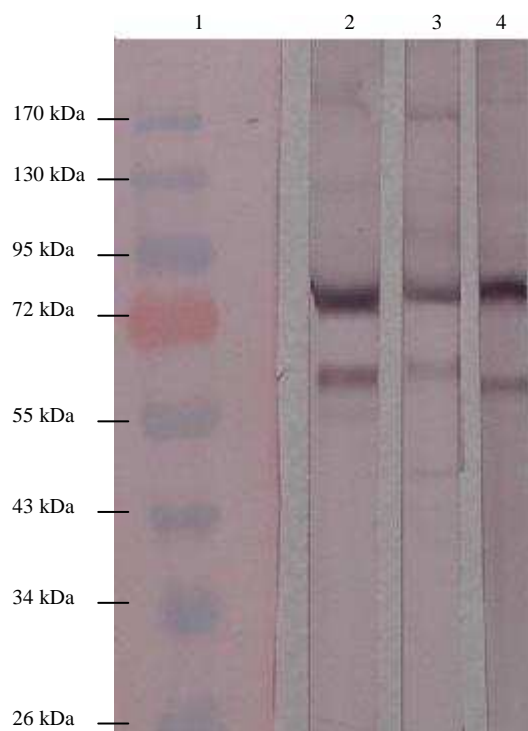
Rhipicephalus sanguineus

Inhibitor	Koncentrace odpovídající 50% inhibici (mol/l)
N-acetyl-D-neuraminová kyselina	0,0312
N-acetyl-D-manosamin	0,0312
N-acetyl-D-galaktosamin	0,0625
N-acetyl-D-glukosamin	0,0625
L-fukosa	0,250
Stachyosa	-
BSM	0,0312
Fetuin	0,0625
PSM	0,250

Výsledky testu inhibice hemaglutinace ukazují, že ze sacharidů patří k nejlepším inhibitorům HA plazmy všech tří druhů klíšťat kyselina sialová a další N-acetyl-D-hexosaminy. Z vybraných glykoproteinů se nejlepším inhibitorem ukázal být bovinní submaxilární mucin (BSM) a to opět u všech tří druhů klíšťat. Specifita lektinů plazmy pro ostatní inhibitory vykazovala u jednotlivých klíšťat malé odchylky, které však nebyly nijak zásadní.

5.2 Příprava protilátek proti hemaglutinační aktivitě (HA)

Na základě faktu, že proteiny hemolymfy zkoumaných klíšťat aglutinují myší červené krvinky, byly proti těmto lektinům hemolymfy klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* vytvořeny myší polyklonální protilátky. Specifita těchto protilátek byla otestována na hemolymfě všech tří druhů klíšťat.



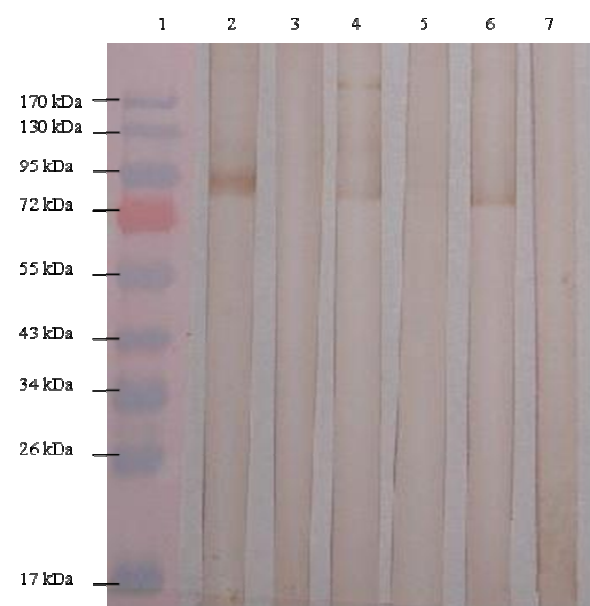
Obrázek 1: Detekce proteinů plazmy protilátkami proti HA *R. appendiculatus*.

1 - značený molekulový standard,
2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
3 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,

Za použití těchto protilátek byly při imunoblotování neredukovaných vzorků plazmy klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* detekovány tři proteiny. Nejsilněji byl rozpoznáván protein o velikosti 75 kDa. O něco slabší byl signál u proteinu o velikosti 58 kDa. Velmi slabě byl rozpoznáván protein o velikosti 180 kDa.

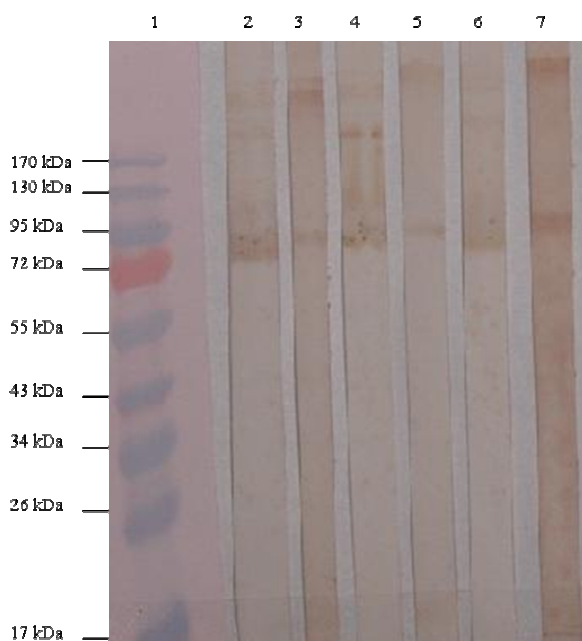
5.3 Immunobloting

K detekci fibrinogenu podobných proteinů v plazmě klíšťat *R. a.*, *R. p.*, a *R. s.* byl proveden Western blot, elektroforézou rozdělených proteinů plazmy a následné imunoznačení pomocí protilátek proti fibrinogenu podobným proteinům klíštěte *Ixodes ricinus* a klíšťáka *Ornithodoros moubata*.



Obrázek 2: Detekce lektinů protilátkami proti FReP *I. ricinus*.

- 1 - značený molekulový standard,
- 2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
- 3 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
- 4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
- 5 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
- 6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
- 7 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*



Obrázek 3: Detekce lektinů protilátkami proti FReP *O. moubata*.

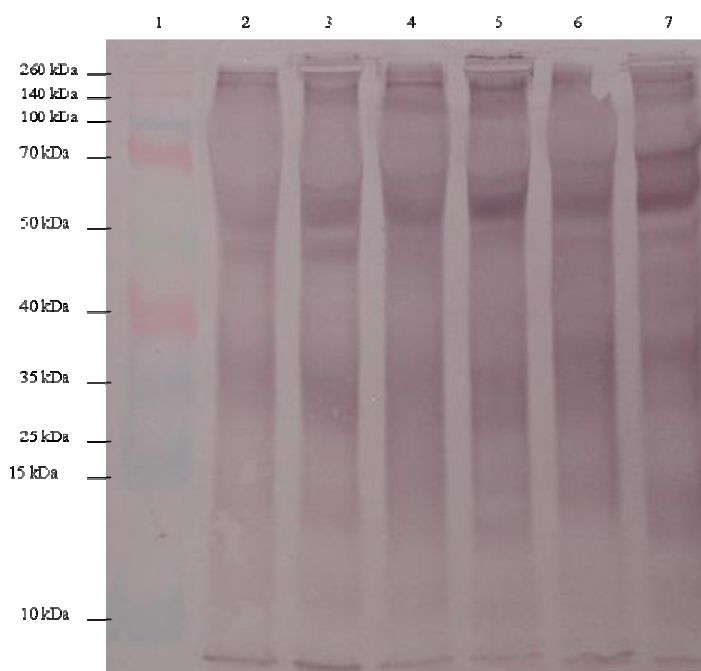
- 1 - značený molekulový standard,
- 2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
- 3 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
- 4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
- 5 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
- 6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
- 7 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*

Protilátky proti FReP *I. ricinus* (Obr. 2) i *O. moubata* (Obr. 3) rozpoznávaly u neredukovaných i redukovaných vzorků všech tří druhů klíšťat protein o velikosti 75

kDa. Dále byl detekován protein o velikosti 180 kDa, který byl silně rozpoznáván jen u neredukovaného vzorku *R. pulchellus*. U ostatních vzorků byl tento protein rozpoznáván velmi slabě.

5.4 Detekce glykoproteinů

K ověření, zda jsou identifikované proteiny, rozpoznávané protilátkami proti FReP *I. ricinus* a *O. moubata* a protilátkami proti HA plazmy *R. appendiculatus* glykosylované, bylo provedeno barvení glykoproteinů podle Schiffa.



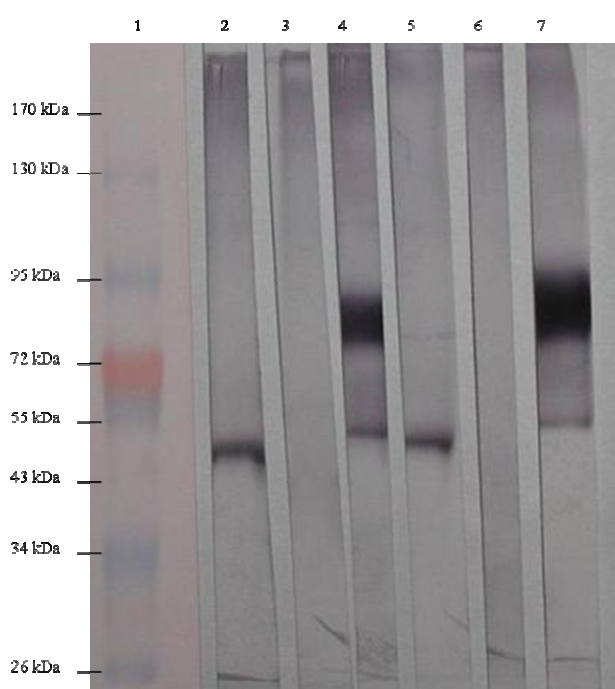
Obrázek 4: Detekce glykoproteinů.

1 - značený molekulový standard,
2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
3 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
5 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
7 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*

Na základě pozitivní reakce během barvení glykoproteinů, kterou poskytovaly detekované proteiny o velikosti 58 kDa a 180 kDa je zřejmé, že jsou tyto lektiny glykosylované. Negativní reakce, čili možná nepřítomnost glykanů, byla pozorována u proteinu o velikosti 75 kDa.

5.5 Enzymatická deglykosylace

Fakt, že jsou lektiny hemolymfy klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* glykosylované byl potvrzen předchozím barvením glykoproteinů podle Schiffa. Pro další charakterizaci proteinů, detekovaných protilátkami proti hemaglutinační aktivitě hemolymfy byla provedena enzymatická deglykosylace těchto proteinů glykosidázami PNGasou F a Endo H. Proteiny byly následně separované pomocí SDS-PAGE, přeneseny na PVDF membránu a detekovány pomocí protilátek namířených proti HA hemolymfy *R. appendiculatus*. Tato reakce mi umožnila určit podíl glykanů na molekulové hmotnosti glykosylovaných proteinů.



Obrázek 5: Detekce deglykosylovaných proteinů plasmy protilátkami proti HA.

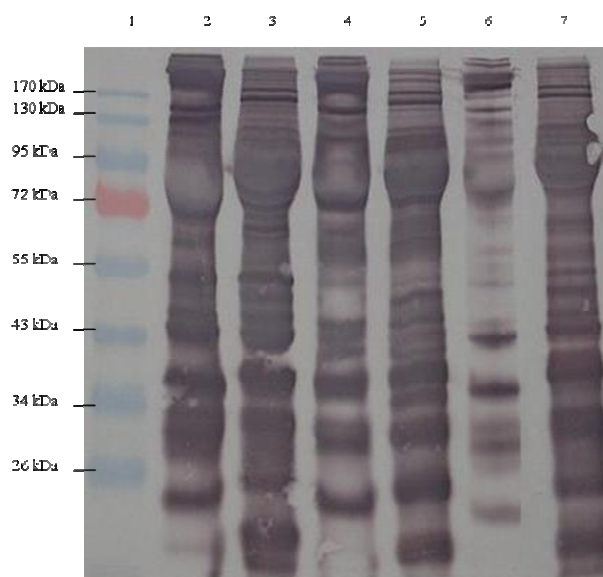
1 - značený molekulový standard, **2** - deglykosylovaná plazma *R. appendiculatus* enzymem Endo H, **3** - deglykosylovaná plazma *R. appendiculatus* PNGasou F, **4** - plazma *R. appendiculatus*, **5** - deglykosylovaná plazma *R. sanguineus* enzymem Endo H, **6** - deglykosylovaná plazma *R. sanguineus* PNGasou F, **7** - plazma *R. sanguineus*

V hemolymfě klíšťat *R. appendiculatus* a *R. pulchellus* byly identifikovány dva proteiny o molekulových hmotnostech 75 kDa a 58 kDa. V neredukovaném vzorku obou klíšťat deglykosylovaných enzymem PNGasou F nebyl touto protilátkou detekován žádný protein. Při deglykosylaci enzymem Endo H byl v neredukovaných

vzorcích plazmy klíšťat *R.a.* a *R.s.* identifikován protein o molekulové hmotnosti 56 kDa.

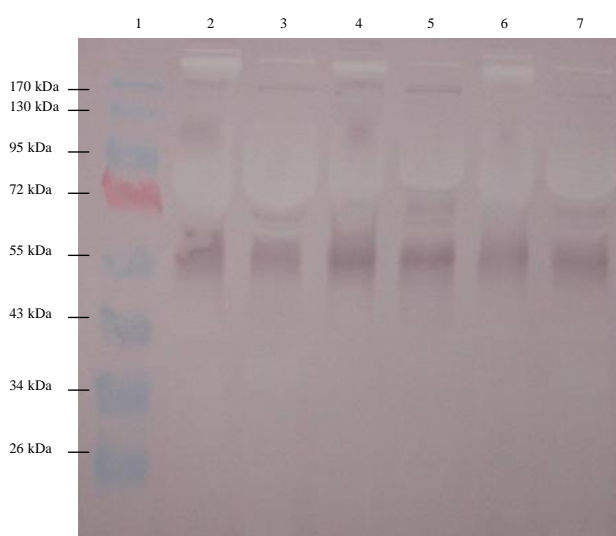
5.6 Lektinový afinobloting

Pro určení vazebné specifity proteinů hemolymfy a zároveň bližší určení a charakterizaci vázaných glykanů bylo použito navázání značených lektinů (GNA, SNA, MAA, PNA, DSA).



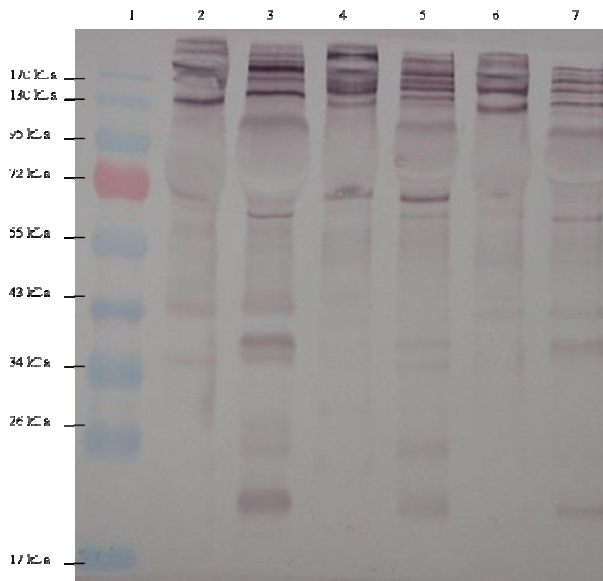
Obrázek 6: Lektinobloting – lektin GNA.

1 - značený molekulový standard,
2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
3 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
5 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
7 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*



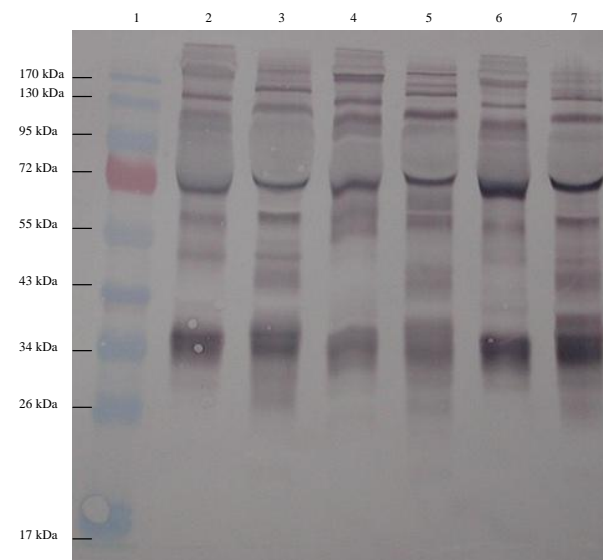
Obrázek 7: Lektinobloting – lektin SNA.

1 - značený molekulový standard,
2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
3 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
5 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
7 - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*



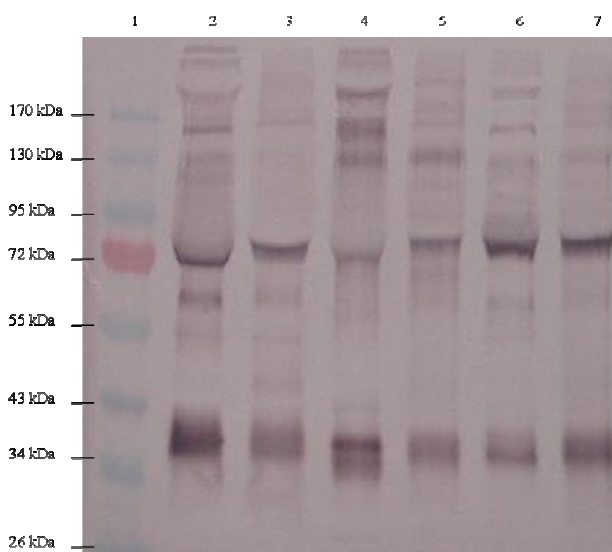
Obrázek 8: Lektinobloting – lektin MMA.

1 - značený molekulový standard,
 2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 3 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 5 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
 7 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*



Obrázek 9: Lektinobloting – lektin PNA.

1 - značený molekulový standard,
 2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 3 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 5 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
 7 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*



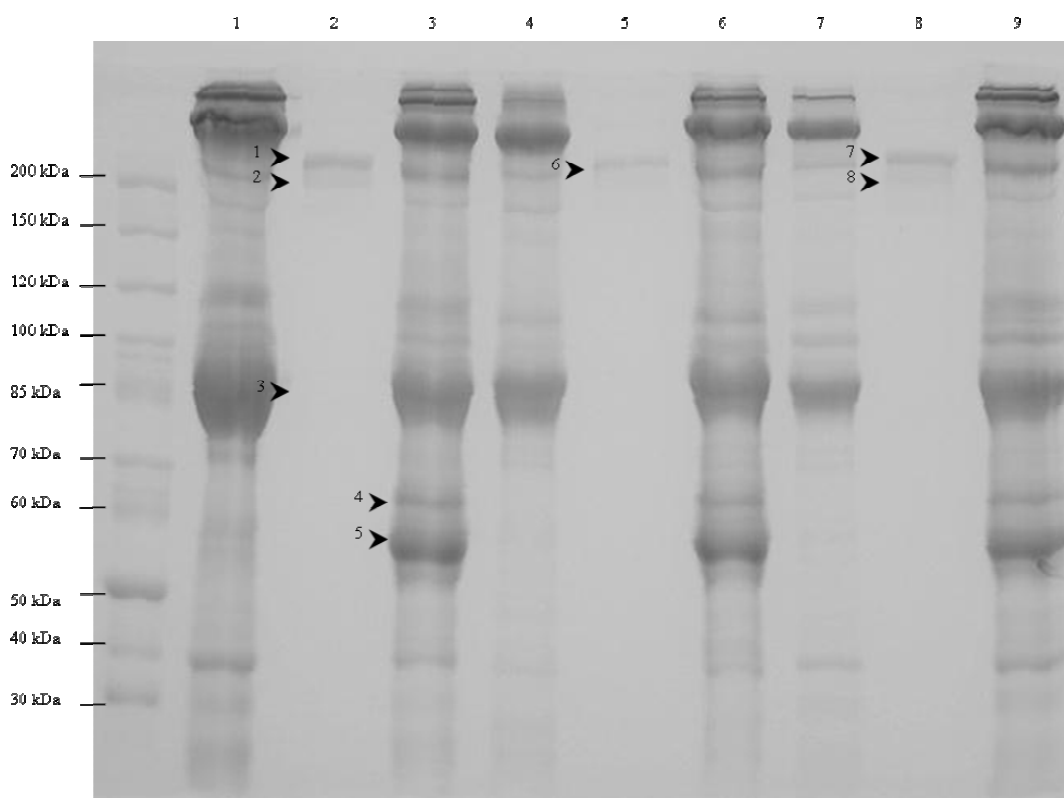
Obrázek 10: Lektinobloting – lektin DSA.

1 - značený molekulový standard,
 2 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 3 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*,
 4 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 5 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*,
 6 - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*,
 7 - redukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*

Detekované proteiny o velikosti 58 kDa a 180 kDa pozitivně reagovaly se všemi pěti specifickými lektiny (GNA, SNA, MAA, PNA, DSA). Protein o velikosti 75 kDa reagoval pouze s lektinem GNA.

5.7 Hmotnostní spektrometrie

Plazmové proteiny s hemaglutinační aktivitou byly z hemolymfy všech tří druhů klíšťat purifikovány pomocí imunoafinitní chromatografie. Po separaci SDS-PAGE elektroforézou a obarvení PageBlue byly viditelné proteiny s molekulovou hmotností kolem 210 kDa (viz obr. 11).

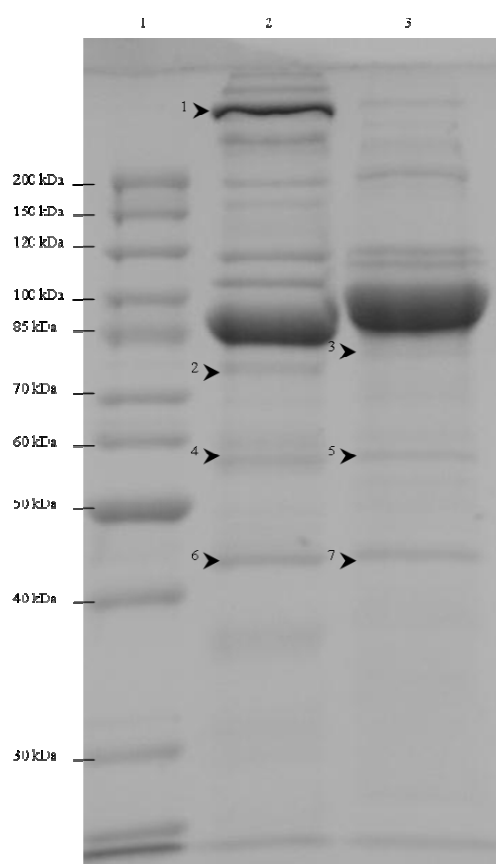


Obrázek 11: SDS-PAGE purifikovaných proteinů imunoafinitní chromatografií.

1 – plazma *R. a.*, 2 – purifikované proteiny *R. a.*, 3 – flow-through *R. a.*, 4 – plazma *R. p.*, 5 – purifikované proteiny *R. p.*, 6 – flow-through *R. p.*, 7 – plazma *R. s.*, 8 – purifikované proteiny *R. s.*, 9 – flow-through *R. s.*

Izolované proteiny (Obr.11) byly z gelu vyřezány a budou analyzovány hmotnostní spektrometrií (MS).

Proteiny plazmy *R. appendiculatus*, odpovídající proteinům detekovaným protilátkami proti lektinům *I. ricinus*, *O. moubata* a hemaglutinační aktivitě *R. appendiculatus* byly po separaci SDS-PAGE za redukovaných i nereduovaných podmínek vyřezány z gelu a podrobeny MS analýze. Výsledky MS analýzy jsou uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 12: Proteiny plazmy *R. appendiculatus*.

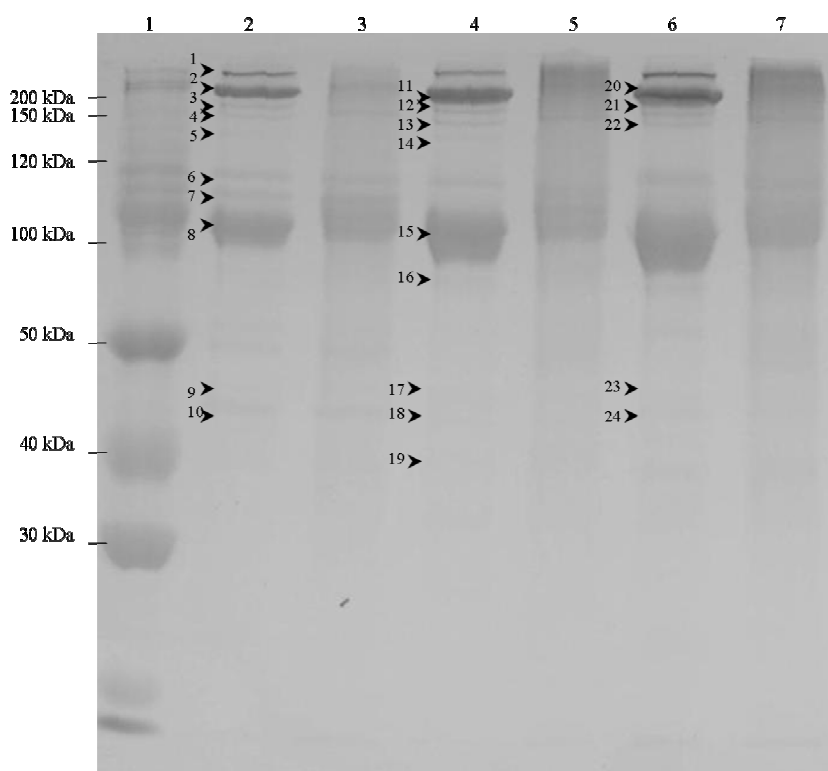
1 – značený molekulový standard
2 – nereduovaná plazma
3 – redukováná plazma

Tabulka 1: MS analýza proteinů *R.a.*

Vzorek	Pokrytí [%]	Protein
1	13,5	HLGP
2		Neidentifikováno
3		Neidentifikováno
4		Neidentifikováno
5		Neidentifikováno
6	29,65	Serpin
7	26,88	Serpin

V plazmě klíštěte *R. appendiculatus* se podařilo identifikovat dva proteiny a to hemolipoglykoprotein (vzorek 1), u kterého byla prokázána O-glykosylace (sekvence analyzovaného proteinu s vyznačenými místy O-glykosylace uvedena v příloze) a serpin (vzorky 6 a 7).

MS analýza byla provedena i u dalších plazmových proteinů, tentokrát u všech tří druhů klíšťat. Výsledky MS analýzy jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek 12: SDS-PAGE proteinů *R.a.*, *R.p.*, *R.s.*

1 - značený molekulový standard, **2** - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*, **3** - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. appendiculatus*, **4** - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*, **5** - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. pulchellus*, **6** - neredukovaný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*, **7** - redukováný vzorek plazmy klíštěte *R. sanguineus*

Tabulka 2: MS analýza proteinů *R.a.*, *R.p.*, *R.s.*

Vzorek	Pokrytí [%]	Protein	Vzorek	Pokrytí [%]	Protein
1	11,95	HLGP	13		Neidentifikováno
2	9,5	HLGP	14		Neidentifikováno
3	8,4	HLGP	15	5	HLGP
4	3,2	HLGP	16		Neidentifikováno
5	2,5	HLGP	17		Neidentifikováno
6	5,1	HLGP	18		Neidentifikováno
7	5,1	HLGP	19		Neidentifikováno
8	8,5	HLGP	20	17,6	HLGP
9	21,6	Serpin	21	7,5	HLGP
10	34,1	Serpin	22	5,3	HLGP
11	4,2	HLGP	23	20	Serpin
12		Neidentifikováno	24	26,1	Serpin

Výsledky MS analýzy ukazují, že jedním z proteinů, rozeznávaných protilátkami proti lektinům *I. ricinus*, *O. moubata* a HA *R. appendiculatus* je hemolipoglykoprotein. U hemolipoglykoproteinu klíštěte *R. sanguineus* (vzorek 20) byla prokázána O-glykosylace (sekvence analyzovaného proteinu uvedena v příloze). Druhý z nalezených proteinů, serpin byl prokázán pouze u klíšťat *R. appendiculatus* a *R. sanguineus*.

6. Diskuse

Cílem této práce bylo potvrdit přítomnost lektinů v hemolymfě klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus*, tyto proteiny identifikovat a pomocí biochemických metod charakterizovat.

Hemaglutinační aktivita

Obecnou vlastností lektinů je schopnost aglutinovat erythrocyty. Tato vlastnost byla prokázána například u lektinů klíšťáka *Ornithodoros moubata* (Grubhoffer *et* Kovář, 1998) a klíšťat *Dermacentor marginatus* (Dupejová, 2008), *Ixodes ricinus* (Grubhoffer *et al.*, 1991, Uhlíř *et al.*, 1996) a také *Rhipicephalus appendiculatus* (Sebitosi *et al.*, 1998) a *Rhipicephalus pulchellus* (Sebitosi, 2006).

V testu hemaglutinační aktivity plazmy klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* prováděném na králičích krvinkách byla u těchto klíšťat prokázána přítomnost lektinů. Účinné hemaglutinace erythrocytů bylo dosaženo i za použití 192x ředěné plazmy a to v případě všech tří druhů klíšťat. To se neshoduje s výsledky Sebitosiho (2006), který v pokusu s králičími krvinkami pozoroval mnohem vyšší hemaglutinační aktivitu plazmy klíštěte *R. appendiculatus* v porovnání s klíštětem *R. pulchellus*.

Inhibice hemaglutinace

K určení vazebné specifity proteinů, schopných aglutinovat erythrocyty byl proveden test inhibice hemaglutinace. Pro pokus byly jako inhibitory použity monosacharidy, oligosacharidy i glykoproteiny. Jak se ukázalo, největší vazebnou specifitu mají proteiny ke kyselině sialové. Nejlepšími inhibitory se tedy staly N-acetyl-D-neuraminová kyselina a vysoce sialovaný glykoprotein BSM. Stejně výsledky byly pozorovány u plazmových proteinů klíšťáka *O. moubata* (Kovář *et al.*, 2000) a klíštěte *D. marginatus* (Dupejová, 2008). Dobré inhibiční vlastnosti vykazovaly také použité N-acetyl-D-hexosaminy, což bylo také prokázáno u lektinů *I. ricinus*, *O. tartakovskyj*, *O. papillipes* a *Argas polonicus* (Vereš *et* Grubhoffer, 1990; Grubhoffer *et* Mat'ha, 1991; Grubhoffer *et al.*, 1991).

Protilátky proti HA a imunobloting

Pro bližší charakterizaci plazmových proteinů byly vytvořeny protilátky proti hemaglutinační aktivitě klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*. Ty rozeznávaly u všech tří klíšťat tři proteiny o velikostech 180 kDa, 75 kDa a 58 kDa.

Proteiny o velikosti 180 kDa a 75 kDa byly také rozpoznávány protilátkami připravenými proti fibrinogenu podobným proteinům klíštěte *I. ricinus* a klíšťáka *O. moubata*. To by mohlo znamenat, že tyto dva proteiny, stejně jako protein izolovaný z klíšťáka *O. moubata* Dorin M (Kovář *et al.*, 2000), obsahují fibrinogenu podobnou doménu. Za použití těchto protilátek byly identifikovány fibrinogenu podobné proteiny také u klíštěte *Dermacentor marginatus*: DMFREP1 (36 kDa), DMFREP2 (79 kDa), DMFREP3 (80 kDa) a DMFREP4 (177 kDa) (Dupejová, 2008).

Schiffovo barvení glykoproteinů

Další metodou, poskytující nám informaci o vlastnostech identifikovaných proteinů bylo Schiffovo barvení, na jehož základě lze určit, zda jsou na těchto proteinech vázané glykany. Jak barvení ukázalo, proteiny o velikostech 58 kDa a 180 kDa jsou zřejmě glykosylované. Protein o velikosti 75 kDa nedával pozitivní reakci, modifikace tohoto proteinu byla ale potvrzena dalšími pokusy. Glykosylace plazmových proteinů byla také potvrzena u klíšťáka *O. moubata* (Kovář *et al.*, 2000) a klíštěte *D. marginatus* (Dupejová, 2008).

Enzymatická deglykosylace

Pro další charakterizaci těchto lektinů plazmy klíšťat *R. appendiculatus* a *R. sanguineus* byla provedena enzymatická deglykosylace vzorků plazmy obou klíšťat glykosidázami PNGasou F a Endo H. U vzorků štěpených glykosidázou PNGasa F, která odstraňuje celou molekulu N-glykanů vázaných na proteiny, nebyly protilátkami detekovány žádné proteiny. Protilátky proti HA *R. appendiculatus* jsou tedy namířeny proti epitopům, pravděpodobně tvořeným glykany a částí identifikovaných proteinů. Po odstranění všech těchto glykanů glykosidázami nejsou protilátky schopny rozpoznat tyto proteiny. Vzhledem k tomu, že byl protein o velikosti 75 kDa, stejně jako proteiny o velikosti 58 kDa a 180 kDa, protilátkami rozpoznáván pouze před deglykosylací

plazmy, lze usuzovat na to, že je i tento protein glykosylován. U vzorku štěpeného enzymem Endo H, který z proteinů odštěpuje N-glykany a ponechává z nich jen poslední navázanou sacharidovou jednotku (N-acetyl-D-glukosamin), byl detekován protein o velikosti 56 kDa. Velikost modifikace tohoto proteinu je tedy přibližně 2 kDa což naznačuje přítomnost takzvaného „truncated“ glykanu. Podobné struktury byly nalezeny u plazmových lektinů *O. moubata* (Man *et al.*, 2008) a *D. marginatus* (Dupejová, 2008).

Lektinový afinobloting

Pro určení složení glykanů tří identifikovaných proteinů bylo provedeno jejich značení vybranými lektiny. Jak ukazují výsledky pokusů, protein o velikosti 75 kDa reagoval pouze s lektinem GNA, lektinem specifickým pro terminální manózu. Další dva proteiny o velikostech 58 kDa a 180 kDa reagovaly se všemi použitými lektiny, což znamená, že obsahují N-glykany s terminální manózou (lektin GNA), sialovou kyselinu terminálně připojenou ke galaktóze nebo N-acetyl-galaktosaminu (MAA, SNA), ale také O-glykany s terminálně vázanou galaktózou (PNA, DSA). Z výsledů je patrné, že proteiny nesou mimo jiné glykany s vysokým podílem manózy, což bylo prokázáno u lektinů plazmy *O. tartakovski* (Grubhoffer *et al.*, 1991), *O. moubata* (Man *et al.*, 2008) a *D. marginatus* (Dupejová, 2008).

Hmotnostní spektrometrie

Pomocí této metody byl jako jeden z proteinů reagující s protilátkami proti hemaglutinační aktivitě prokázán hemelipoglykoprotein. Tento protein byl detekován u klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus*. Hemelipoglykoproteiny jsou u klíšťat spojeny s transportem a zpracováním hemu, získaného z hemoglobinu hostitelské krve. Také se účastní ochrany tkání vektora před oxidací/redukci způsobenou hemem (Oliveira *et al.*, 1999). Takové proteiny byly identifikovány a blíže popsány například u *Ornithodoros parkeri* nebo *Dermacentor variabilis* (Gudera *et al.*, 2001). MS analýza poukázala na O-glykosylaci hemelipoglykoproteinu v plazmě *R. appendiculatus* a *R. sanguineus*. N-glykosylace dosud nebyla prokázána. Přesná struktura glykanů je i nadále předmětem studia.

U klíšťat *R. appendiculatus* a *R. sanguineus* byl v plazmě jako další protein reagující s protilátkami proti HA prokázán serpin, protein o molekulové hmotnosti 45 kDa. Inhibitory serinových proteáz (serpins - serine proteinase inhibitors) jsou proteiny

s různou funkcí účastní se hemaglutinace, fibrinolýzy, zánětu či programované buněčné smrti. Tyto proteiny o molekulové hmotnosti mezi 40-50 kDa byly identifikovány u zvířat, rostlin ale také u virů (Patson, 2000). U klíštěte *R. appendiculatus* byly identifikovány a charakterizovány čtyři serpiny (RAS -1, -2, -3, -4) (Mulenga *et al.*, 2002). Serpiny RAS-1, RAS-2 a RAS-4 byly detekovány pouze ve slinných žlázách. Serpin identifikovaný v této práci odpovídá serpinu RAS-3, exprimovanému ve všech tkáních klíštěte. Glykosylace tohoto proteinu nebyla hmotnostní spektrometrií prokázána. Na strukturách modifikujících glykanů se nadále pracuje.

7. Závěr

Cílem této práce bylo identifikovat a biochemickými metodami charakterizovat lektiny v hemolymfě tří druhů klíšťat rodu *Rhipicephalus*. Lektiny byly identifikovány za použití specifických protilátek proti lektinům z jiných klíšťat a připravenými protilátkami proti hemaglutinační aktivitě hemolymfy klíštěte *R. appendiculatus*. U identifikovaných lektinů byla sledována přítomnost a typ glykosylací a vazebná specifita pro různé sacharidy a glykoproteiny.

Přítomnost lektinů v hemolymfě klíšťat *Rhipicephalus* byla prokázána schopností plazmy všech tří druhů klíšťat aglutinovat králíčí červené krvinky. Na základě inhibice hemaglutinace prováděné pomocí monosacharidů, oligosacharidů i glykoproteinů se ukázalo, že lektiny mají největší specifitu pro kyselinu sialovou ať ve formě monosacharidu (N-acetyl-D-neuraminová kyselina) či glykoproteinu (BSM).

Pomocí specifických protilátek proti lektinům hemolymfy klíšťat *O. moubata*, *I. ricinus* a proti HA *R. appendiculatus* byly v hemolymfě všech tří druhů klíšťat *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* a *R. sanguineus* identifikovány proteiny o velikostech 180 kDa, 75 kDa a 58 kDa. U všech tří lektinů byla pomocí lektinového afinoblotu potvrzena modifikace glykany s vysokým obsahem manózy. Po provedení enzymatické deglykosylace plazmy klíšťat byla u proteinu o velikosti 58 kDa zjištěna modifikace o velikosti zhruba 2 kDa což nasvědčuje přítomnosti takzvaného „truncated“ glykanu.

Hmotnostní spektrometrií byl jako jeden z proteinů reagujících s protilátkami proti HA hemolymfy prokázán hemolipoglykoprotein. U tohoto proteinu byla nepřímými (Schiffovo barvení, lektinový afinobloting, enzymatická deglykosylace) a přímými (hmotnostní spektrometrie) analytickými metodami prokázána O-glykosylace. U klíšťat *R. appendiculatus* a *R. sanguineus* byl jako další protein reagující s protilátkami proti HA hemolymfy prokázán serpin.

8. Literatura

- Arason, G.J. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 277–289.
- Bottazzi, B., Garlanda, C., Salvatori, G., Jeannin, P., Manfredi, A. and Mantovani, A. (2006). Pentraxins as a key component of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 18, 10–15.
- Bowman, A. S., Nuttall, P. A. (2008). Ticks – Biology, Disease and Control. *Cambridge University Press*.
- Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954) Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119, 419.
- Brandley, B. K. (1991). Cell surface carbohydrates in cell adhesion. *Seminars in Cell Biology* 2, 281–287.
- Cambi, A., Koopman, M., Figdor, C. G. (2005). How C-type lectins detect pathogens *Cellular Microbiology* 7 (4), 481–488.
- Carter, G. R., Wise, D. J. (2004). Essentials of veterinary bacteriology and mycology. *Wiley-Blackwell*, 290 str.
- Cynthia, M. (editor), Kahn, M.A. (editor) (2005). The Merck Veterinary Manual. *Merck & Co., Inc.* Whitehouse Station, NJ, USA.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *Journal of Biological Chemistry* 263, 9557-9560.
- Drickamer, K. Structures and functions of animal lectins,
<<http://www.imperial.ac.uk/animalleclectins/ctld/lectins.html>>
- Dupejová, J. (2008). Izolace a biochemická charakteristika proteinů FReP u klíštěte *Dermacentor marginatus*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., Huemerl, G. M., Fritsch, P., and Romani, N. (2004). Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *International Immunology* 16, No. 6, pp. 877-887.
- Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* 198, 185-202.
- Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., *et al.* (1999). Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 10086-10091.

- Goodman, J. L., Dennis, T. P., Sonenshine, D. E. (2005). Tick-borne diseases of humans. *ASM Press*, 401 str.
- Grubhoffer, L., Mat'ha, V., 1991. New lectins in invertebrates. *Zool. Sci.* 8, 1001–1003.
- Grubhoffer, L., Vereš, J., Dusbábek, F. (1991). Lectins as molecular factors of recognition and defence reaction of ticks. *Modern Acarology* 2, eds.
- Grubhoffer, L., Kovář, V. (1998). Arthropod lectins: affinity approaches in the analysis and preparation of carbohydrate binding proteins. In *Techniques in Insect Immunology* FITC-5, eds. Wiesner, A., Dunphy, G. B., Marmaras, V. J., *et al.*, pp. 47-57. Fair Haven, N.J.: SOS Publications.
- Grubhoffer, L., Rego, R. O. M., Hajdušek, O., Hypša, V., Kovář, V., Rudenko, N., Oliver, J. H. (2008). Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Nuttal, P.A., Bownam, A.S., editors. *Ticks: Biology, disease and control*. Cambridge University Press, 406-58.
- Gudderra, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M. (2001). Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology* 48, 269–278.
- Gudderra, N.P., Neese, P.A., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M. (2001). Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycochyme-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 Biochemistry and Molecular Biology* 31, 299–311.
- Gupta, G., Surolia, A. (2007). Collectins: sentinels of innate immunity. *Wiley Periodicals, Inc BioEssays* 29, 452–464.
- Hakansson, K. and Reid, K. B. M. (2000). Collectin structure: A review. *Protein Science Cambridge University Press* 9, 1607–1617..
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway C. A., Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. (2001). *Základy imunologie*. Triton, 260 str.
- Hulínská, D., Volf, P., Grubhoffer, L. (1992). Characterization of *Borrelia burgdorferi* glycoconjugates and surface carbohydrates. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Microbiologie, Hygiene* 276, 473-480.
- Chinzei Y., Chino H. and Takahasi K. (1983). Purification and properties of vitellogenin and vitellin from the tick *Ornithodoros moubata*. *J. Comp. Physiol.* 152, 13–21.
- Ingram, G.A., Molyneux, D.H., 1991. Insect lectins: role in parasite– vector interaction. *Lectin Rev* 1, 103–127.
- Iwanaga, S. (2002). The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current Opinion in Immunology* 14, 87-95.

- James, A. M., Oliver, J. H., (1997). Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 639-649.
- Kamwendo, S. P., Ingram, G. A., Musisi, F. L., Molyneux, D. H. (1993). Haemagglutinin activity in tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) haemolymph and extracts of gut and salivary glands. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87, 303-305.
- Kamwendo, S. P., Musisi, F. L., Trees, A. J., Molyneux, D. H. (1995). Effect of haemagglutinin (lectin) inhibitory sugars in *Theileria parva* infection in *Rhipicephalus appendiculatus*. *International Journal for Parasitology* 25, 29-35.
- Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I. (1983) Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *The Journal of Biochemistry* 94, 937-947.
- Keirans, J.E. (1992). Systematics of the Ixodida (*Argasidae*, *Ixodidae*, *Nuttalliellidae*): an overview and some problems. In *Tick Vector Biology, Medical and Veterinary Aspects*, ed. B. Fivaz, T. Petney and I. Horak, pp. 1-21. Heidelberg: Springer - Verlag.
- Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., *et al.* (2001). Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19959-19965.
- Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L. (2000). Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 195-205.
- Kuhn, K.-H., Ritting, M., Haupl, T., Burmester, G., R. (1994). Haemocytes of the tick *Ixodes ricinus* express coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Developmental and Comparative Immunology* 18, S115.
- Kuhn, K. H., Uhlíř, J., Grubhoffer, L. (1996). Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (*Acari: Chelicerata*). *Parasitology Research* 82, 215-221.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lu, J. (1997). Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system. *Bioassays* 19, 509-518.
- Man, P., Kovář, V., Štěrba, J., Strohalm, M., Kavan, D., Kopáček, P., Grubhoffer, L., Havlíček, V. (2008). Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 14.
- Mantovani, A., Garlanda, C., Doni, A., Bottazzi, B. (2008). Pentraxins in Innate Immunity: From C-Reactive Protein to the Long Pentraxin PTX3. *Journal of Clinical Immunology* 28, 1-13.

- Marquardt, W. C., Demaree, R. S., Grieve, R. B., (2000). Parasitology and Vector Biology. 2nd edition Academic press. *A Hadcourt Science and Technology Company*. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 52101-4495, USA
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T. (1996). A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonins. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 2449-54.
- Matsushita, M., Endo, Y., Hamasaki, N., Fujita, T. (2001). Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *International Immunopharmacology* 1, 359-63.
- Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M., Sugimoto, C. (2002). Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 267-276.
- Ng, P. M. L., Lee, C. M., Tan, S., Lu, L., Thiel, S., Ho, B., Ding, J. L. (2007). C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. *The EMBO Journal* 26, 3431–3440.
- Norval, R.A., Perry, B.D., Young, A.S (1992). The epidemiology of theileriosis in Africa. *Academic Press*. 481.
- O'Hagan, J.E., (1974). *Boophilus microplus*: Digestion of hemoglobins by the engorged female tick. *Experimental Parasitology* 35, 110–118.
- Okochi, K., Izuhara, K., Hamasaki, N. (1998). Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20721-7.
- Olafsen, J.A. (1996). Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In: Cooper, E.L. (Ed.) *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 24. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49–76.
- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Petretski, M.D., de Souza, W., Lins, U., Braga, C.M.S., Masuda, H., Oliveira, P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature* 400, 517–518.
- Patson, P. A. (2000). Serpins and other serine protease inhibitors. *Immunology Today* 21(7), 354.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., (1995). Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.
- Rabinovich, G. A.,Gruppi, A. (2005). Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunology* 27, 103–114.
- Rego, R. O. M., Hajdušek, O., Kovář, V., kopáček, P., Grubhoffer, L., Hypša, V. (2005). Molecular cloning and comparative anlysis of fibrinogen-related proteins from the soft

- tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 991-1004.
- Rego, R. O. M., Kovář, V., Kopáček, P., *et al.* (2006). The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 291-299.
- Rodgers, S. D., Camphausen, R. T., Hammer, D. A. (2000). Sialyl LewisX-Mediated, PSGL-1-Independent Rolling Adhesion on P-selectin. *Biophysical Journal* 79, 694–706.
- Rosell, R., Coons, L. B., (1991). Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of hard tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 21, 871-885.
- Samuel, W. M., Kocan, A. A., Pybus, M. J., Davis, J. W. (2001). Parasitic diseases of wild mammals. *Wiley-Blackwell*, 559 str.
- Sappington, T.W., Hays, A.R., Raikhel, A.S. (1995). Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 807–817.
- Sebitosi, E. K., Kaaya, G. P., Young, A. S., Agbede, R. I. S. (1998). Lectins in the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*: detection and partial characterization. *International Journal of Acarology* 25, 159 – 166.
- Sebitosi, E. K. (2006). Potential role of lectins in ticks *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus pulchellus* (Acari: Ixodidae). *Systematic and Applied Acarology Special Publications* 21, 1-15.
- Sharon, N. (1984). Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunology Today* 5, 143–148.
- Smith, L. C., Azumi, K., Nonaka, M. (1999). Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology* 42, 107–120.
- Sonenshine, D.E. (1991). Biology of ticks. Vol. 1. Oxford University Press, New York.
- Sonenshine, D.E. (1993). Biology of ticks. Vol. 2. Oxford University Press, New York.
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 42-56.
- Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K., Hamasaki, N. (1998). Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the Ficolin/opsonin p35 lectin family. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20721–20727.
- Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennertz, M. R., Stahl, P. D., Drickamer, K. (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *Journal of Biological Chemistry* 265, 12156-12162.

Taylor, D., Chinzei, Y., (2001). Vitellogenin and its synthesis in the soft ticks. In: Halliday, R.B., Walter, D.E., Proctor, H.C., Norton, R.A., Colloff, M.J., *Acarology: Proceedings of the 10th International Congress, Canberra, Australia, July 5-10, 1998*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 622-627.

Theiler, A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. *First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa*, 7–46.

Uhlř, J., Grubhoffer, L., Volf, P. (1996). Novel agglutinin in the midgut of the tick *Ixodes ricinus*. *Folia parasitologica* 43, 233-239.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999). Essentials of Glycobiology. *CSHL Press*, 653 str.

Vasta, G. R., Marchalonis, J. J. (1984). Summation: immunobiological significance of invertebrate lectins. *Progress in Clinical Biological Research* 154, 177-191.

Vasta, G. R., Ahmed, H., Fink, N. E., Elola, M. T., Marsh, A. G., Snowden, A., Odom, E. W. (1994). Animal lectins as self/non-self recognition molecules: biochemical and genetic approaches to understanding their roles and evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 712, 55-73.

Vasta, G. R., Ahmed, H., W Odom, E. (2004). Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 14:617–630.

Walker, J. B., Keirans, J. E., Horak, L. (2000). The genus *Rhipicephalus* (*Acardi*, *Ixodidae*) *Cambridge University Press*, 643 str.

Xu, X. and Doolittle, R. F. (1990). Presence of a vertebrate fibrinogen-like sequence in an echinoderm. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87, 2097-2101.

9. Příloha

Příloha 1

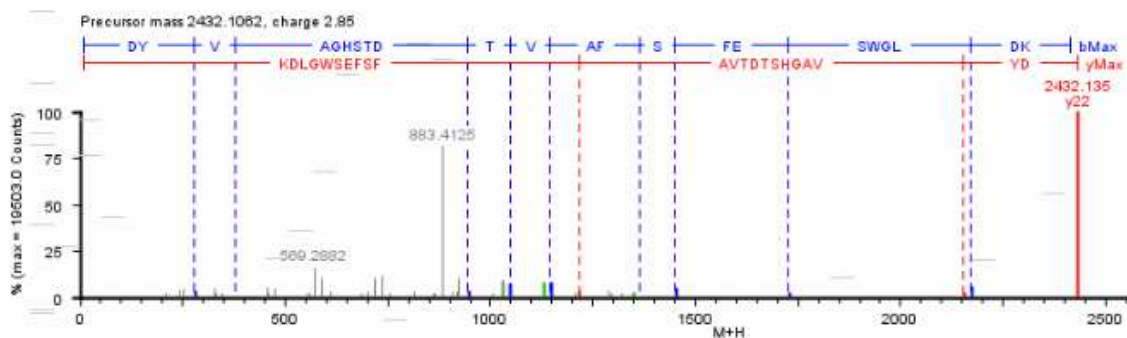
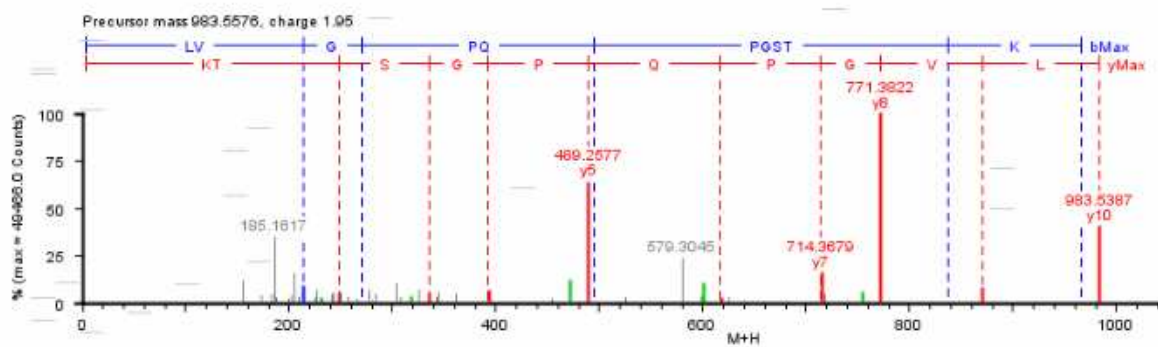
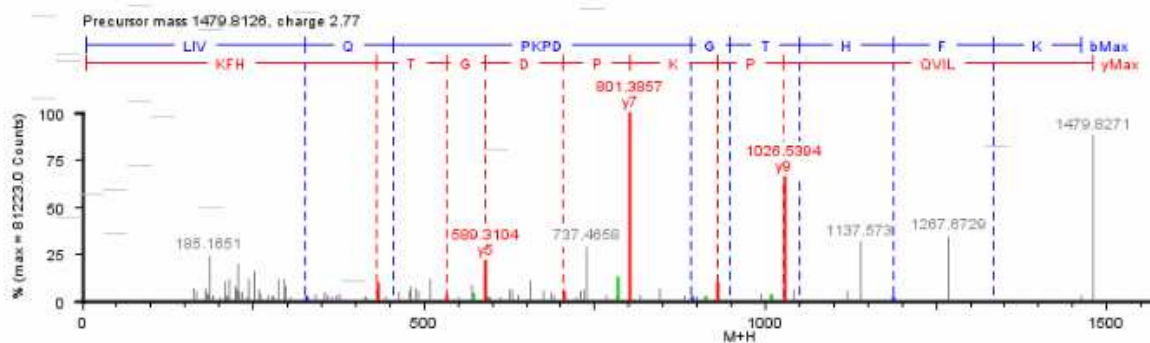
Aminokyselinová sekvence hemelipoglykoproteinu u *Dermacentor variabilis*. Podtrženy jsou fragmenty identické v MS spektrech u vzorku číslo 1 (tabulka 1; kapitola 5.7 Hmotnostní spektrometrie). Červeně jsou zobrazena pravděpodobně O-glykosylovaná místa tohoto proteinu u *R. appendiculatus*.

>gi|89954505|gb|ABD83654.1| hemelipoglycoprotein precursor [Dermacentor variabilis]

MRVLWLSLLVAAASGFEVVGKEYVYKYKGTLHVANPEQPLQASGIAFRTKLIVQ
PKPDGTHFKIVNFEADSFNSEQIDVAHHEFNAYAANPNAAGDLEHPFAGKFDEG
KLEEFSIGKNEQLWVRNLKKGVLSLFDLVKGRHEHHDDKGYHVKEDGLH
GPCDTLYIVHEEEHDYIEVTKVKNLDKCDHEHYSFYGHQKEYQCVKCEALATY
PHTATSEVYYELKGTAQH YVIGHAWGESAQLFKPHGEGKQFHVLLNRTLDLEE
EHDAATDTTLVEAGEKEHSLAQEFPEHELENPEELKRPNRLVTHFGLLPNKE
NFVEGLKKL AHIEYGDEDIKEIDNKESGSLFLMLFHNFLTFSYDDINDVYQNH
VLTAPEDIKDSLRHVFLDLLAAAGLNPHV TYGLNLIKHNELSVDDADRFYNKL
HLNLKEVSPALLREIADSCKSDAVKSHREIWTSCKLAASAIAGGKGCKYAHDT
HEEDKGTCSPEIVSHFFNYSVTPKDVEHEPEYESTVFIRSAGNLGTHKALHYLER
FIYPKWHANEHKRMAALWALKQAAKHPELARSIALPVFHNTSEPEVRIAAL
LVVVVTNPDLYVLRHIGLEVLS DPSDQVVAFVISAFRALANSKYPCHEIAQHL
RYVLP LWETNPRFRKPIDRASSHLLISSGYNP KYDYGGTLVEMIKSHDSYLPR
NLYIHMKDYVAGHSTDTVAFSFESWGLDKVFNRLVGPQPGSTKNLWNFMG
RRRFRDASAKERKEIEDALHIHDREYDPVYARMSLSVFGKAVDSWDFDESILD
AIKSKDAPEKTAEKLLGKALRKKTFYLSHDMTYLNPTLGVVFFDFKQAEFIY
ANREKIDVTHGDNAEIHLDVKRHYLYESRTQOMLGFAWTFSRSSLGSGYDAR
TVISWPLDLKVTLAPLEGKLSLNRPLHLPWNAINHHPFTFNMPYDLTQDHAN
AITEITANQKPLYRQDELLEFDRRYFGDVFGVAMNVKGHLIKRGLHSGLDDEFY
HQMTLRERLYYITINPHWHPRNVKLYFEPAGDAPTKEMDIDIA YKFLEPDDER
HSHFKVHDQIGDDTEVPSTHVLNIDVNFKGDAKERKVATEFRYSFNHDLFNHK
LQFFYDRTPFRSNDQEGTKICLEASAKFPKPDWSRVKNLATFYQGKHIDANLDI
HYGSSCEGQSSISIHGQYTHTDKDEEQLVNAAAGKPITGNLRYNGLHRMALQC
NAGREHGIPFNYYCMKFLRHSSRLAKLTADVEWKNYKPLLKLLPLHTKYHAL
RPEHGGFFGIIRSHFTGENGKLHLVSQVPWWDLKDKPHTDIVITTEDGQHFKH
WNVPTFSHMLEPRAFSSLGYSNIAEYAKQYRHRHCDLQKLSLRTFDGSLVQLPE
TDCYKVVTRDCSPNKRFLVMARSTNNPSLTKALKVFIHTTKLEILPVTEDSGLIV
RVDGNKVDVVPERPYSHTDHDVELFEVRTREKWFVTSKSYGIYLTFNGLLFI
QTAPFYRGKLCGLCGDYNLDRNHELSPDGHLNSTLEFAKSYVVVSPDCHP
PTH

Příloha 2

Záznamy vybraných MS spekter identifikovaných tryptických štěpů u vzorku číslo 1 (tabulka 1; kapitola 5.7 Hmotnostní spektrometrie.)



Příloha 3

Aminokyselinová sekvence hemelipoglykoproteinu u *Dermacentor variabilis*. Podtrženy jsou fragmenty identické v MS spektrech u vzorku číslo 20 (tabulka 2; kapitola 5.7 Hmotnostní spektrometrie). Červeně jsou zobrazena pravděpodobně O-glykosylovaná místa tohoto proteinu u *R. sanguineus*.

>gi|89954505|gb|ABD83654.1| hemelipoglycoprotein precursor [Dermacentor variabilis]
MRVLWLSLLVAAASGFVEVGKEYVYKYKGTLHVANPEQPLQASGIAFR**TKLIVQ**
PKPDGTHFKIVNFEADSFNSEQIDVAHHEFNAAANPNAAGDLEHPFAGKFDEG
KLEEFSIGKNEQLWVRNL**KKGVLSLFQLDLVKGR**HEHHDDKGYHVKEDGLH
GPCDTLYIVHEEEHDYIEVTKVKNLDKCDHEHYSFYGHQKEYQCVKCEALATY
PHTATSEVYYELKGTAQHVVIGHAWGESAQLFKPHGEGKQFHVLLNRTL DLEE
EHDAATD T T L V E A G E K E H S L A Q E F P E T H E L E N P E E L K R P N R L V T H F G L L P N K E
NFVEGLK K L A H I E Y G D E D I K E I D N K E S G S L L F L M L F H N F L T F S Y D D I N D V Y Q N H
VLTAPEDIKDSL RHVFLDLLAAAGLNPHV TYGLNLIKHNELSVDDADR FYNKL
HLNL**KEVSPALLREIADSCKSDAVKSHREIWTSCKLAASA**IAGG**GKCKY**AH
DTHEEDKGTCSPEIVSHFFNYSVTP**KDVEHEPEYESTVFIRS**AGNLGTHKALHY
LERFIYPKWHANEHK**RMAALWALKOAAKH**HPELARSIALPVFHNTSEPSEVRI
AALLVVVVTPNDLYVLRHIGLEVLS D P S D Q V V A F V I S A F **RALANSKY**PCHKEIA
QHLRYVLP LWETNPRFRKPIDRASSHLLISSGYNPKYDYGGTLVEM**IKSHDSY**
LPRNLYIHMKDYVAGHSTDTVAFSFES**WGLDKV**FNRLVGPQPGST**KNLWNE**
MGRRRFRDA**S**A**KERKE**IEDALHIH**DREYDPVYARMS**LSVFGKAVDSWDFD
ESILDAIKSKDAPEKTAEKLLGKALRKKTFYLSHDMTYLNPTTELGPVFFDF**KQ**
AEFIYANREKIDVTHGDNAEIHLDVKRHYLYESRTQQMLGFAWTF SRSSLGSG
YD**ARTVISWPLDLKV**TLAPLEGKLSLNRPLHLPWNAINHHPFTFNMPYDLT
QDHANAITEITANQKPLYRQDELLEFDRRYFGDVFGVAMNVKGHLIK**RGLHSG**
LDEFYHQMTLRERLYYITINPHWHPRNVKLYFEPAGDAPTKEMDIDIA**YKFELE**
PDDERHSHFKVHDQIGDDTEVPSTHVLNIDVNFKGDAKERKVATEFRYSFNHD
LFNHKLQFFYDRTPFRSNDQEGTKICLEASAKFPKPDWSRVKNLATFYQGGKHID
ANLDIHYGSSCEGQSSISIHGQYTHTDKDEEQLVNAAGKPITGNLRYNGLHRM
ALQCNAGREHGIPFNYYCMKFLRHSSRLAKLTADVEWKNYKPLLKLLPLHTK
YHALRPEHGGFFGIIRSHFTGENGKLHLVSQVPWWDLKDKPHTDIVITTEDGQH
FKHWNVPTFSHMLEPRAFSSLGYSNIAEYA**KOYRHRHCDLOKLS**LRTFDGLSLV
QLPETDCYKV VTRDCSPNKRFLVMARSTNNPSLTKALKVFIHTT**KLEILPVTE**
SGLIVRVDGNKVDVPERPYSHTDHDVELFEVTRTKWFEVTSKSYGIYLTFN
GNLLFIQTAPFYRGKLCGLCGDYNLDRNHELSPDGHLYNSTLEFA**KSYVVPSP**
DCHPP**TH**

Příloha 4

Záznamy vybraných MS spekter identifikovaných tryptických štěpů u vzorku číslo 20 (tabulka 1; kapitola 5.7 Hmotnostní spektrometrie.)

