

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**



**Analýza glykoproteinů ze slinných žláz klíštěte
*Ixodes ricinus***

Magisterská diplomová práce

Bc. Lenka Bučinská

2010

Vedoucí práce: RNDr. Marie Vancová, Ph.D.

Diplomová práce

Bučinská L., Bc. 2010: Analýza glykoproteinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. [Analyses of glycoproteins from the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*]. MSc. Thesis, in Czech. 79 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I characterized several potential glycoproteins in salivary gland extracts from unfed and partially fed females of ticks *Ixodes ricinus* using enzyme deglycosylation and lectin labeling. Affinity-based (chromatografic) analysis was applied for isolations of glycoproteins with specificity for GNA (mannose), HPA (N-acetylgalactosamine) and MAA II (sialic acid) lectins. GNA specific 120 kDa glycoprotein was isolated from partially fed females and is modified with N-linked glycans containing α 1,3-mannose. Mass spectrometry analyses confirmed the presence carboxypeptidase M in elution fraction gain with GNA affinity chromatography. GNA specific proteins were purified from unfed female salivary gland extracts. MS analyses identified them as proteins similar to arylsulfatase B and cytoskeletal Sojo protein. Proteins (85 and 56 kDa) isolated with HPA affinity chromatography were characterized as Trappin 12, which is a host protein. MAA II lectin was used for labelling and isolation of 100 kDa protein. N-terminal sequence of the MAA II specific protein predicted similarity with a host protein, Siglec 1. Fucose in salivary gland extract was detected with the labelling of AAA, AAL, UEA I and LTL lectins. Results showed that salivary gland extracts contain α 1,2-; α 1,3- and α 1,6- N-linked fucose and O-linked fucose probably as well.

GNA specific proteins were detected in partially fed salivary glands acini type II and III using electron transmission microscopy. Fucose was detected on gut and salivary gland structures using fucose-specific lectin AAL.

Magisterská diplomová práce byla financována z grantu GAAV KJB600960906, z výzkumného záměru ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR 6007665801 a z výzkumného centra LC 06009.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30.4. 2010

.....

Bc. Lenka Bučinská

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Marii Vancové, PhD. za vedení práce, rady, čas a trpělivost, nejenom při sepisování magisterské práce. Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. a Ing. Janě Nebesářové, CSc. Děkuji za možnost vytvořit vlastní vědeckou práci a za cenné rady. Kolektivu laboratoře elektronové mikroskopie děkuji za vytvoření skvělé atmosféry pro vědeckou práci. Jmenovitě děkuji Petře Masařové a Martině Tesařové za zpříjemnění chvil při práci a Janu Langhansovi za pomoc s tiskem práce. Jánů Štěrbovi děkuji za provedení MS analýz během jeho stáže na Indiana university v Bloomingtonu (Indiana, USA) a za rady během sepisování této práce. Janu Erhartovi děkuji za spolupráci a přísun nasátých i nenasátých klíšťat.

Poděkování patří i nejmenovaným lidem, kteří se jakkoliv podíleli na této práci, třeba jen radou v pravý čas.

Rodině a přátelům děkuji za podporu psychickou i finanční.

Obsah

Obsah	v
Použité zkratky:.....	vii
1. Úvod a literární přehled.....	1
1.1 Klíště <i>Ixodes ricinus</i>	2
1.2. Sliny a slinné žlázy klíštěte	2
1.2.1 Sliny	2
1.2.2. Slinné žlázy	3
1.3. Glykosylace.....	4
1.3.1. Sacharidy běžně se vyskytující v glykoproteinech	4
1.3.2. Typy připojení glykanů k proteinu: N a O typ vazby.....	5
1.3.3. Glykosylace u bezobratlých	7
1.3.4. Glykosylace u klíšťat.....	8
1.4.Strategie pro zkoumání glykosylovaných proteinů.....	9
1.4.1. Elektroforetické rozdělení proteinů.....	9
1.4.2. Hmotnostní spektrometrie (MS).....	10
1.4.3. Enzymatická deglykosylace	12
1.4.4. Použití lektinů	12
2. Cíle práce.....	17
3. Materiál a metody.....	18
3.1. Sběr klíšťat	18
3.2. Získávání slinných žláz (SŽ) a slin klíštěte.....	18
3.4. Příprava extraktu SŽ a určení koncentrace proteinů	19
3.5. Afinitní chromatografie.....	19
3.6. Odstranění albuminu ze vzorků.....	20
3.7. Koncentrace a odsolení proteinů	20
3.8. Enzymatická deglykosylace proteinů.....	21
3.9. Elektroforetická analýza proteinů pomocí SDS-PAGE	23
3.10. Přenesení proteinů na membránu v elektrickém poli "Western blot"	23
3.11. Barvení a afinitní/imunitní značení přenesených proteinů lektiny/protilátkami a inhibice značení pomocí sacharidů.....	23
3.12. Hmotnostní spektrometrie	25
3.13. Příprava SŽ a střev pro imunoznačení	26
3.14. Krájení bločků pro imunofluorescenční mikroskopii a TEM	26
3.15. Afinitní značení řezů SŽ a střev lektiny pro fluorescenční mikroskopii.....	27
3.16. Afinitní značení řezů SŽ a střev lektiny pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM).....	28
4. Výsledky.....	30
4.1. Přítomnost manózy v SŽ částečně nasáté samice klíštěte.....	30
4.2. Přítomnost manózy ve SŽ nenasáté samice klíštěte.....	35
4.3. Přítomnost N-acetyl-D-galaktosaminu/ D-Galaktózy ve SŽ klíštěte.....	37
4.4. Přítomnost fukózy ve SŽ částečně nasátých samic klíštěte	39
4.5. Přítomnost kyseliny sialové v SŽ klíštěte	43
5. Diskuze.....	46
5.1. Manosylované glykoproteiny	46
5.2. Glykoproteiny modifikované N-acetyl-D-galaktosaminem /D-galaktózou.....	48
5.3. Fukosylované glykoproteiny	50
5.4. Přítomnost kyseliny sialové	51
6. Závěr.....	54

7. Literatura	56
---------------------	----

Použité zkratky:

SŽ	Slinné žlázy	UV	ultrafialové záření
SŽE	Extrakt ze SŽ	TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
Arg	Arginin		
Asn	Asparagin		
Hyp	Hydroxyprolin		
Ser	Serin		
Thr	Threonin		
Hyl	Hydroxylysin		
Tyr	Tyrosine		
Trp	Tryptofan		
Cys	Cystein		
Man	Manóza		
Glc	Glukóza		
GlcNAc	N-acetylglukosamin		
Gal	Galaktóza		
GalNAc	N-acetylgalaktosamin		
Rha	Rhamnóza		
Ara	Arabinóza		
Xyl	Xylóza		
Fuc	Fukóza		
Neu5Ac	kyselina neuraminová (sialová)		
MAA II	<i>Maackia amurensis</i> lektin II		
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> lektin		
UEA	<i>Ulex europaeus</i> I lektin		
HPA	<i>Helix pomatia</i> lektin		
LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i> lektin		
AAA	<i>Anguilla anguilla</i> lektin		
AAL	<i>Auleria aurantia</i> lektin		
SNA	<i>Glycine max</i> (Soybean) lektin		
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> lektin		

1. Úvod a literární přehled

Klíšťata jsou ektoparazité sající krev na různých obratlovcích včetně člověka. V Evropě se běžně vyskytuje klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které je hlavním přenašečem závažných onemocnění. Příkladem jsou klíšťová encefalitida a lymská borelióza (Nuttall 1999). Tato onemocnění mají velký medicínský i veterinární dopad, proto je studium vztahů klíšťat, jejich patogenů a hostitelů - obratlovců, savců a člověka důležité. Farmakologicky aktivní látky obsažené ve slinách a slinné žlázy jsou významné, protože usnadňují sání klíštěte a zprostředkovávají přenos patogenů z klíštěte do hostitele.

Glykoproteiny se účastní důležitých procesů, například komunikace a rozpoznávání mezi buňkami a to jak u obratlovců, tak i bezobratlých. Přesto širší znalosti o glykoproteinech hmyzu nebo rostlin chybí. Informace o glykanech a glykoproteinech klíšťat jsou téměř nulové. Jejich výzkum může přispět k pochopení celé řady procesů, například přenos a uchycení patogenů ve slinných žlázách.

V naší laboratoři byla zkoumána přítomnost glykosylovaných proteinů ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* pomocí afinitní vazby s lektiny. Na řezech SŽ byly detekovány sacharidy (D-galaktóza, N-acetylagalaktosamin, N-acetylglukosamin a D-manóza) a v malých množstvích byla přítomna také kyselina sialová (Vancová a kol. 2006). Dalším studiem v oblasti glykoproteinů klíšťat bych chtěla přispět k všeobecnému poznání glykobiologie u klíšťat a napomoci pochopení vzájemných vztahů mezi hostitelem/vektorem/patogenem.

1.1 Klíště *Ixodes ricinus*

Klíšťata (*Ixodidae*) spolu s klíšťáky (*Argasidae*) patří do řádu roztoči (*Acari*). Tyto dvě skupiny se navzájem odlišují vzhledem, životním cyklem i prostředím, ve kterém žijí. Klíšťata rodu *Ixodes* jsou obligátní krev sající parazité obratlovců s tříhostitelským cyklem, který zahrnuje drobné savce, ptáky, vysokou zvěř, dobytek a náhodně i člověka. Každé ze tří stádií (larva, nymfa i dospělec) sají na hostiteli krev. Po dokončení sání opouští hostitele a přeměňují se do dalšího vývojového stádia. Dospělá samice klíštěte saje krev hostitele a získanou energii vkládá do produkce velkého množství vajíček, která naklade v podrostu vegetace.

Všechna stádia klíšťat můžeme nacházet v podrostu a v trávě v lesích a na okrajích luk s vhodnou vlhkostí a teplotou. Jejich hojnost závisí na počtu dostupných hostitelů potřebných k dokončení jejich cyklu. Klíšťata se vyskytují celoročně, ale kvůli vhodným podmínkám, je člověk nejčastěji zaznamenává především na jaře a na podzim. Klíšťata vylézají na stébla trav a čekají na potenciálního hostitele, na kterého se přichytí. Na hostiteli vyhledávají vhodné místo k sání, kde proříznou pokožku hostitele chelicery. Po vsunutí hypostomu a chelicer do rány se pomocí zpětných háčků hypostomu a vylučovaného cementu upevní v ráně. Takto přichyceni pokračují v sání krve a produkci slin několik dní v závislosti na stádiu vývoje (Balashov 1967).

Klíšťata rodu *I. ricinus* jsou rozšířena po celé Evropě, dříve s výjimkou vysokých hor a severněji položených států. Oteplování podnebí způsobuje, že se klíšťata a s nimi spojované onemocnění (lymská borelióza či klíšťová encefalitida) vyskytují stále dál na severu, na skandinávském poloostrově (Gray a kol. 2009). Podobný trend byl pozorován i na našem území, kde se klíšťata šíří do vyšších nadmořských výšek hor (Daniel a kol. 2004).

1.2. Sliny a slinné žlázy klíštěte

1.2.1 Sliny

Klíště při sání vylučuje do rány sliny obsahující velké množství farmakologicky aktivních látek. Tyto látky přispívají k úspěšnému sání na hostiteli bez jeho vědomí (Binnington a Kemp 1980, Steen a kol. 2006), různými způsoby ovlivňují srážení krve (apyrázy, zvýšení fibrinolýzy, prostacykliny a přímé inhibitory trombinu, zabránění aktivace a shlukování krevních destiček), vyvolávají roztahování cév (Ribeiro a kol. 1985, 1988, Hovius a kol. 2008) a mírní bolest a otok (štěpením bradykininu pomocí kinináz; Regoli a Barabe 1980). Zánětu a aktivaci imunitního systému se klíště brání produkcí celé řady biologicky

aktivních látek (Valenzuela 2002). Jedním způsobem je blokování komplementu hostitele zabráněním aktivace jednotlivých složek komplementu (Ribeiro a kol. 1985, 2003). Dalším způsobem boje proti aktivaci imunitního systému hostitele je inhibice proliferace buněk imunitního systému (Hannier a kol. 2004, Anguita a kol. 2002).

Sliny obsahují cement, kterým se klíště upevňuje v ráně, ale také látky, které působí cytotoxicky na hostitele (Binington a Kemp 1980).

Řada látek ze slin může sloužit k terapeutickým účelům a některé jejich složky se zkoumají pro možnost využití ve vakcínách (Hovius a kol. 2008).

1.2.2. Slinné žlázy

Slinné žlázy (SŽ) jsou pro klíště životně důležité. Kromě již zmíněného vylučování slin slouží SŽ jako osmoregulační orgán a dále pomáhají klíštěti přečkat dlouhé období mezi periodami sání na hostiteli (Bowman a Sauer 2004).

SŽ se nacházejí v přední části těla klíštěte a zasahují přibližně do 1/3 až poloviny těla. SŽ jsou protkány četnou sítí tracheí, které k nim přivádějí kyslík (Bowman a Sauer 2004). Skládají se ze tří typů acinů, které jsou propojeny hlavním rozvětveným kanálkem. U samců se navíc objevuje ještě čtvrtý typ, pravděpodobně spojený s přenosem pohlavních buněk do samičího pohlavního otvoru (Feldman-Musham a kol. 1970). Aciny typu I jsou přes krátký acinární kanálek přímo připojeny k hlavnímu vývodu SŽ. Tento typ acinu se skládá z jedné centrální buňky, několika pyramidových buněk, stahovací buňky a peritubulárních buněk, které obklopují krátký acinární kanálek (Krolak a kol. 1982). Buňky acinů typu I nemění svoji velikost ani strukturu během sání a také počet acinů zůstává konstantní (Barker a kol. 1984). Funkcí acinů I je sekrece hyperosmotické tekutiny, která je nenasátým klíštětem využívána při hospodaření s vodou. Aciny typu II jsou složeny ze sekrečních buněk obsahujících granula (*a*, *b*, *c1-c4*), z buněk agranulárních a z buněk pomocných. Aciny typu III jsou velice podobné acinům typu II, liší se pouze nižším počtem sekrečních buněk (*d*, *e*, *f*). Buňky *f* acinu III jsou odpovědné za sekreci látek spouštějících zahušťování krve a v průběhu sání klíštěte se podílejí na přenosu nadbytečné vody a iontů zpět do hostitele. Oba typy acinů II i III značně zvětšují svou velikost během sání a jejich buňky se morfologicky mění (Bowman a Sauer 2004).

Jednotlivá stadia klíšťat během svého vývoje i sání mění složení i množství vylučovaných proteinů (McSwain a kol. 1982, Uhler a kol. 1994, Lawrie a Nuttall 2001.). Rozdíl ve složení a v množství proteinů můžeme pozorovat i mezi jednotlivými jedinci

(Sonenshine, Vol. 1. 1991). Důvodem je potřeba rozdílné sekrece proteinů během sání, zpracování potravy a v boji proti imunitě atd.

Sliny a SŽ jsou významné pro přenos patogenů (Ribeiro a kol. 1995, Wikel 1999, Ribeiro a Francischetti 2003; Steen a kol. 2006). Piroplasmy (*Babesia*, *Theileria*) bývají lokalizovány zejména s *e* buňkami acinů typu III (Bowman a Sauer 2004). Spirochéty z komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. jsou ve spojení s aciny typu II a III (Dunham-Ems a kol. 2009). Bylo potvrzeno, že se borélie váží pomocí vnějších povrchových proteinů (Osp C) na receptory, které jsou přítomné na povrchu buněk klíštěte (Pal a kol. 2004).

1.3. Glykosylace

Připojení jednoduchých monosacharidů nebo delších oligosacharidových řetězců k proteinům, tzv. glykosylace je nejčastější, ale také nejkomplikovanější forma post-translační úpravy proteinů (Spiro 2002, Geyer a Geyer 2006). Udává se, že více než 50% všech proteinů u eukaryot je glykosylováno (Apweiler 1999). Rozlišujeme 5 způsobů vazebního připojení sacharidů k aminokyselinám proteinů (Spiro 2002).

Sacharidy vázané v glykoproteinech a v glykolipidech membrán patří mezi hlavní složky vnějších povrchů savčích buněk (Roseman 2001). Glykany, oligosacharidy glykoproteinů, hrají důležitou roli ve velkém počtu biologických procesů (intra- i extrabuněčná signalizace, embryonální vývoj, oplodnění, imunitní obrana, zánět, připojení a komunikace buněk, infekce viry, bakteriemi a parazity) a ovlivňují vlastnosti a funkční aktivity proteinů (stabilita proteinů, konformace; Varki 1993, Dwek 1996, Endo 1999).

V různých fázích vývoje a diferenciaci buněk se oligosacharidy, které se vyskytují na povrchu buněk, mění. Změny v typu glykosidové vazby sacharidů na povrchu buněk jsou spojeny také s různými patologickými projevy včetně rakovinných změn (Dwek 1996). Vlastnosti a role stejných glykanových struktur se mohou měnit v závislosti na umístění v různých tkáních jednoho organismu, ale také v jedné tkáni různých organismů.

1.3.1. Sacharidy běžně se vyskytující v glykoproteinech

Termín glykan se obecně používá pro označení různých forem mono-, oligo- nebo polysacharidů volných nebo vázaných k další molekule (protein, lipid). Monosacharid je sacharid, který již nemůže být hydrolyzován do jednodušší formy. Oligosacharidy jsou lineární či větvené řetězce monosacharidů spojených navzájem glykosidovou vazbou.

Glykosidová vazba připojuje jeden monosacharid ke zbytku druhého monosacharidu přes hydroxylovou skupinu. Podle způsobu připojení rozlišujeme α - a β - vazbu.

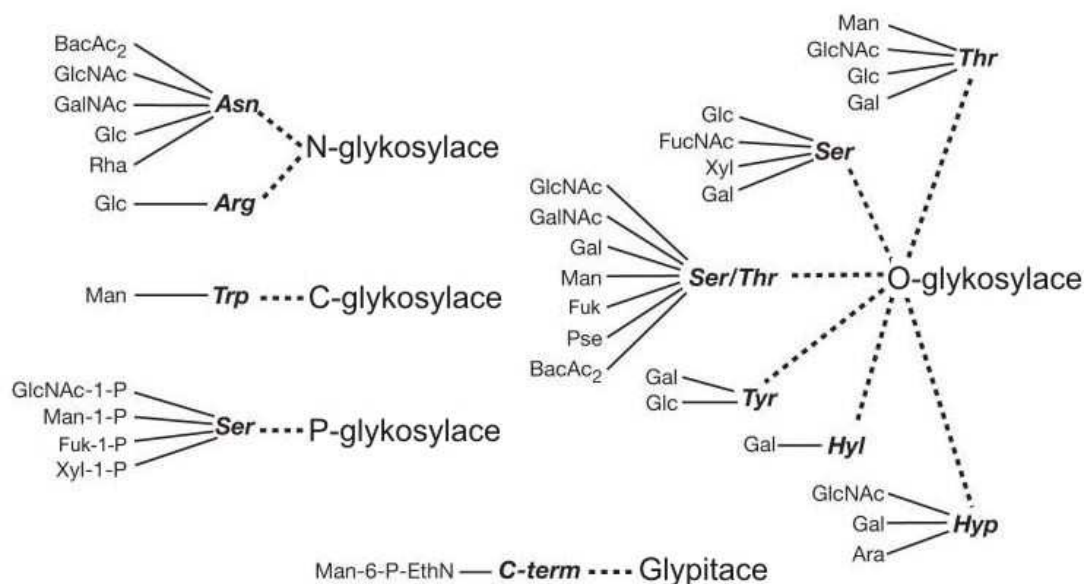
V přírodě se vyskytuje několik stovek různých monosacharidů, ale pouze malé množství (tab. 1.) se běžně uplatňuje v glykanech živočichů. U nižších živočichů, bakterií a rostlin se nalézají ještě další druhy sacharidů. U rostlin jsou rozšířené sacharidy arabinóza, apióza a galakturonová kyselina.

Tab. 1. Seznam sacharidů běžně se vyskytujících u živočichů. Upraveno podle Varki a Sharon (2009).

Pentózy	5-ti uhlíkaté neutrální sacharidy	D-xylóza (Xyl)
Hexózy	6-ti uhlíkaté neutrální sacharidy	D-glukóza (Glc), D-galaktóza (Gal), D-manóza (Man)
N-acetylhexosaminy	Hexózy s aminoskupinou na 2. pozici, N-acetylované	N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc)
Deoxyhexózy	Hexózy s hydroxylovou skupinou na 6. pozici	L-fukóza (Fuc)
Uronové kyseliny	Hexózy s negativně nabitou karboxylovou skupinou na 6. pozici	D-glukuronová kyselina (Glc), L-iduronová kyselina (IdoA)
Sialové kyseliny (Sia)	Skupina 9-ti uhlíkatých sacharidových kyselin	Nejčastější N-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac)

1.3.2. Typy připojení glykanů k proteinu: N- a O- glykosidový typ vazby

Glykoproteiny jsou proteiny nesoucí jeden nebo více glykanů kovalentně vázaných k uhlíkaté kostře proteinu nejčastěji přes N- nebo O- glykosidovou vazbu. Další typy glykosidových vazeb jsou znázorněny na obr. 1. (Spiro 2002).



Obr. 1. Typy vazebných připojení glykanů k aminokyselinám proteinů, které se běžně vyskytují v přírodě. Převzato a upraveno ze Spiro 2002. (FucNAc=N-acetylfukosamin; Pse=pseudaminic acid; BacAc₂= „bacillosamine“, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-glukóza; -P=fosforylace

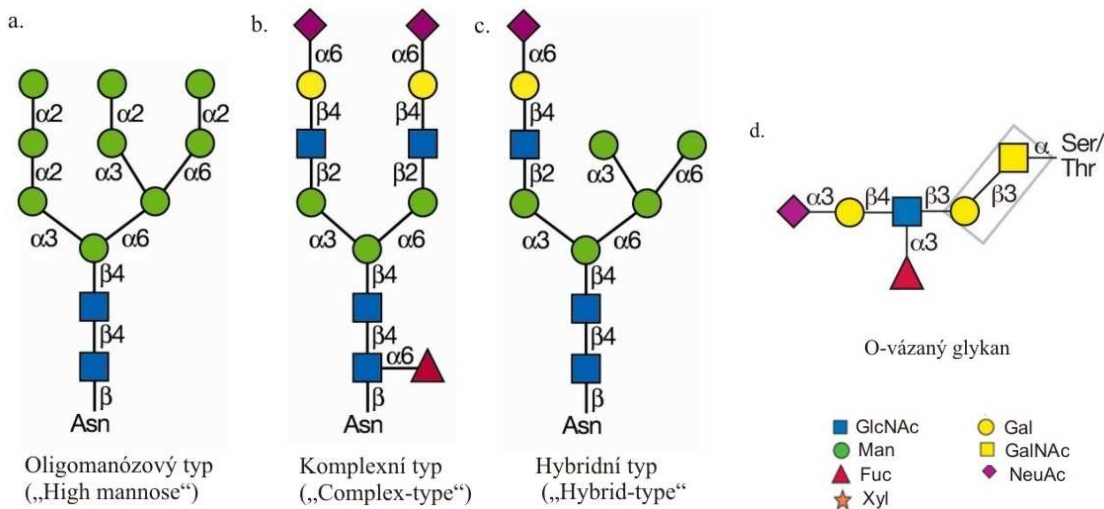
N-glykosylace jsou nejčastější a nejvíce konzervovanou skupinou připojení glykanů k proteinům u eukaryot. Dochází k ní v endoplazmatickém retikulu (ER) a v Golgiho aparátě (GA), pomocí glykosylačních enzymů, které využívají glykany syntetizované v buňce nebo získané s potravou. Glykany jsou připojeny N-glykosidovou vazbou k amidové skupině asparaginu v konzervativní peptidové sekvenci Asn-X-Ser/Thr (kde X je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu) většinou přes β-GlcNAc (Spiro 1973, 2002, Montreuil 1980). N-glykany sdílejí obvyklé pentasacharidové jádro (P-jádro) tvořené Manα1,6Manα1,3Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1 (Lis a Sharon 1993). N-glykany dělíme do tří hlavních skupin. Oligomanózový („High mannose“) typ glykanů obsahuje velké množství Man, které se vážou na P-jádro (obr. 2.a). Komplexní typ („Complex-type“) glykanů se vyznačuje rozdílným počtem sacharidů (GlcNAc, Gal, Fuc, Neu5Ac a někdy také zbytky GalNAc), které jsou vázány v anténách připojených k P-jádro (obr. 2.b). Posledním typem N-glykanů je hybridní typ („Hybrid-type“), který kombinuje struktury obou předchozích typů (obr. 2.c).

U savců je se obvykle nachází Fuc α1,6- vázaná na P-jádro. Přítomnost α1,3- vazby je na povrchu rakovinných buněk a je pro savce alergenní.

O-vázané glykany (obr. 2.d) jsou širokou a různorodou skupinou modifikací proteinů. O-vázané glykany se připojují k aminokyselině obsahující hydroxylovou skupinu: Ser, Thr, Tyr, Hyp. Nejběžnější vazba O-glykanů u savců je připojena přes α-GalNAc k Ser/Thr (tzv.

mucinový typ). Tento typ vazby glykanů se nejčastěji vyskytuje u mucinů, ale také u celé řady jiných glykoproteinů (fetuin, lidské gonadotropiny, glykoforíny a chladové glykoproteiny; Spiro 1973). Beta anomer O-vazby se vyskytuje pouze u archeobakterií (Schäffer a kol. 1999). Dalšími typy O-glykosylací jsou glykosylace, kde se glykan váže přes jiné sacharidy než GalNAc k Ser nebo Thr. Druhou rozšířenou skupinou O-glykosylací je proteoglykanový typ (O-xylace; Buskas a kol. 2006), u kterého jsou připojované sacharidy, proteoglykany (heparansulfát, chondroitinsulfát), vázané přes β -xylózu k aminokyselinám Ser nebo Thr. O-manosylace je připojení glykanu přes manózu k AK proteinu (Endo 2004). O-GlcNAc glykosylace připojuje glykan přes GlcNAc, který je vázaný na Ser/Thr bez připojení dalších sacharidů (Guinez a kol. 2005). Nově bylo objevené připojení k AK proteinu přes fukózu tzv. O-fukosylace (Ma a kol. 2006).

Obr. 2. N- a O- vázané glykany savců, bezobratlých a rostlin.



1.3.3. Glykosylace u bezobratlých

Většina post-translačních procesů známých u savců se také vyskytuje u bezobratlých, přestože se detaily mechanismů glykosylace mezi rostlinami, bezobratlými i savci liší (Altmann 1999, Wilson 2003). Příkladem je β -N-acetylglukosamináza, která u hmyzu štěpí pouze terminálně vázané β 1,2GlcNAc od α 1,3Man vázané v P-jádru (Watanabe 2002), ale u savců hydrolyzuje všechny typy vazeb β -GlcNAc v degradujících glykoproteinech (Conzelmann 1987).

V modelových organismech *Arabinopsis*, *Lymnaea*, *Arion* a *Drosophila* bylo v cDNA nalezeno množství genů, kódujících glykosyltransferázy, které hrají roli při syntéze N-glykanů v Golgiho aparátě. Příkladem jsou GlcNAc transferázy I a II (Parker 1991,

Gutternigg 2004, Mulder a kol. 1995), α 1,3-fukosyltransferázy, glukosyltransferázy (Parker 1991) a α -manosidázy (Parker 1991, Altmann a kol. 2001).

Nezodpovězenou otázkou v problematice glykosylací u bezobratlých zůstává, zda tyto organismy dokáží své glykoproteiny modifikovat kyselinou sialovou. U savčích buněk je kyselina sialová terminálně vázaná v glykanech na povrchu buněk a hraje důležitou roli ve fyziologických i patologických procesech (Varki a Varki 2007). U hmyzu byla nedávno prokázána aktivita sialyltransferázy u mouchy *Drosophila* pomocí metod RT-PCR a hybridizací *in situ* (Koles a kol. 2004, 2007). Dokázaná byla také přítomnost terminálně vázané α 2,6Neu5Ac v glykoproteinech motýlí linie hmyzích buněk (Watanabe 2002) a u larev mouchy *Drosophila* byla nalezena α 2,8- vázaná Neu5Ac (Roth a kol. 1992). U mouchy *Drosophila* byl nalezen gen pro Neu5Ac fosfátovou syntetázu, což je důkazem pro schopnost hmyzu syntetizovat vlastní Neu5Ac (Kim a kol. 2002).

Savčí N-vázané glykoproteiny jsou většinou komplexního typu. K P-jádru jsou připojeny rozvětvené antény obsahují GlcNAc, Gal, NeuAc a Fuc. Většina hmyzích glykoproteinů obsahuje oligomanóзовý typ N-glykosylace (März a kol. 1995). Komplexní typ N-glykanů hmyzu se vyskytuje méně často a obvykle se skládá pouze z běžného P-jádra s α 1,6- nebo také α 1,3- vázanou Fuk. Tento typ oligosacharidu bývá označován jako tzv. paucimanosidický typ a vyskytuje se také u rostlin (Kubelka a kol. 1994, Altmann a kol. 1999).

1.3.4. Glykosylace u klíšťat

O glykosylaci klíšťat je známo poměrně málo informací, můžeme pouze předpokládat podobnost s hmyzími systémy. Glykosylované proteiny klíšťat byly zkoumány pomocí afinitního značení lektiny a enzymatickou deglykosylací. Bylo detekováno několik glykoproteinů obsahující N- a O- vázané glykany v SŽ klíštěte *I. dammini* (Wheeler a kol. 1991) a v homogenátu SŽ, nymf a larev klíštěte *I. ricinus* (Uhlíř a kol. 1994). Byly popsány glykosylované proteiny ve SŽ z nenasátých a částečně nasátých samic klíšťat *I. ricinus* pomocí afinitního značení lektiny, pozorované pomocí fluorescenční mikroskopie a transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Byla lokalizována místa specifické glykosylace v granulích buněk acinů SŽ obsahující sacharidy Gal, GalNAc, GlcNAc, Man a pravděpodobně i NeuAc (Vancová a kol. 2006). Manóza byla pomocí nepřímé fluorescence detekována také na povrchu acinu SŽ u klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Kamwendo a kol. 1993) a u *I. ricinus* (Vancová a kol. 2006).

Přímým zkoumáním aminokyselinových sekvencí přístupných v cDNA knihovnách klíšťat (Ribeiro a kol. 2006, Francischetti a kol. 2008) bylo zjištěno, že mnoho farmakologicky důležitých proteinů z klíšťat *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Boophilus microplus*, *Ornithodoros moubata* a *Haemaphysalis longicornis* obsahuje potencionální glykosylační místa (PMG). Jsou to například protein Isac a Irac (Ribeiro a kol. 2006, Valenzuela a kol. 2000), protein Ixolaris (Francischetti a kol. 2002), a imunosupresivní protein ze slin a SŽ klíštěte *Dermacentor andersoni* (Bergman a kol. 2000).

PGM lektinu Dorin M z hemolymfy klíštěte *Ornithodoros moubata*, který je známý svou afinitou k kyselině sialové, byla potvrzena pomocí kapalinové chromatografie a tandemové MS analýzy. Dorin M je modifikován oligomanózovým typem glykanů, které obsahovaly až 9 navázaných manóz, a glykanu s vázanými 4-5 manózami. P-jádro bylo modifikované fukózou (Man a kol. 2008). Další glykosylované proteiny byly potvrzeny kombinací metod lektinové afinitní chromatografie a sekvenační analýzy a byly izolovány dva glykoproteiny z homogenátu larev klíštěte *Boophilus annulatus* (El Hakim a kol. 2007). Jejich struktura není známá.

1.4.Strategie pro zkoumání glykosylovaných proteinů

Glykoproteiny můžeme studovat pomocí nepřímých a přímých metod a jejich kombinací. Mezi nepřímé metody zařazujeme průkaz glykoproteinů na základě afinitního značení lektiny nebo proteiny vázající glykany (Siglec). Pomocí těchto proteinů můžeme glykany lokalizovat (fluorescenční mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie), charakterizovat (Western blot) a izolovat (afinitní chromatografie). Mezi přímé metody studia zařazujeme průkaz glykoproteinů a glykanů pomocí hmotnostní spektrometrie, například metodou peptidového mapování. Kombinací přímých a nepřímých metod je zkoumání připojení/vazby glykanu ke zbytku proteinu enzymatickou deglykosylací, při které se výsledky deglykosylační reakce vyhodnocují afinitním značením nebo metodami MS.

1.4.1. Elektroforetické rozdělení proteinů

Jednoduchá charakterizace a izolace proteinů může být provedena pomocí elektroforetického rozdělení proteinů z homogenátu tkáně. Používanými technikami jsou jednorozměrová elektroforéza v akrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecyl sulfátu (SDS-PAGE; Laemmli 1970) a dvourozměrná elektroforéza (2D elektroforéza; Görg 1988).

SDS-PAGE elektroforéza je často používanou separační technikou. Všechny zkoumané proteiny jsou v elektrickém poli rozdělovány pouze na základě své molekulové velikosti (Laemmli 1970). Nevýhodou SDS-PAGE je, že v jednom proteinovém proužku může být víc různých proteinů stejné velikosti (Liebler 2002).

2D elektroforéza se stala užitečným nástrojem v proteomice při elektroforetickém rozdělení různorodých směsí proteinů. Proteiny se nejprve rozdělují podle svého izoelektrického bodu tzv. izoelektrickou fokusací (Righetti a Gelfi 1983, Towbin a kol. 1979) a poté jsou rozděleny na základě své molekulové velikosti. Po obarvení gelu jsou proteiny znázorněny jako body ve dvou rozměrech. Nevýhody této metody jsou těžká reprodukovatelnost výsledků. Nelze ji použít pro všechny proteiny a je nutné používat vyšších koncentrací proteinů v rozdělovaných směsích.

1.4.2. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která převádí molekuly na nabitě částice, které dále dělí na základě poměru hmotnosti a náboje a zaznamenává relativní intenzity jednotlivých iontů.

Abychom získali použitelná data pro úspěšné vyhledávání a porovnávání s reálnými hodnotami v databázích, musíme splnit několik předpokladů. Používaný přístroj musí být schopný zachycovat data a kvantifikovat peptidy v minimálních množstvích (nano- a pikomoly). Musí rozlišovat ionty velmi podobných velikostí a nábojů, běžně používané přístroje dosahují rozlišení mezi ionty alespoň na 1 Da (= hmotnost 1 atomu vodíku). Přístroj musí měřit přesnou hmotnost, to znamená, že změřené hodnoty pro daný peptidový iont nebo fragment iontů musí být co nejblíže k reálným hodnotám (Liebler 2002).

V proteomice a glykoproteomice se používají přístroje využívající dva základní typy ionizačních zdrojů (MALDI a ESI) a dva základní typy hmotnostních analyzátorů (quadrupole a ToF) a to v různých vzájemných kombinacích.

Zdroje MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) využívají pro ionizaci různé matrice, které pohlcují energii dodanou laserem a přenášejí ji na analyzovanou molekulu, čímž ji ionizují. Zdroje ESI (electrospray ionization) využívají nabitých tenkých

kapilár, z kterých je do vakua rozprašován roztok analyzované molekuly, vznikající kapénky jsou odpařovány a molekula se nabije. Oba přístupy mají své výhody. Zdroje ESI lze přímo napojit na různé separační techniky (HPLC, CE), což umožňuje analyzovat i komplexní směsi. Naproti tomu MALDI vytváří jen jednomocné ionty, čímž se výrazně zjednodušuje získané spektrum a tedy i vyhodnocování výsledků. Oba fungují na zcela jiném principu, ale informace z nich se navzájem doplňují (Liebler 2002).

Analyzátor quadrupole zajišťuje, že k detektoru proletí jen ionty o určitém poměru hmotnosti na náboj (m/z). Druhý analyzátor ToF (Time-of-Flight) je založen na rozdílné rychlosti molekul v elektrickém poli. Větší molekuly jsou pomalejší než menší, ale současně nabitější molekuly se v elektrickém poli pohybují rychleji než molekuly s menším nábojem. ToF analyzátory umožňují analýzu ve větším rozsahu molekulových hmotností (přesněji většího rozsahu hodnot m/z) a analyzují všechny ionty v přístroji, zatímco quadrupole umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti (Loo 2000).

Nejvýhodnější je používat kombinované analyzátory tandemové MS (MS/MS), které umožňují vícenásobnou fragmentaci vzorku. Pomocí podobných přístrojů lze nejdříve zjistit m/z hodnotu jednotlivých iontů ve vzorku a pak je dále fragmentovat a zjistit tak jejich přesnější složení. Nevýhodou podobného přístupu je potřeba většího množství vzorku.

MS analýza je jednoduchá a uživatelsky nenáročná. Zároveň je kompatibilní s vyhledávacími databázemi a patří nyní mezi nejpoužívanější metody v proteomice. MS techniky mají také své nedostatky. Výsledek analýz je vysoce závislý na kvalitě vzorku a kontaminace v neštěpeném vzorku jako jsou soli, kovy, nebo organické sloučeniny, mohou inhibovat peptidickou ionizaci (shrnutí v Liebler 2002).

Pro zkoumání glykoproteinů se před použitím některé z MS technik (PMF, MS/MS) glykoproteiny permetylují. Permetylace poskytuje nejenom informace o struktuře, ale také zvyšuje citlivost při analýze (Liu a kol. 2006).

Studujeme-li proteiny a chceme-li získat aminokyselinovou sekvenci proteinu, můžeme dané proteiny podrobit tzv. Edmanově degradační reakci nebo vzorky analyzovat metodou peptidového mapování (Peptide Mass Fingerprint, PMF). Při Edmanově degradaci dochází k postupnému oddělování jednotlivých aminokyselin z N-konce peptidu a k jejich následné identifikaci (Edman 1949). Metoda je časově náročná, vyžaduje zkušenosti a kvalitní vzorky. U N-konce peptidů je někdy nemožné pokračovat ve čtení sekvence kvůli některým přítomným modifikacím. Edmanova degradace je označována jako nepřímé sekvenování a poskytuje nám soubor dat, které použijeme k sestavení sekvence. Metoda PMF využívá data zjištěná MALDI-TOF MS a porovnává sekvence štěpených fragmentů peptidů se sekvencemi

proteinů v databázích, na které jsou simulovány vlivy enzymatického štěpení. Proteiny se tedy identifikují na základě porovnání sekvence peptidů ze sekvencemi v databázích. Při porovnání se vyhodnocují i kvalita spektra zkoumaných proteinů a skóre sekvencí.

1.4.3. Enzymatická deglykosylace

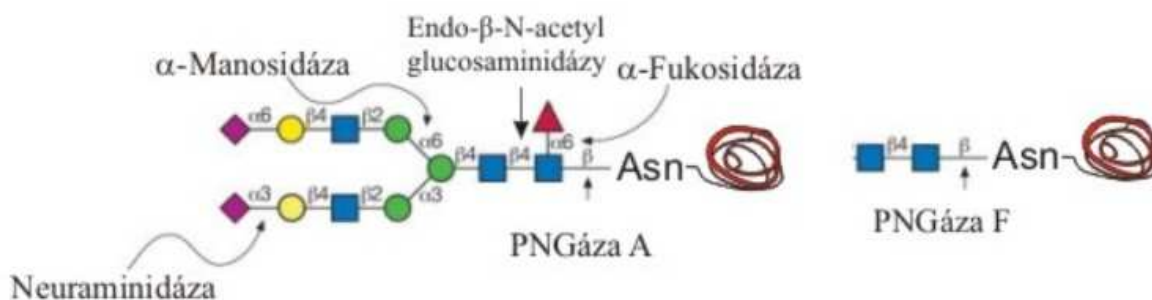
K identifikaci typu vazby glykanů v glykoproteinech a k jejich uvolnění z vazby se používají specifické enzymy (obr.3.). Deglykosylované glykoproteiny i uvolněné glykany mohou být zkoumány a identifikovány dalšími metodami zkoumání (např. MS).

Enzym PNGáza F štěpí vazbu mezi Asn a vnitřním GlcNAc P-jádra glykanů oligomanóзовého, hybridního a komplexního typu. Tento enzym neštěpí tuto vazbu v případě glykanů, které mají k GlcNAc P-jádra vázanou α 1,3-fukózu (Tretter a kol. 1991). Enzym PNGáza A je schopný štěpit vazbu mezi GlcNAc a Asn N-glykanu i v případě vazby fukózy k GlcNAc. (Altmann a kol. 1995).

Enzym Endo- β -N-acetylglucosaminidáza štěpí glykosidovou vazbu mezi dvěma GlcNAc P-jádra N-vázaných glykanů. GlcNAc zbytek zůstává připojen k Asn proteinu. Rozlišujeme různé typy enzymů endo- β -N-acetylglucosaminidázy. Typ H a F1 štěpí oligomanóзовé typy a většinu hybridních typů glykanů, zatímco enzymy typu F2 a F3 štěpí pouze komplexní typy glykanů (O'Neill 1996).

K odstranění konkrétních sacharidů z oligosacharidového řetězce slouží enzymy, které cílí přesnou vazbu těchto sacharidů α 1,2-, α 1,2,3- a α 1,6-manosidáza, α 2,3- a/nebo α 2,6-neuraminidáza, galaktosidázy, atd.)

Obr. 3. Štěpení glykanů různými enzymy.



1.4.4. Použití lektinů

Lektiny jsou proteiny, které se specificky váží ke glykanům a jsou proto důležitým nástrojem pro studium glykoproteinů. Lektiny jsou definované jako sacharid-vázající proteiny neimunního původu (Goldstein a kol. 1980), které mohou mít jedno či více vazebných míst pro interakci s glykanem (Barondes 1988). Jejich typickou vlastností je také aglutinace krevních buněk a srážení (precipitace) polysacharidů a glykoproteinů (Sharon a Lis 2003).

Lektiny se specificky váží k sacharidu, který je touto vazbou nezměněn (Kocourek a Hořejší 1981), proto se používají k vazbě glykanů. Jejich afinitní vazby ke glykanům se využívá při lokalizaci glykoproteinů v homogenátu proteinů, ale i v tkáních, a k izolaci glykoproteinů ze směsi proteinů afinitní chromatografií s imobilizovanými lektiny (Geyer a Geyer 2006).

Lektiny můžeme rozdělit na vázající monosacharidy stejně silně jako oligosacharidy a na ty, co rozpoznávají pouze oligosacharidy (Sharon a Liz 2003). Některé lektiny jsou specifické pro α - nebo β - anomer sacharidů a ten váží s větší specifitou.

Většina používaných lektinů je rostlinného původu a jen několik jich bylo izolováno z živočichů.

1.4.4.1 Rozdělení lektinů na základě jejich specifit k daným cukrům

Manózu vázající lektiny

Lektin *Galanthus nivalis* (GNA), který byl izolován z hlízy sněženky jarní *Galanthus nivalis* (Van Damme a kol. 1987) s vysokou afinitou váže oligosacharid Man α 1,3Man a neváže D-glukózou ani N-acetyl-D-manosamin (Shibuya a kol. 1988). Na rozdíl od lektinu Concanavalin A (Con A), izolovaného ze semene skočce *Canavalia ensiformis*, který váže D-manózu, D-glukózu, methyl α -D-manopyranosid, stejně jako další manosylované oligosacharidy (Goldstein 1965).

GalNAc/Gal vázající lektiny

Sacharid GalNAc je specificky rozpoznáván lektiny, které byly izolovány z bílkové žlázy hlemýžďe *Helix pomatia* (*Helix pomatia* lektin; HPA), ze sóji luštinaté *Glycine max* (*Glycine max* - Soybean lektin; SBA) a ze semen luštěniny *Dolichos biflorus* (lektin *Dolichos biflorus*; DBA). Vazabná specifita k oligosacharidům se mírně liší (Piller a kol. 1990, Lescar a kol. 2007). Lektin DBA rozlišuje pouze α -GalNAc, zatímco lektiny SBA a lektin HPA rozlišují α - i β -GalNAc. Lektin SBA váže zbytky galaktózy, ale v menší míře (Pereira a kol. 1974). HPA váže terminální i interní GalNAc zbytky (Piller a kol. 1990).

Lektin HPA je specifický ke krevní skupině A (Hammaström 1972) a váže se na povrchové glykany rakoviných buněk, například na rakovinné buňky močového měchýře, buňky sarkomu kostních dřeně (Ishiyama a Uhlenbruck 1971) a selektivně reaguje s vysoce metastázujícími buňkami rakoviny prsu a tlustého střeva (Schumacher a kol. 1997). Pomocí lektinu SBA je možno oddělit pluripotentní kmenové buňky lidské kostní dřeně, tyto vybrané buňky nevyvolávají tzv. „graft-versus-host“ onemocnění a mohou být použity pro transplantaci kostní dřeně (Reisner a kol. 1978). Lektin DBA je díky vazbě s GalNAc velmi aktivní v aglutinaci červených krvinek skupiny A. Proto se používá v rutinní hematologii k rozlišení krevních skupin (Etzler a kol. 1981).

Fukózu vázající lektiny

Lektiny specifické pro značení L-fukózy jsou následující: lektin *Auleria aurantia* (AAL), lektin *Anquilla anquilla* (AAA), lektin *Ulex europaeus* I (UEA I) a lektin *Lotus tetragonolobus* lektin (LTL). Všechny zmíněné lektiny vážou terminální fukózu spojenou vazbou $\alpha 1,2$ -, avšak liší se afinitou k jiné vazbě fukózy k zbytku oligosacharidu. Lektin AAA, izolovaný ze séra úhoře evropského (Springer a Desai 1971), váže polysacharidy obsahující deriváty fukózy (3-deoxy-L-fukóza), ale i deriváty D-galaktózy (3-O-methyl-D-galaktóza a 3-O-methyl-6-deoxy-D-galaktóza). Rozeznává také antigeny krevních skupin - H a Lewis^a (Honda 2000, Bianchet a kol. 2002). Lektin LTL, který byl purifikován ze štírovníku *Lotus tetragonolobus* (Morgan a Watkins 1953), je specifický pro terminálně vázanou $\alpha 1,3$ Fuc (Pereira a kol. 1974, Haselhorst a kol. 2001) a reaguje s Lewis^x antigeny. Lektin LTL neváže sialovaný Lewis^x antigen a ani $\alpha 1,4$ - vázanou Fuc (Yan a kol. 1997). Lektin UEA I, izolovaný ze semen hlodaše evropského (Boyd 1963, Flory 1966), váže pouze fukózu vázanou $\alpha 1,2$ - k Gal $\beta 1,4$ GlcNAc (Pereira a kol. 1978, Cummings 1994). Lektin AAL byl izolovaný z houby *Aleuria aurantia* (Kochibe a Furukawa 1982). Tento lektin váže preferenčně $\alpha 1,3$ - a $\alpha 1,6$ - vázanou fukózu (Kochibe a Furukawa 1980). Lektin AAL aglutinuje lidské erytrocyty bez ohledu na jejich ABO skupinu a přítomnost Lewis antigenu (Haselhorst a kol. 2001).

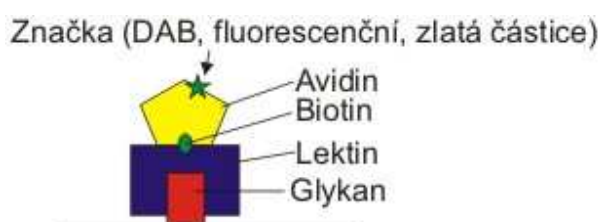
Lektiny vázající kyselinu sialovou

Přítomnost kyseliny sialové lze zkoumat použitím lektinu *Maackia amurensis* (MAA II), který by izolován ze semen luštěniny makie amurské, nebo pomocí lektinu SNA izolového z bezu černého (*Sambucus nigra*). Lektin MAA II dává přednost $\alpha 2,3$ - vázané NeuAc ke Gal/GalNAc (Yamamoto a kol. 1997), zatímco lektin SNA preferuje $\alpha 2,6$ - vázanou kyselinu sialovou.

1.4.4.2. „Western blot“

Metoda Western blot se využívá pro přenesení proteinů elektroforeticky rozdělených (SDS-PAGE, 2D elektroforéza) na nitrocelulosovou, nylonovou nebo polyvinilidendifluoridovou membránu (PVDF; Towbin a kol. 1979) a pro následnou detekci glykanů pomocí protilátek/lektinů (obr.4.). Citlivost značení se pohybuje mezi pg a ng/ml. Při této metodě se musí provádět kontroly značení, které vyloučí přítomnost nespecifických vazeb (negativní kontrola, inhibiční test).

Obr. 4. Vazba lektinů na glykany a jeden ze způsobů detekce této vazby.



1.4.4.2. Afinitní chromatografie

Afinitní lektinová chromatografie je jednoduchá metoda k izolaci glykoproteinů z izolátů. Lektin je imobilizován na nosiči a glykoproteiny procházejí s celou směsí proteinů přes kolonu. Navázané molekuly glykoproteinu jsou uvolňovány a vymyty z kolony elučními činidly (mono- a oligo- sacharidy) či změnou okolních podmínek (změny pH, intové síly roztoků; Cuatrecasas 1968, Lowe 1996).

1.4.4.3. Elektronová transmisní a nepřímá fluorescenční mikroskopie

Proteiny vázající glykany mohou být použity pro lokalizaci přímo ve studovaných tkáních. Reakci značení je možno pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu (rozlišení menší než 1 μm), v tomto případě je sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou (obr.4.). Pro detailní lokalizaci glykanů se využívá sekundárních protilátek konjugovaných se zlatými částicemi (obr. 4.) a výsledky jsou pozorované transmisním elektronovým mikroskopem (TEM; rozlišení menší než 1 nm). Materiál se pro TEM obvykle připravuje následujícím způsobem: fixace, odvodnění, zalití do pryskyřic akrylátového typu, např. LR White, Lowicryl (Vancová a kol. 2006). Takto připravené materiály zachovávají dostatečný počet vazebně specifických míst pro značení a také struktura krájeného materiálu zůstává rozpoznatelná. Přesto je tato metoda ve značení omezená pouze na vazebná místa na povrchu

řezu. Vazebná místa se nacházejí pod povrchem řezu a nejsou přístupná ke značení ani k štěpení enzymy. Existují, ale také jiné moderní přístupy přípravy tkání, například příprava kryořezů podle Prof. Tokuyasu. Materiál se po chemické fixaci ošetří kryoprotektantem, zamrazí se a krájí při teplotách okolo -80 až -120 °C. Roztáté řezy se značí, kontrastují a nakonec pokrývají tenkou metylcelulózovou vrstvou (Tokuyasu 1973). Výhody této metody jsou: antigeny zůstávají ve vodném prostředí, fixace je jediný krok, kde může dojít k denaturaci proteinů, značící próby mohou proniknout a detekovat struktury na povrchu, ale i pod povrchem řezu (Bozzola a Russell 1999).

2. Cíle práce

1. Izolovat glykoproteiny ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* na základě jejich vazebné specifity k vybraným lektinům.
2. Charakterizovat izolované glykoproteiny metodami SDS-PAGE, „Western blot“ a enzymové deglykosylace.
3. Detekovat glykoproteiny v tkáních klíštěte.
4. Přípravit vzorky pro analýzy hmotnostní spektrometrií.

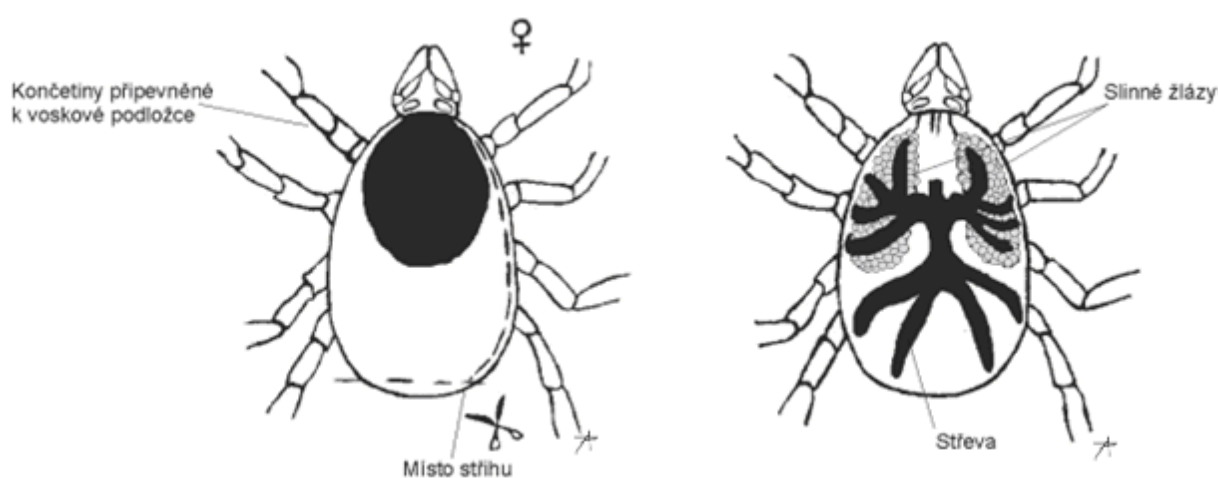
3. Materiál a metody

3.1. Sběr klíšťat

Klíšťata byla sbírána vlnkováním podrostu v lesích v okolí Českých Budějovic a Bechyně. Některé nenasáté samice sály na laboratorních morčatech 6 dní a poté byly opatrně sejmuty pinzetou a použity pro experimenty.

3.2. Získávání slinných žláz (SŽ) a slin klíštěte

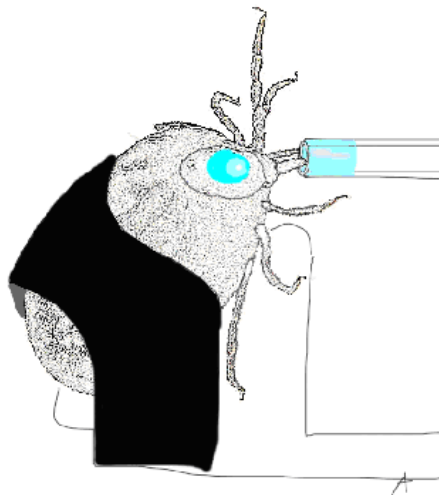
Pro získání orgánů byla klíšťata (nasátá či nenasátá) připevněna za končetiny k voskové podložce a zalita kapkou vody. Po stranách byla nůžkami opatrně rozstříhnutá a část volné kutikuly byla odstraněna (obr.5.). Střeva byla odebrána a SŽ byly vytaženy za slinný kanálek na petriho misku s vodou, kde byly očištěny od případných nečistot. Po dokončení pitvy všech klíšťat (20–40 klíšťat), byly SŽ vloženy do mikrozkušavky s TBS puřem (50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂; pH 7,5), zamraženy a uchovávány v tekutém dusíku.



Obr. 5. Pitva nenasáté samice klíštěte *I. ricinus*.

Sliny byly získávány z nasátých samic klíšťat (6 dní sání na morčatech). Množství získaných slin se pohybovalo mezi 20–40 μ l slin od 15 klíšťat. Klíšťata byla připevněna podle obr. 6. lepicí páskou a na hypostom, chelicery a jednu pedipalpu jim byla nasunuta mikrokapilára (DURAN[®]; 1–5 μ l; Hirschmann[®] laborgeräte), stabilizovaná ve své zadní části plastelínou. Připevněná klíšťata byla umístěna do vlhké komůrky při 37°C (Tatchell 1967). Po půl hodinách jsem odebírala z kapiláry sliny produkované klíštětem. Indukce slinění byla u klíšťat

prováděna postupnou aplikací 2 μ l pilokarpinu (50 mg/ml, v 95% etanolu) během 2–3 hodin pokusu, na dorzální štítek klíšťat (Valenzuela a kol. 2000).



Obr. 6. Získávání slin z připevněné nasáté samice klíštěte *I. ricinus*.

3.4. Příprava extraktu SŽ a určení koncentrace proteinů

SŽ v TBS pufru byly v mikrozkušavce na ledu sonikovány (Bandelin Sonoplus 2x 6 cyklů po dobu 10 sekund). Vzniklý homogenát byl centrifugován 10 minut na 12 000 g. Supernatant, extrakt SŽ (SŽE), byl odebrán a uchován v tekutém dusíku. Koncentrace proteinů byla změřena pomocí kitu Quant-iT™ Protein Assay (citlivost měření koncentrací od 0,25 μ g/ml) na přístroji Qubit™ fluorometer (Invitrogen) podle pokynů výrobce. Koncentrace proteinů v SŽE z 40–50 klíšťat se pohybovala u nasátých samic 1–2,5 mg/ml a u nenasátých samic 0,2–0,9 mg/ml.

3.5. Afinitní chromatografie

Izolace glykoproteinů z SŽE byla provedena afinitní chromatografií s lektiny imobilizovanými na agarózu viz tab. 2. Pro izolaci proteinu Siglec jsme použili komerčně získanou protilátkou proti N-konci Siglec 1, která byla v naší laboratoři navázaná na agarózu. Izolace byla prováděna na přístroji Bio Logic LP (BioRad) a průběh separace byl řízen a zaznamenáván pomocí softwaru LP Data View 1.01.

V prvním kroku byla kolona s agarózou a vázaným lektinem promyta TBS puftrem (viz tab. 2.) a byla provedena inkubace s SŽE (200–600 μ g/ml), ke kterému byl přidán Triton

X-100 (5 µl/ml) a směs inhibitorů proteáz (IP; Halt™ Protease Inhibitor Single-Use Cocktail; 10 µl/ml; Thermo Scientific). Po inkubaci byly nenavázané proteiny z SŽE vymyty TBS pufrem z kolony. Glykoproteiny navázané na koloně byly vymyty po inkubaci (15 min) s elučními roztoky sacharidů (viz tab. 2.). Eluovaná frakce byla koncentrována, odsolena a byly k ní přidány IP. Pro delší uchování byly jednotlivé frakce uloženy v tekutém dusíku. Po použití byla kolona vymyta od zbytků navázaných proteinů 3 M roztokem NaCl a promyta pufrem 0,01 M PB s 0,15 M NaCl, pH 7,2 (PBS).

Tab. 2. Přehled imobilizovaných lektinů používaných při izolaci glykoproteinů pomocí afinitní chromatografie.

Lektin	Vazebný rozsah lektinů mg/ ml gelu	Dodavatel	Používaný pufr	Roztok pro eluci
GNA	2–4	Sigma-Aldrich	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,7	0,5 M methyl-α-D-manosid
HPA	1–3	Sigma-Aldrich	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,25 M GalNAc
MAA II	neuveđen	EY Lab.	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 6,6	0,02 M etanolamin

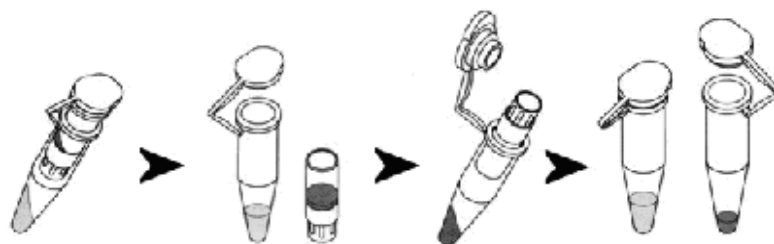
3.6. Odstranění albuminu ze vzorků

Albumin byl ve vzorcích opakovaně zjištěn pomocí analýzy hmotnostní spektrometrií a bylo nutné ho ze vzorků odstranit. To bylo provedeno použitím kitu ProteoExtract® Albumin Removal Kit (Calbiochem) podle instrukcí výrobce.

3.7. Koncentrace a odsolení proteinů

Koncentrace proteinů elučních frakcí získaných lektin afinitní chromatografií a frakcí zbavených albuminu byla zvýšena pomocí centrifugačních kolonek „Microcon® Centrifugal Filter Devices“ (Millipore) s MWCO (molecular weight cut-offs) nepropustnou membránou

10, 30 nebo 50 kDa. Centrifugace probíhala při 4°C podle návodu výrobce viz obr. 7. Ke koncentrovanému vzorku byly přidány IP a byl uložen do tekutého dusíku.



Obr. 7. Koncentrace proteinů ve vzorku pomocí kolonek Microcon[®] C.F.D. Vzorek je centrifugován v kolonce zasazené v mikrozkuhavce. Proteiny jsou zachyceny v kolonce a pufr je stočen do mikrozkuhavky. Po odstranění pufru je kolonka otočena a její obsah je centrifugací vychytán do mikrozkuhavky.

Upraveno podle Microcon[®] Centrifugal Filter Devices, User Guide, Millipore 2005.

3.8. Enzymatická deglykosylace proteinů

K proteinům byly přidány enzymy, příslušnými pufrů a denaturačními činidly za podmínek uvedených v tabulce 3. Inkubace probíhala přes noc při 37°C. Vyloučení případných proteázových aktivit v extraktu SŽ bylo důležité, sledovat pokud neproběhla denaturace proteinů před přidáním enzymů (platí například pro neuraminidázy). Tato kontrola byla provedena inkubací proteinů při stejných podmínkách ve výše zmíněných roztocích, ale bez přidání enzymů.

Tab. 3. Seznam použitých enzymů a jejich specifit, používaných koncentrací, přípravy vzorků a dodavatele.

Enzym	Štěpí	Koncentrace (U/μg SŽE)	Příprava vzorku před přidáním enzymu	Dodavatel enzymu
PNGáza F (<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>)	N-glykany, které nemají α1,3- vázanou Fuc ke GlcNAc P-jádra, od Asn proteinu.	10	18 μl SŽE + 3,6 μl 0,25 M PB, pH 6 + 0,9 μl denaturačního roztoku; míchání; 100°C 5 minut + 0,9 μl 15% Triton X-100	Calbiochem
PNGáza A (mandle)	N-glykany včetně těch, které mají vázanou α1,3Fuc ke GlcNAc P-jádra, od Asn proteinu.	0,250	50 μl SŽE + 0,3 μl 10% SDS + 1,3 μl 0,2 M DTT + 15 μl H ₂ O; 100°C 10 minut, 10 μl 0,5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,5 + 10 μl 10% NP40 + 12,6 μl H ₂ O	Calbiochem
α(1-6)-manosidáza (<i>Xanthomonas sp.</i>)	Terminální a nevětvenou α1,6- vázanou Man od Man P-jádra glykanu.	0,750	18 μl SŽE + 2 μl 0,5 M PB, pH 5,0	Calbiochem
Neuaraminidáza (<i>Vibrio cholerae</i>)	Preferenčně α2,3- vázanou Neu5Ac od GalNAc, ale také α2,6- a α2,8- vázanou Neu5Ac od GalNAc.	8–24	10 μl SŽE + 10 μl 0,2 M CH ₃ COONa s 8 mM CaCl ₂ , pH 5	Sigma-Aldrich

Denaturační roztok: 45 μl 0,02 M hydrouhličitan amonný; pH 8 + 5 μl 0,2% SDS s 0,1 M mercaptoetanolem

0,25 M PB: 17,9 g Na₂HPO₄.12 H₂O, 1,7 g KH₂PO₄/250 ml H₂O; pH 6

3.9. Elektroforetická analýza proteinů pomocí SDS-PAGE

Proteiny byly v elektrickém poli rozděleny v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecyl sulfátu (Laemmli 1970) na přístroji Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Denaturace proteinů byla provedena ve vzorkovém pufru s 0,4 M dithiothreitem (Protein Loading Buffer Pack; Fermentas) a varem po dobu 5 minut. Denaturované proteiny byly centrifugovány 3 minuty při 12 000 g a naneseny do jamek připravených polyakrylamidových gelů. Gely (10% rozdělovací gel s 5% zaostřovacím gelem) byly připraveny podle Harlow a Lane (1988). Elektroforéza proteinů byla provedena s použitím elektrodového pufru (2,5 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 0,01% SDS; pH 8,3) při napětí 160 V přibližně 1,5–2 hodiny. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) o velikostech: 170, 130, 95, 72, 54, 43, 34, 26 kDa.

Proteiny rozdělené v gelu byly přeneseny na PVDF membránu metodou "Western blot" nebo barveny podle postupu výrobce pomocí barvy Coomassie Brilliant Blue G-250, Page Blue™ (Fermentas), která je vhodná i pro detekci proteinů hmotnostní spektrometrií (MS). V případě potřeby byly gely dobarveny stříbrem podle protokolu Blum a kol.(1987).

3.10. Přenesení proteinů na membránu v elektrickém poli "Western blot"

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu podle 3.2.6 byly metodou "Western blot" (Towbin a kol. 1979) přeneseny na PVDF membránu (Millipore, 0,45 μm). Přenos byl proveden na "blotovací" zařízení Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) s použitím blotovacího pufru (2,5 mM TRIS, 19,2 mM glycin, 0,1% SDS, 20% metanol). Proteiny byly přenášeny v elektrickém poli při 350 mA a 60–80V po dobu 2 hodin.

3.11. Barvení a afinitní/imunitní značení přenesených proteinů lektiny/protilátkami a inhibice značení pomocí sacharidů.

Po ukončení přenosu proteinů byla membrána promyta v destilované vodě a proteiny byly obarveny pomocí 0,2% roztoku Ponceau-S (Sigma-Aldrich). Membrána byla před dalším použitím promyta TBS pufrem.

Proužky membrány byly promyté 3x v TBS pufru (viz tab. 4.) a 10 min blokovány v čerstvě připraveném roztoku 0,3% H₂O₂ ve vodě nebo 0,5% H₂O₂ v metanolu. Po promytí v TBS s 0,05–0,1% Tween 20 (TBS/T) byly proužky membrán blokovány v 3% BSA v TBS/T 3 hodiny při 37°C nebo přes noc při 4°C. Používané lektiny konjugované s biotinem (MAA II, GNA, SBA, DBA, HPA, UEA I, LTL, AAA, AAL; viz tab. 4.) byly inkubovány s proužky membrán 2 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C. Inhibice vazby lektinů sacharidy byla prováděna inkubací s vhodným monosacharidem (viz tab. 4.) 30 minut před aplikací na membránové proužky. Po důkladném promytí v TBS/T následovala inkubace s ExtrAvidinem (Sigma-Aldrich; 2–2,5 µg/ml) konjugovaným s křenovou peroxidasou. Po promytí v TBS/T následovalo vyvolání barevné reakce pomocí 3,3'-diaminobenzidinu (DAB 'peroxidase substrate kit'; Vector lab.).

Pro znázornění proteinů byly membrány barveny v roztoku Protogold (BB International), jehož citlivost barvení proteinů je v řádu pg/ml. Barvení bylo provedeno podle instrukcí výrobce.

K detekci Siglec 1 v proteinech SŽE na PVDF membránách bylo použito polyklonální IgG protilátky proti N-terminálnímu konci Siglec 1 (N-20; Santa Cruz Biotechnol, 2 µg/ml) a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Vektor lab., 1 µg/ml). Blokování a proplachování proužků bylo provedeno stejně (viz výše).

Při značení proteinů na membránách jsem prováděla i tzv. negativní kontrolu značení. Místo lektinu/protilátky v protokolu značení byl proužek s proteiny inkubován za stejných podmínek pouze s příslušným TBS pufrem. Bylo tak testováno, zda nedochází k nespecifické vazbě sekundární protilátky na proteiny SŽE.

Tab. 4. Seznam použitých lektinů konjugovaných s biotinem (koncentrace, inhibiční sacharid, dodavatel) a používané pufrы pro značení glykoproteinů přenesených na PVDF membránách.

Lektin	Dodavatel	Pracovní koncentrace (μg/ml)	Používané pufrы	Inhibiční sacharid
MAA II	Vector lab.	10	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 6,6	0,02 M etanolamin
GNA	Vector lab.	1	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,7	0,5 M methyl-α-D-manosid
SBA	Vector lab.	10	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,25 M GalNAc
DBA	Vector lab.	10	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,25 M GalNAc
HPA	Sigma-Aldrich	10	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,25 M GalNAc
LTL	Vector lab.	4	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	1 M L-Fuc
AAA	EY lab.	4	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	1M L-Fuc
AAL	Vector lab.	2	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	1 M L-Fuc
UEA I	Sigma-Aldrich	4	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	1 M L-Fuc

3.12. Hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci hmotnostní spektrometrií byly připravené vzorky proteinů štěpeny trypsinem a odsoleny pomocí C-18 kolon. Zachycené peptidy byly vymyty 60% acetonitrilem ve vodě, vysušeny pod vakuem a následně rozpuštěny v 15 μl HPLC vody. Pro MS analýzu bylo použito přibližně 1–5 μg peptidů.

Vlastní analýza MS/MS byla provedena na hmotnostním spektrometru Agilent 1100 Series LC MSD Ion-Trap XCT s nano-ESI ionizačním zdrojem. Peptidy byly separovány na C18 koloně pomocí gradientu 5–8% ACN. Ze získaných dat byly vytvořeny MASCOT generic soubory (mgf), které byly použity pro prohledávání databází (proteiny z klíšťat =

Acari a *Ixodes*, morčete = *Cavia*, myši = *Mus* a SWISS-PROT databáze) programem MASCOT. Do vyhledávání byly zařazeny pouze ionty s nábojem 2⁺ a 3⁺.

3.13. Příprava SŽ a střev pro imunoznačení

Střeva a SŽ jsem pitvala a promyla v 0,01 M PB s 0,15 M NaCl; pH 7,2 (PBS). Orgány byly fixovány 4% formaldehydem s 0,1% glutaraldehydem v 0,1 M PB 2 hodiny při 4°C. Během této doby byly mikrozkušavky 2x vystaveny mikrovlnám (30 sekund, 80W, ve vodní lázni, mikrovlnka Miele). Po fixaci byly orgány 1x promyty vypíracím roztokem (0,1 M PB; 0,2 M glukóza; 0,02 M glycin) a byly zality do 10% želatiny (v H₂O) při 37°C. Po ztuhnutí želatiny při 4°C byly orgány zalité v želatině nakrájeny a dále 2x promyty vypíracím roztokem při 4°C. Postupnou odvodňovací řadou etanolu byly vzorky odvodněny při snížené teplotě (30% etanol při 0°C 30min; při -15°C po dobu 1 hod.: 50, 70, 90 a 100% etanol) v kryosubstituční zařízení EM AFS (Leica). Postupné prosycování vzorků pryskyřicí s etanolem (1:2; 1:1 a 2:1) a s pryskyřicí bylo prováděno při teplotě -15°C, po dobu 1 hod. Pro polymeraci UV světlem byly SŽ prosycovány pryskyřicí LR White (Polysciences) s iniciátorem benzoyl methyletherem (0,15 g/30 g pryskyřice), zalévány do BEEM kapslí (Polysciences) a polymerovány při -11. až -15°C 24 hodin UV světlem v kryosubstitučním zařízení. Střeva byla prosycována pryskyřicí LR White s katalyzátorem benzoyl peroxidem (0,99 g/50 g pryskyřice) polymerace probíhala v želatinových kapslích a při 50°C 48 hodin.

3.14. Krájení bločků pro imunofluorescenční mikroskopii a TEM

Řezy o tloušce 100 nm jsem krájela na ultramikrotomu EM UC 6 (Leica) a vkládala je do kapky 10% acetonu na podložní sklíčka (Superfrost). Po zaschnutí byla kolem řezů vytvořena hydrofobní linie (PapPen; Electron Microscopy Sciences) a následovalo afinitní značení lektiny pro fluorescenční mikroskopii (viz 3.15.).

Pro TEM jsem na diamantovém noži (Diatome) krájela 70 nm řezy, které jsem nabírala na niklové sítky, které jsem dále značila podle protokolu viz 3.16.

3.15. Afinitní značení řezů SŽ a střev lektiny pro fluorescenční mikroskopii

Sklička s řezy jsem si připravila do vlhké komůrky. Řezy byly blokovány v 3% BSA, TBS/T (pH viz. tab. 5.) 3 hodiny při pokojové teplotě a dále inkubovány s lektiny (viz tab. 5.) přes noc při 4°C. Promývání bylo prováděno s 1,5 % BSA v TBS/T. Po aplikaci Streptavidinu konjugovaného s FITC (10 µg/ml, Vector lab.) na sklička byla celá vlhká komůrka zatemněna. Po promytí v TBS/T byla jádra buněk barvená DAPI (1µl/ml H₂O) 15 minut při pokojové teplotě a řezy byly znovu promyty a montovány do roztoku 2,5% DABCO/95% glycerol s přídavkem n-propyl galátu (15 mg/ml). Sklička se značenými řezy byla uložena ve tmě při teplotě 4°C. Prohlížení značených řezů bylo provedeno na mikroskopu BX51 (Olympus) a snímky byly vyfoceny kamerou DP70. Úpravu obrázků jsem provedla pomocí grafického softwaru Adobe Photoshop.

Tab. 5. Seznam použitých lektinů konjugovaných s biotinem (koncentrace, inhibiční sacharid, dodavatel a používané pufrý) pro značení přítomných glykanů na řezech SŽ a střev pro fluorescenční mikroskopii.

Lektin	Dodavatel	Pracovní koncentrace (µg/ml)	Používané pufrý	Inhibiční sacharid
GNA	Vector lab.	40	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,7	1 M methyl-α-D-manosid; TP*(40mg/ml)
LTL	Vector lab.	40	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,5 M L-Fuc
AAA	EY lab.	40	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,5 M L-Fuc
AAL	Vector lab.	20	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,5 M L-Fuc
UEA I	Sigma-Aldrich	40	50 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,4	0,5 M L-Fuc

*TP= prasečí tyreoglobulin (Sigma)

3.16. Afinitní značení řezů SŽ a střev lektiny pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Protokol značení byl stejný jako u značení řezů pro fluorescenční mikroskopii kromě rozdílné koncentrace lektinů (viz tab. 6.) a použití Streptavidinu konjugovaného s 10 nm zlatými partikulami (EMS; ředěno 1:40). Po značení byly síťky promyty v destilované vodě, kontrastované 2% vodným roztokem octanu uranylu (2 minuty). Nakonec byl na jejich povrch napařen uhlík v napařovače uhlíku JEOL JEE 4C. Značené řezy na síťkách byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1010. Fotografie byly pořízeny kamerou a programem CCD MegaView III (SIS). Zpracování a úprava obrázků byla provedena pomocí grafického softwaru Adobe Photoshop.

Tab. 6. Seznam použitých lektinů konjugovaných s biotinem (koncentrace, inhibiční sacharid, dodavatel a používané pufrý) pro značení na řezech SŽ a střev pro TEM.

Lektiny	Dodavatel	Koncentrace (µg/ml)	Používané pufrý	Inhibiční sacharidy
GNA	Vector lab.	200	10 mM Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM ionty (CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂); pH 7,7	1 M methyl- α -D-manosid; TP* (40mg/ml)

*TP= prasečí tyreoglobulin (Sigma)

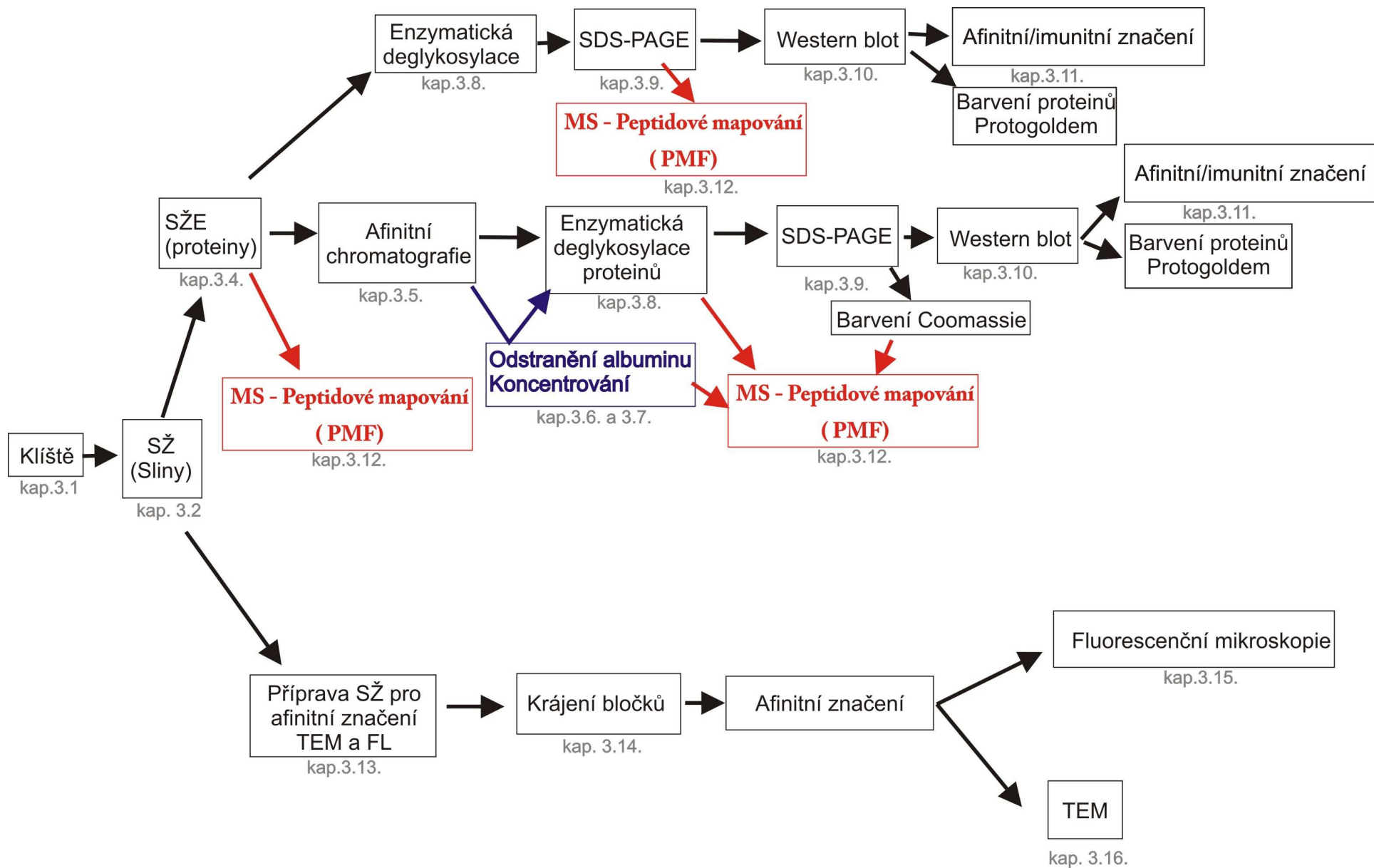


Schéma 1. Znáznornění metodiky práce

4. Výsledky

4.1. Přítomnost manózy v SŽ částečně nasáté samice klíštěte

Manóza vázaná v glykoproteinech slinných žláz (SŽ) byla identifikována a lokalizována pomocí afinitní vazby s lektinem *Galanthus nivalis* (GNA), který preferenčně váže oligosacharidy obsahující Man α 1,3Man. Proteiny extraktu SŽ (SŽE) byly po elektroforetickém dělení přeneseny na PVDF membránu a afinitně značeny lektinem GNA (tab. 4.). Takto bylo identifikováno větší množství manosylovaných proteinů v rozmezí velikostí od 40 kDa až po 170 kDa. Nejvýraznější reakce značení se objevila u proteinů o velikosti přibližně 120 kDa, 145 kDa a 170 kDa (obr. 8). Pomocí GNA afinitní chromatografie byly z SŽE izolovány proteiny, z nichž při afinitním značení s GNA lektinem nejsilněji reagoval protein o velikosti přibližně 120 kDa (obr. 8, označen šipkou).

Pro odlišení N- či O- glykosidové vazby, jsem protein deglykosylovala enzymem PNGáza F (obr. 9.). Pro bližší určení vazby manózy v glykanu tohoto proteinu jsem použila α 1,6-manosidázu (obr. 9.). Porovnála jsem afinitní značení proteinů eluční frakce připravených v přítomnosti i v nepřítomnosti enzymů během stejných reakčních podmínek (obr. 9.). Enzymem PNGáza F došlo k deglykosylaci u přibližně 120 kDa izolovaného proteinu. Následující afinitní značení lektinem GNA bylo negativní (obr. 9.) a velikost zmiňovaného proteinu se přibližně o 30 kDa zmenšila (obr. 9.). Po deglykosylaci s α 1,6-manosidázou jsem nezaznamenala žádnou změnu ve velikosti přibližně 120 kDa proteinu a také afinitní značení s lektinem GNA zůstalo pozitivní (obr. 9.). Barvením Protogoldem byly detekovány proteiny, které svou velikostí odpovídají α 1,6-manosidáze (51 kDa) a enzymu PNGáze F (36 kDa).

Negativní kontroly vyloučily nescifické vazby ExtrAvidinu na proteiny (obr. 8). Specifitu vazby glykoprotein/lektin jsem potvrdila vyblokováním vazby lektinu GNA pomocí 0,5 M metyl- α -D-manosidu (obr. 8).

Směs proteinů v eluční frakci z GNA afinitní chromatografie, ale i jednotlivé elektroforeticky rozdělené proteinové proužky z eluční frakce rozdělené pomocí SDS-PAGE elektroforézy byly analyzovány metodou peptidového mapování (Peptide Mass Fingerprinting; PMF) pomocí hmotnostní spektrometrie (MS; Mass spectrometry). Tyto analýzy opakovaně potvrdily přítomnost albuminu v eluční frakci GNA afinitní chromatografie. Po odstranění albuminu (viz kapitola 3.6.) jsem nezaznamenala žádný rozdíl

v GNA značení ani ve velikosti izolovaných proteinů eluční frakce. Nepřítomnost albuminu ve vzorcích izolovaných proteinů byla poté potvrzena MS, PMF.

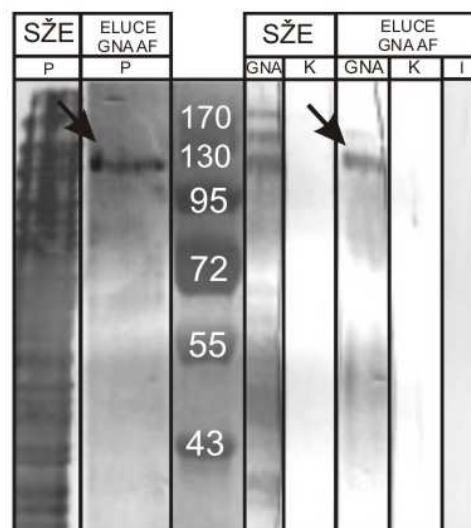
Výsledkem MS analýz metodou roztoku eluční frakce z GNA afinitní chromatografie bylo získání sekvence dvou peptidů (**K.LTHKMIGQFLK.Q**; **K.MIGQFLK.Q**). Tyto sekvence byly porovnávány se známými sekvencemi v databázích "*Ixodes scapularis*", "*Acari*", "*Cavia porcellus*", "*Mus musculus*" a byly hledány jim podobné proteiny. Tyto dva identifikované peptidy byly přiřazeny k proteinu karboxypeptidáza M (podtrida N/E) z klíštěte *Ixodes scapularis*. Pokrytí zjištěné sekvence se sekvencí této karboxypeptidázy byla 4%, ale přesnost získaných fragmentačních spekter těchto peptidů plně podpořila identifikované sekvence peptidů (obr. 10.). Karboxypeptidáza M má velikost 28 176 Da.

Lokalizace Man α 1,3Man v tkáních klíštěte byla provedena na ultratenkých řezech SŽ částečně nasátých samic pomocí GNA afinitního značení a detekcí streptavidinem, konjugovaným s fluorescenční značkou. Výsledky jsem prohlížela pomocí fluorescenčního mikroskopu (obr. 11.). Specifická reakce byla pozorována v granulích sekrečních buněk *b* a *c* acinu typu II (obr. 11. B), v granulích sekrečních buněk *f*, které se hromadily na straně přiléhající k lumen acinů typu III (obr. 11. A). Lektin GNA se vázal na povrch acinu typu III (obr. 11. A). Kontrolní reakce byla provedena inkubací lektinu s inhibičním monosacharidem (1 M methyl- α -D-manosidem, 30 minut při pokojové teplotě) před nanesením na řezy SŽ. U takto značených řezů SŽ jsem pozorovala změny vazby lektinu na některá granula *c* buněk acinů II a ve značení *b* buněk, kde značení přetrvávalo pouze na periferii granul.

Pro detailní lokalizaci Man α 1,3Man v buňkách acinů jsem použila afinitní značení ultratenkých řezů pro transmisní elektronovou mikroskopii (obr. 12.). Značení bylo přítomné v granulích *b* a *c* buněk acinů II (obr. 12. A, B, C, D, E) a v granulích buněk *f* acinu III (obr. 12. F, G). Pozorovala jsem také specifické značení v periferii granul *b* buněk (obr. 12. B, C). Inhibiční reakce byla provedena inkubací GNA lektinu s 1 M methyl- α -D-manosidem, 2 hodiny při pokojové teplotě. Tato inhibice měla za výsledek úplné vyblokování vazby GNA na glykoproteiny (obr. 12. H, I, J).

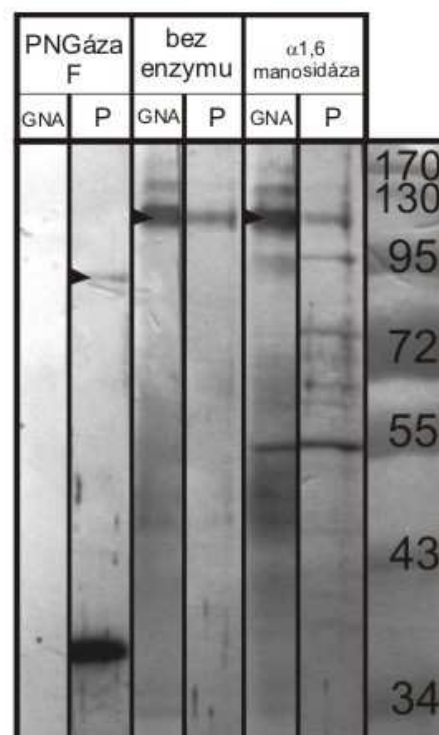
Obr. 8. Detekce glykoproteinů [obsahujících Man(α 1-3)Man] GNA- afinitním značením v proteinech SŽE částečně nasáté samice klíštěte a v proteinech izolovaných pomocí GNA afinitní chromatografie (GNA AF).

SŽE a eluční frakce byly barveny Protogoldem (P) nebo značeny GNA lektinem. Negativní kontrola značení (K). Inhibiční reakce (I) vazby lektin/glykan pomocí 0,5 M methyl- α -D-manosidu. Šipkou je označen protein o přibližné velikosti 120 kDa.



Obr. 9. Detekce glykoproteinů izolovaných pomocí GNA afinitní chromatografie po deglykosylaci enzymy PNGáza F a α 1-6 manosidáza.

Detekce byla provedena afinitním značením lektinem GNA a barvením proteinů Protogoldem (P). Enzym PNGáza F štěpil přibližně 120 kDa velký protein, došlo k ztrátě jeho afinity k lektinu GNA a ke zmenšení proteinu o přibližně 30 kDa (šipka). Enzymem α 1-6 manosidáza se proteiny neštěpily a přibližně 120 kDa velký protein zůstal značený GNA lektinem a jeho velikost se nezměnila (šipka).



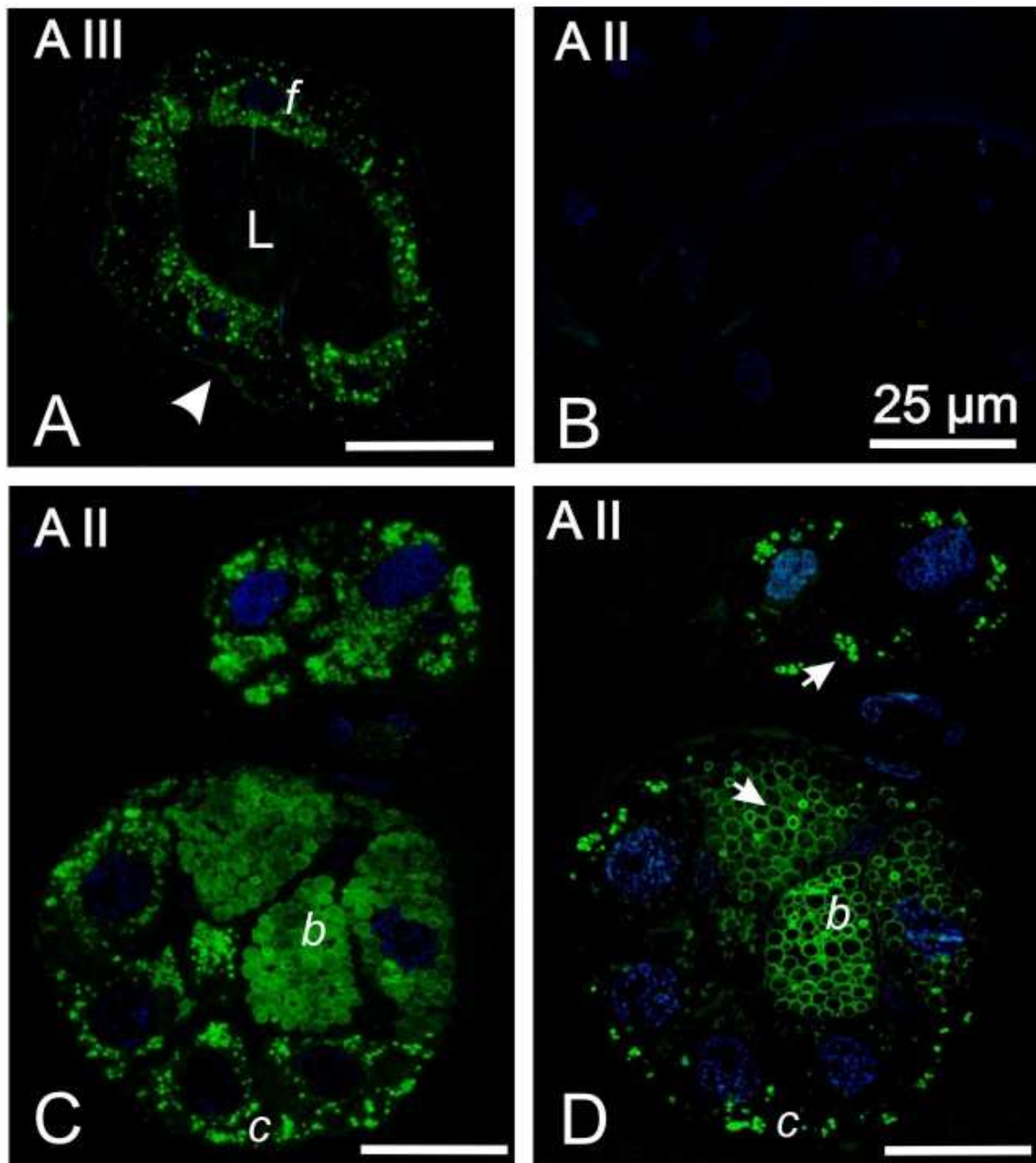
Obr. 10. Sekvence karboxypeptidázy M klíštěte *Ixodes scapularis*.

Aminokyselinová sekvence peptidů glykoproteinů izolovaných pomocí GNA afinitní chromatografie (červeně) a porovnání s celou sekvencí karboxypeptidázy M z databázemi sekvencí genů "*Ixodes scapularis*", "*Acari*", "*Cavia porcellus*" a "*Mus musculus*".

```

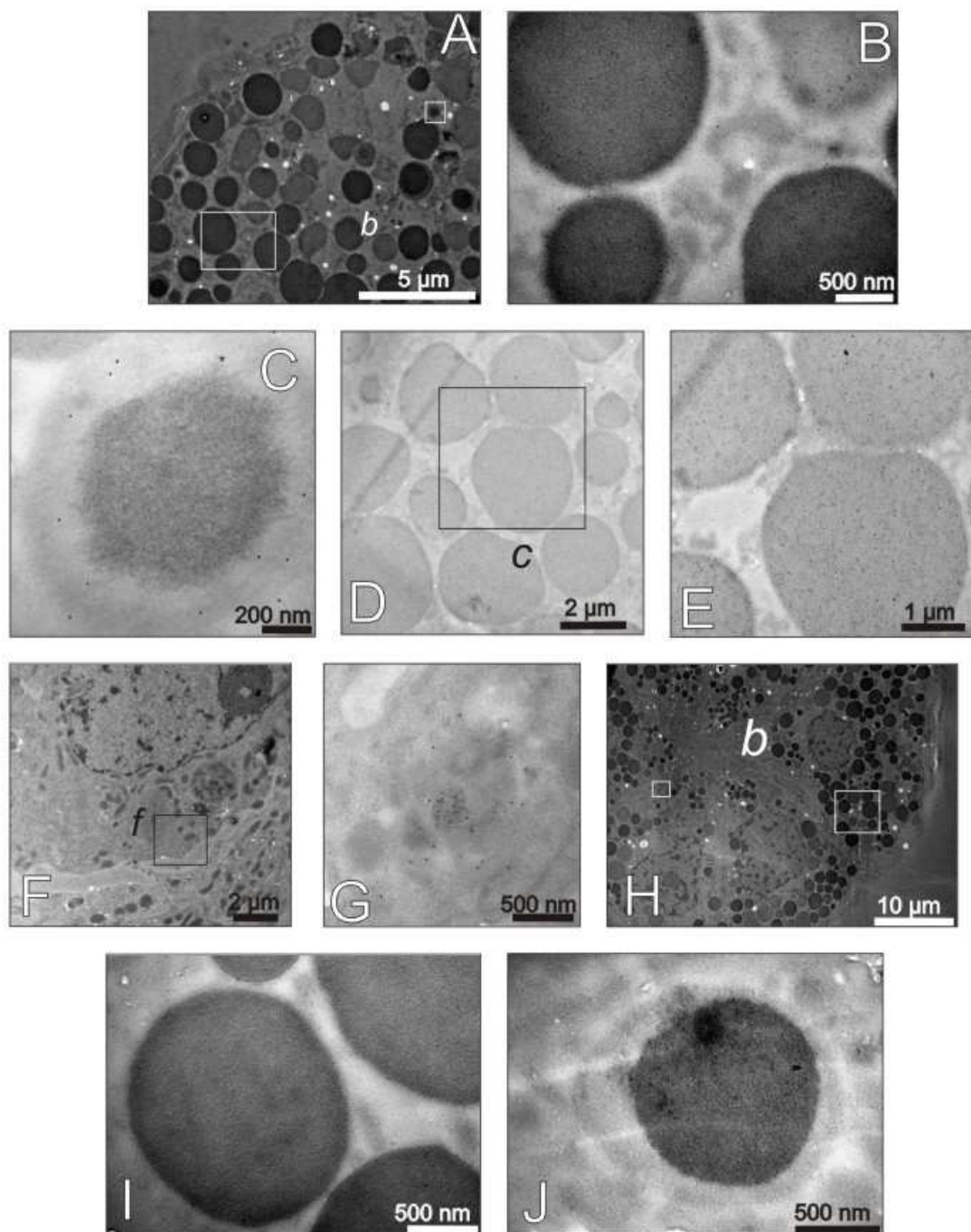
1  NLKGVLAGSP  FLGPLEETID  SSEFLFSVGM  LNITSKVLFH  QAFENLTKET
51  NRTIQLFIFF  KIVFQDYTKK  NPILFQRLTG  YNFDASVLHT  RIPQEFVEYK
101  NYVMNSDFKT  RIHVGSDAVF  EKQMGVVIS  MGNVDFFTNI  TLMVQSVFDM
151  YRVLIIYGGQL  DTIFPAINMD  RFYNSLEWKG  SEDFRKERVV  WYDEDDPDYL
201  NGYVKKGGNV  TYVLFVGAGH  DPGFDAFKLT  HKMIGQFLKQ  QELVY

```



Obr. 11. GNA značení řezů SŽ částečně nasáté samice klíštěte *I. ricinus* (zelená).

(A) Pozitivní reakce přítomná na *f* buňkách acinu typu III nacházející se na straně přivrácené k lumen (L). Slabá reakce na povrchu acinu typu III (šipka). (B) Negativní kontrola značení. (C) GNA pozitivní reakce v granulích *b* a *c* buněk acinu typu II. (D) Částečná inhibice vazby lektinu provedaná methyl- α -D-manosidem na řezu stejnými objekty jako C. Vazba lektinu přetrvává v některých granulích *c* buněk (šipka) a na periférii granul *b* buněk (šipka). Jádra jsou dobarvená DAPI (modrá).



Obr. 12. Značení ultratenkých řezů SŽ částečně nasátých samic klíštěte *I. ricinus* lektinem GNA, pozorováno v TEM. Inhibice s 0,5 M methyl- α -D-manosidem na řezu acinu II (H-J).

Pozitivní značení lektinem GNA jsme zaznamenali v acinu typu II.. Oblast *b* buněk (A) a *c* buněk (E) znázorněná při přehledovém zvětšení. Značení bylo přítomno na periferii granul *b* buněk (B, C) a v granulích *c* buněk (D). V acinu typu III byla pozitivní reakce přítomna v granulích *f* buněk (G). (F) Část *f* buňky, přehledové zvětšení. Inhibiční reakce lektin/glykan na acinu typu II byla úplná a granula *b* buněk (I, J) nebyla značena. (H) Pohled na *b* buňky acinu typu II.

4.2. Přítomnost manózy ve SŽ nenasáté samice klíštěte

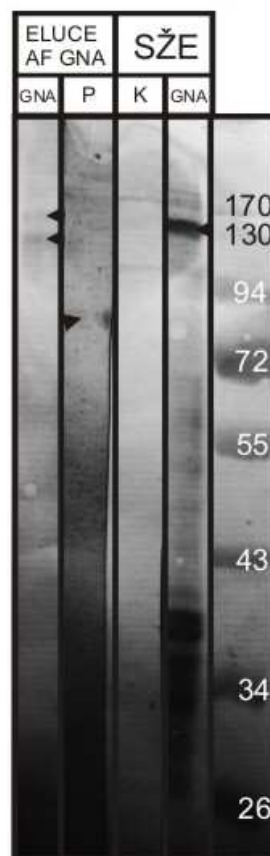
Elektroforeticky rozdělené proteiny SŽE nenasátých samic byly přeneseny na PVDF membránu a pomocí lektinu GNA jsem detekovala větší počet proteinů obsahujících Man α 1,3Man (obr. 13.). Výrazná reakce afinitního značení byla u proteinu velkého přibližně 130 kDa, další pozitivní reakce byly u proteinů velkých přibližně 30–40 kDa.

GNA afinitní chromatografií byly izolovány proteiny o velikosti 130 a 110 kDa (obr. 13.). Při barvení izolovaných proteinů Protogoldem byl objeven ještě protein o velikosti 80 kDa, ten ale nebyl specifický pro GNA značení (obr. 13.). Bylo izolováno přibližně 120 μ l eluční frakce o celkové koncentraci 250 μ g/ml. Po ověření přítomnosti izolovaných proteinů barvením Protogoldem a afinitním značením (obr. 13) jsem zbývající materiál poslala na analýzu MS. Výsledkem byly sekvence, které byly přiřazeny k proteinům arylsulfatáza B z klíštěte *Ixodes* [‘arylsulfatase B (*Ixodes*)‘] a protein Sojo cytoskeletu klíštěte [‘cytoskeletal protein Sojo (*Ixodes*)‘]. Skóre získaných sekvencí bylo nízké. Výsledky bude nutné ještě ověřit.

Lokalizace Man α 1,3Man v tkáních nenasáté samice klíštěte byla provedena afinitním značením lektinem GNA konjugovaným s biotinem a streptavidinem na ultratenkých řezech SŽ a pozitivní reakce byla pozorována pomocí TEM (obr. 14.). Specifická reakce byla pozorována v granulích sekrečních buněk acinů typu II (obr. 14. A) a III (obr. 14. B).

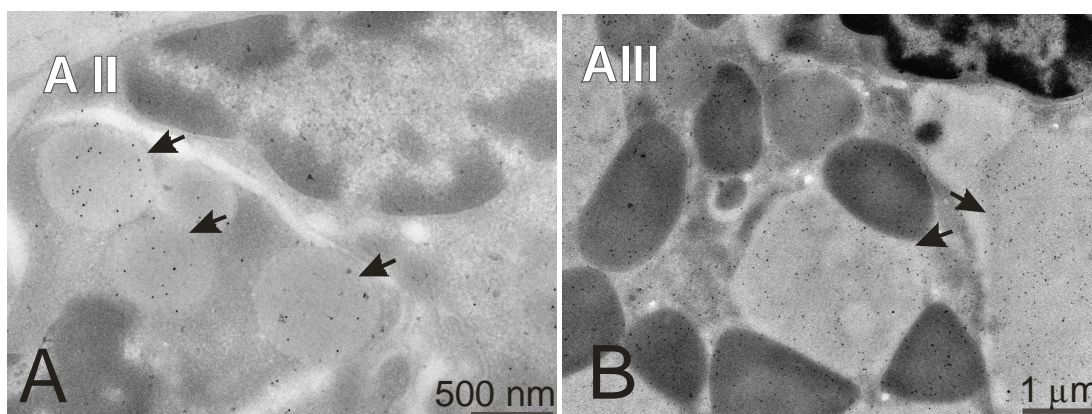
Obr. 13. Detekce GNA specifických glykoproteinů v SŽE nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* a v glykoproteinech izolovaných pomocí GNA afinitní chromatografie (ELUCE AF GNA).

GNA pozitivní vazba na proteinech SŽE označila proteiny v oblasti 30-40 Da a protein o velikosti přibližně 130 kDa (označené šipkou). Šipkou jsou označeny proteiny izolované pomocí GNA afinitní chromatografie, jejich vazba s lektinem GNA a barvení Protogoldem. Negativní kontrola značení (K) a barvení proteinů Protogoldem (P).



Obr. 14. Značení ultra tenkých řezů SŽ nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* lektinem GNA pro pozorování v TEM.

Specifická reakce (označená šipkou) v granulech acinů typu II (B) a typu III (A).



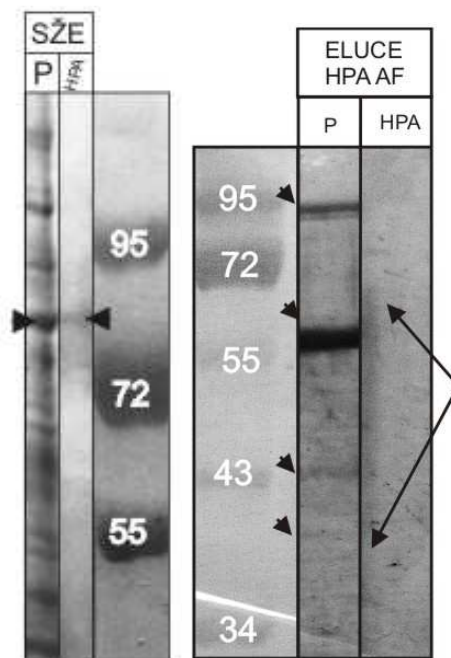
4.3. Přítomnost N-acetyl-D-galaktosaminu/ (D-galaktózy) ve SŽ klíštěte

Přítomnost glykoproteinů obsahující GalNAc/Gal byla zkoumána afinitních značením lektiny: *Glycine max* (SBA), *Dolichos biflorus* (DBA) a *Helix pomatia* (HPA). Pozitivní reakce byla pozorována při značení s lektinem HPA, který rozeznává α -GalNAc. Specificky se s HPA lektinem vázal protein o velikosti přibližně 85 kDa (obr. 15.). HPA afinitní chromatografií (HPA AF) byly izolovány proteiny, které po elektroforetickém rozdělení a afinitním značení byly těžko identifikovatelné. Ostré proteinové proužky nebyly pozorovány a v oblastech od přibližně 40 kDa do 70 kDa se objevovaly pouze "šmouhy" místo značení proteinových proužků. Po obarvení izolovaných proteinů na membráně Protogoldem jsem rozeznala proteinové proužky o velikostech přibližně 56 a 85 kDa, ale také další proteiny o velikosti přibližně 40 a 43 kDa (obr. 15.). Afinitní chromatografií jsem získala pouze přibližně 120 μ l eluční frakce a koncentrace proteinů byla 120 μ g/ml, proto jsem po provedení SDS-PAGE a HPA afinitního značení zbývající roztok eluční frakce s izolovanými proteiny zaslala na analýzu MS.

MS analýzou byla získána aminokyselinová sekvence asi 30 peptidů. Porovnáním získaných aminokyselinových sekvencí peptidů s datábázemi byl zjištěn protein Trappin 12 pocházející z morčete *Cavia porcellus* („Trappin 12 [*Cavia porcellus*]“). Získané sekvence měly pokrytí s aminokyselinovou sekvencí 157 766 Da velkého Trappinu 12 ve 26%. (obr. 16.).

Obr. 15. Detekce glykoproteinů obsahujících α -GalNAc v SŽE částečně nasáté samice klíštěte a v proteinech izolovaných pomocí HPA afinitní chromatografie.

Detekce byla provedena značením lektinem HPA a barvením Protogoldem (P) v extraktu SŽE a v eluční frakci získané HPA afinitní chromatografií. V SŽE se pozitivně značil protein o velikosti přibližně 85 kDa (označen šipkou). V izolovaných proteinech eluční frakce HPA afinitní chromatografie (eluče HPA AF) se izolované proteiny 85 a 55 kDa neznačí, ale dobře se barví Protogoldem (šipka).



Obr. 16. Porovnání aminokyselinové sekvence Trappinu 12 z morčete *Cavia porcellus* se získanými sekvencemi izolovaných peptidů.

Aminokyselinové sekvence peptidů izolovaného proteinu (červeně) získaných pomocí MS analýzy byla porovnaná s celou sekvencí Trappinu 12 zjištěnou z databáze. Bylo izolováno celkově 30 peptidů a celkové pokrytí je 26%.

```

1  MKPTVFLILS  ILLIIVVEQAS  GKLLIVAVNS  QETVQGVVWT  TQQDFMEEEF
51  IVQKNDPMIO  SIWVNGQGFV  EEAVSVKGLS  SMKGRMRVEG  QALIGKTVEV
101 KGLHPVKGRM  RVNGQTLMGN  AVSVKGGHGL  KSHMQVRGQD  LMGEFLVQG
151 NDPVISHIYW  NQEDFVENPV  SVKSLGNVNS  KGYLKHBYL  KQGGSLKQQL
201 QIEGQDMEE  EITVNGLQPV  KGPVQVRGQD  LMGEFLVQGN  TDFMISHRIW
251 DGGDFMEEEV  SDKGLSPVNS  RSSLKQGGSL  KGFGLKGGQ  SLKGSNQIKG
301 QDLTGDKHLF  QQQDFVNSHT  WVGQDFVVE  FDSVRSLGPF  KGGTQIQGGQ
351 FLGEAVAVKQ  FGPINQHSLS  KGRGSLKGLG  SLKQGSQKQ  FGLKQGGSL
401 KGRVQVKGQD  LMGEFLVQGF  QDPTGGHIGV  GQDFVDEAD  SVKGFSPVKG
451 RTQQEQDVG  QAVSVKGFSP  VNGRGLKGF  GSLKGRSLSK  GQGSLEGRVQ
501 VKQDLMGEE  FLVQGGDPTG  GHVGRGQDF  VDEADSVKGF  SPVNRRTQQ
551 EQDLLGQAVS  VNGFSPVKEP  GSLKGRSLSK  SLKGRGQGS  LKGRSLEGF
601 DELEGRSLSK  GRTQVKGQDL  TGEFLVQGG  DPTGGHIGV  GQDFVKETDS
651 VKGFSPVKEP  TQGGEQDLGQ  AVSVKGFSPV  KDHGSLKQGR  SLNGLSLEK
701 GGLKGRGSL  KGTQLTGGD  LIGELLVQG  QDPVVRQHF  VEEAGSANGL
751 SPINGRSSLK  GHGSLKGLQ  RREDLDEAVL  VKGLHPVKGK  TQVQEQDLLQ
801 QAVSVKGFSP  VNGGSLKGF  IQVKGQDLG  EAVSVKGLGF  VNSHGLKQK
851 GSLKGPVQV  GQDLLGEAVS  VNGISPVKSE  GALEGHDSLE  DRLQMGQDL
901 KEAVSVKGLS  FVKGGIQVPS  QDILGEAVLV  KGLTPVKGDT  QIQGQDLLE
951 AISINGLAPG  KGTQVEGGD  FLGEAALVNS  LAPEKGGTQV  QGQSVLGDAL
1001 SVKGLLSPVK  DMGINGQALI  FEAVRGSSTM  KSLMQLRGQD  VMREAIAVKQ
1051 LSSVKDQNV  NGQNLMEVVA  VETVSSVNGH  IQVTERDSNG  EFFSQKRDPT
1101 IGRHWVTGGD  FVQESVSVKQ  LDSVNGEMRV  KQNFVGEAV  SVKGLDSVKG
1151 QMBVKGQHFL  SEAVSVKSVS  SVKDCMQING  QDFTGEAVSV  EGLDSVKGHM
1201 RVKQGNFIGE  AVSVKDLGSP  KSHMQVRGQD  FLGEAVSVKQ  LHPVKGDTQV
1251 KROGLLDRAV  SVKGLSSVKG  GROVKGQAST  GRAVSVKGLS  APRGHSOVKQ
1301 QDILQEAVPV  KSVGHVKGGM  QIKGQDVKGR  VVAARGLQGF  NSHTQLKHN
1351 FQDAAVSVKT  LGSIKRQGS  RQGSLEKGF  QIKGQDSTKE  AVLQGLLSP
1401 KSHMQIHENA  MEDTVLINGQ  DRMKRHRQFK  GQDRMEENAA  FNGQGMFKR
1451 SFKPGSCPD  ITGQCTQTS  SKGSDVECP  GIKKCVGMC  GMECLIPK

```

4.4. Přítomnost fukózy ve SŽ částečně nasátých samic klíštěte

Glykoproteiny s vázanou fukózou ve SŽ částečně nasátých samic klíštěte jsem zkoumala pomocí lektinů specifických pro různý typ vazby fukózy v oligosacharidu. Mezi použité lektiny patřily: lektin *Ulex europaeus* I (UEA I; specifický pro α 1,2Fuc), lektin *Lotus tetragonolobus* (LTL; specifický pro α 1,2Fuc a Lewis^x antigen - Le^x), lektin *Anquilla anquilla* (AAA; specifický pro vazbu α 1,2Fuc v oligosacharidech a Lewis^b a H antigen) a lektin *Auleria aurantia* (AAL; specifický pro α 1,2Fuc, α 1,3Fuc, α 1,6Fuc, Le^x, a sializovaný Le^x). Afinitní značení elektroforeticky rozdělených a na PVDF membránu přenesených proteinů SŽE odhalilo velké množství proteinů obsahující fukózu. Nejvíce proteinů se značilo lektinem AAL, silná reakce značení byla pozorována u malých proteinů v oblasti 30–50 kDa (obr.). Lektiny AAA a LTL značily téměř totožné proteiny. Výrazná reakce značení byla u proteinů o velikostech 95 kDa, 80 kDa, 50 kDa, 45 kDa (obr. 17.). Lektin UEA I značil nejméně proteinů (obr. 17.).

Pro potvrzení specifity vazby byla provedena inhibice vazby lektinů s 0,5 M L-fukózou. Lektiny s fukózou byly inkubovány při pokojové teplotě 30 min před nanesením na proužek membrány s elektroforeticky rozdělenými proteiny SŽE. Úplnou inhibici značení lektiny jsem pozorovala pouze u inhibice vazby lektinu AAL s 0,5 M Fuc (obr. 17.), u ostatních lektinů byla inhibice jen částečná.

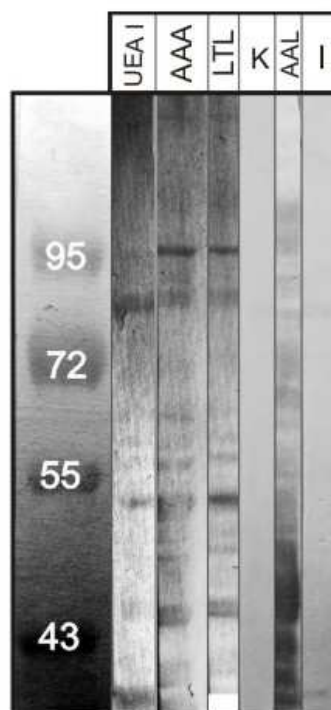
Pro zjištění, zda je fukóza vázaná na jádro oligosacharidů vázaných N-glykosidovou vazbou jsem porovnávala profily afinitně značených proteinů SŽE připravených po inkubaci s enzymy PNGáza F, PNGáza A, s kombinací obou enzymů a bez přítomnosti enzymů (obr. 18.). Ani jeden z enzymů PNGáza A a F nebyl schopen deglykosylovat všechny proteiny, a tím tak zabránit vazbě s některým lektinem. U proteinů deglykosylovaných enzymem PNGáza A byl značený protein o přibližné velikosti 100 kDa lektinem AAA a protein o přibližné velikosti 45 kDa, který se značil lektinem AAL (obr. 18, červený rámeček). U proteinů deglykosylovaných enzymem PNGáza F jsem detekovala značení lektiny LTL a UEA u proteinu o přibližné velikosti 97 kDa. Pravděpodobně stejný protein přibližně o velikosti 45 kDa se znovu značil lektinem AAL (Obr. 18, červený rámeček). Ani použitím obou enzymů jsem nedocílila úplné deglykosylace proteinů. Pomocí afinitního značení s lektinem AAA zůstal značen jeden protein o přibližné velikosti 100 kDa (obr. 18, červený rámeček).

U značených proteinových profilů (připraveny bez přítomnosti enzymů) jsem detekovala při značení lektiny AAA a LTL proteiny o přibližné velikosti 95, 72, 53, 48, 49, 45, 38, 37, 34 kDa (obr. 18). Při značení proteinů lektinem AAA došlo k méně výrazné reakci. Lektin UEA I na membránách neznačil žádné proteiny (obr. 18.). Vazba lektinu AAL na glykany byla velmi silná a nebylo možno lépe odlišit jednotlivé proteinové proužky (obr. 18.).

Lokalizace fukosylovaných proteinů byla provedena na 200 nm tenkých řezech SŽ a střev částečně nasátých samic nepřímou afinitní fluorescencí s lektiny AAA, AAL, LTL a UEA I. Na řezech bylo pozorováno pouze značení lektinem AAL (obr. 19.). Řezy značené ostatními lektiny byly bez reakce, stejně jako řezy značené pouze streptavidinem (negativní kontrola). Pozitivní reakce s lektinem AAL byla ve střevě nasáté samice klíštěte pozorována ve střevním obsahu a ve střevních buňkách (obr. 19. A). Ve SŽ nasáté samice byla reakce s lektinem AAL přítomna v granulích buněk acinů typu II (obr. 19. C) a typu III (obr. 19. B), ale také na průřezích vývodů SŽ (obr. 19. C, E označené šipkou). Aciny typu I se lektinem AAL neznačily (obr. 19. D). Inhibice vazby lektinů na struktury tkání klíšťat s 0,5 M fukózou vedla k úplné inhibici vazby (obr. 19. G).

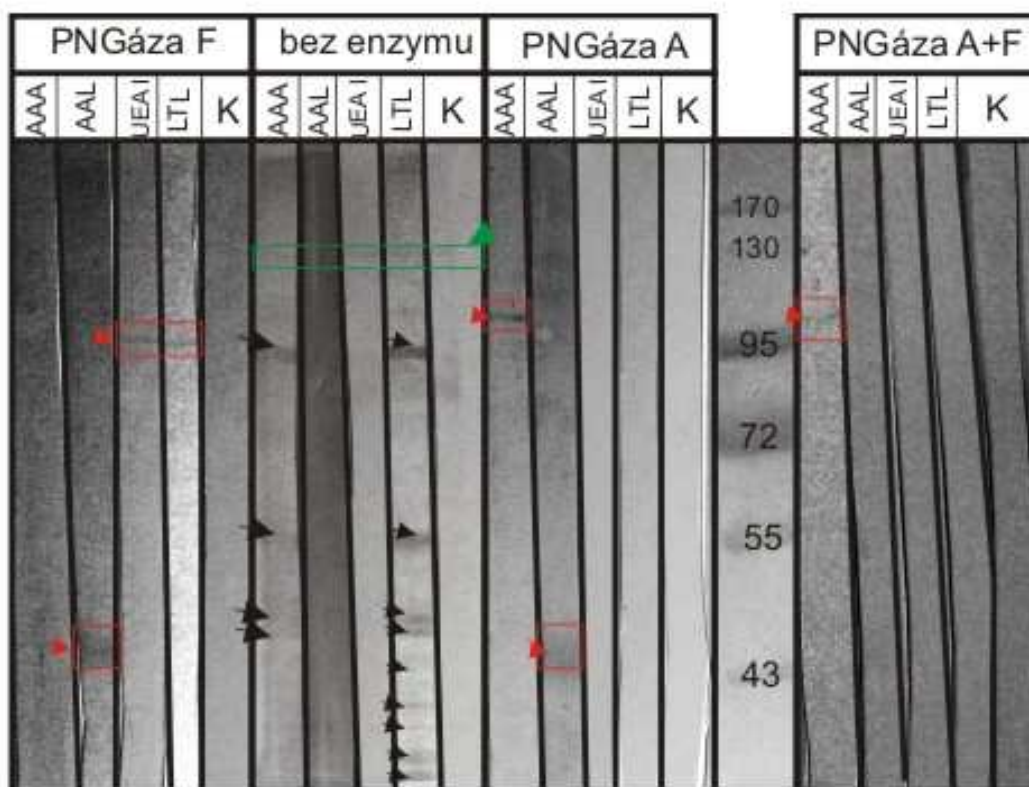
Obr. 17. Detekce fukosylovaných proteinů ze SŽE částečně nasátých samic klíštěte *I. ricinus* pomocí afinitního značení lektiny UEA I, AAA, LTL a AAL.

Negativní kontrola značení (K). Inhibice lektinu AAL fukózou (I). Lektinem UEA I se značí nejméně proteinů, zatímco u lektinu AAL je silná reakce napříč celým proteinovým profilem. Lektiny AAA a LTL mají podobný profil značených proteinů.



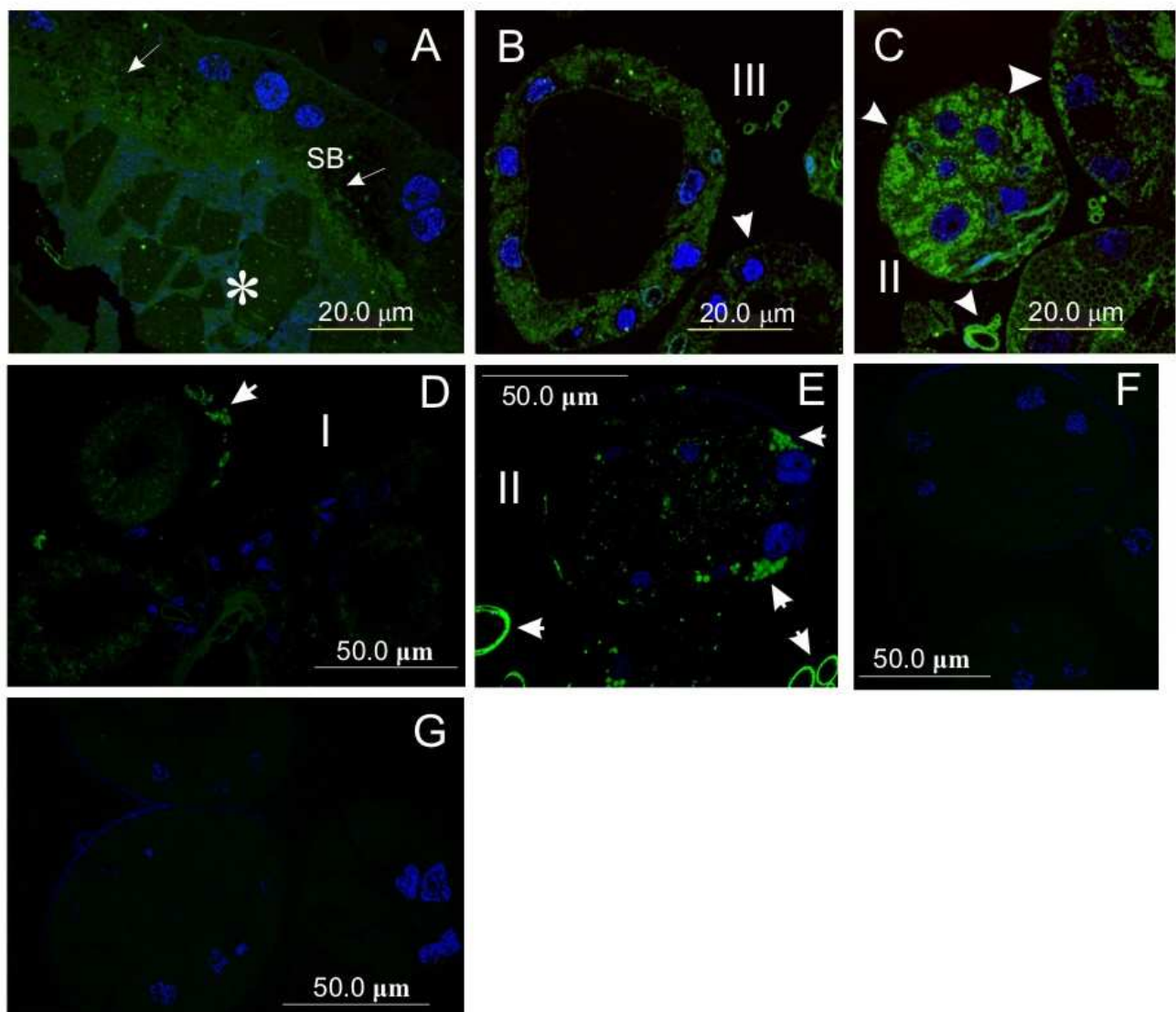
Obr. 18. Detekce fukosylovaných glykoproteinů pomocí afinitního značení lektiny AAA, AAL, UEA I a LTL na proteinech SŽE bez glykosylace a po deglykosylační reakci s enzymy (PNGáza F, PNGáza A a kombinace obou enzymů).

Negativní kontrola značení (K). V zeleném rámečku s šipkou je vyznačená nespecifická reakce na proteinovém proužku o velikosti přibližně 120 kDa. Červeným rámečkem s šipkou jsou vyznačeny proteiny, které i přes reakci s enzymy zůstaly glykosylovány a značily se dál lektiny. Černé šipky znázorňují reakci na proteinech, které nebyly deglykosylovány, připravené v reakci bez enzymů.



Obr. 19. Lokalizace fukosylovaných proteinů ve SŽ a ve střevě částečně nasátých samic klíštěte *I. ricinus* pomocí lektinu AAL nepřímou fluorescencí.

(A) Specifická reakce byla patrná ve střevních buňkách (SB) a v obsahu střeva (hvězda) Pozitivní reakce značení (šipka) v granulích sekrečních buněk acinů typu III (B), typu II (C, E) a chitinových strukturách tracheol (šipka). Aciny typu I se lektinem AAL neznačili (D). Negativní kontrola (F). Inhibice 0,5 M fukózou (G). Jádra buněk byla barvena DAPI (modrá), AAL afinitní značení (zelená).



4.5. Přítomnost kyseliny sialové v SŽ klíštěte

Kyselina sialová (Neu5Ac) byla detekována v extraktu proteinů SŽ pomocí lektinu *Maackia amurensis* (MAA II), který je specifický k terminální Neu5Ac- α (2,3)Gal/GalNAc. Afinitní značení rozdělených a na membránu přenesených proteinů SŽ odhalilo MAA II specifické proteiny o velikosti kolem 170 kDa, 95 kDa a 55 kDa (obr. 20.). Vazba lektinu MAA II na proteiny slin byla pozitivní pro 95kDa, 110 kDa a 130 kDa proteiny (obr. 20.).

MAA II afinitní chromatografií byl ze SŽE izolován protein o velikosti přibližně 100 kDa (obr. 21., Obr. 22). Tento protein se při dlouhodobém skladování při teplotě -20°C a opakovaném rozmrazování rozpadal na menší, přibližně 70 kDa protein (obr. 22.).

Eluční frakce získaná MAA II afinitní chromatografií byla štěpena enzymy PNGáza F a neuraminidázou izolovanou z bakterie *Vibrio cholerea*. Výsledky deglykosylace byly sledované metodou Western blot a MAA II afinitním značením. Velikost proteinu, který byl inkubován s neuraminidázou se zmenšila o 5–10 kDa a značení lektinem MAA II bylo negativní (obr. 21). Protein se po inkubaci s enzymem PNGáza F zmenšil a značení s lektinem MAA II bylo negativní (obr. 21).

Vyříznutý proužek z akrylamidového gelu s 100 kDa proteinem, který byl získán MAA II afinitní chromatografií, byl podroben Edmanově degradační reakci. Byla zjištěna sekvence N-terminálního konce tohoto izolovaného proteinu XNMERLNFNC, první aminokyselinu touto metodou obvykle nelze identifikovat (X). Porovnáním této sekvence s údaji v databázích jsme našli protein s nejpodobnější sekvencí a byl jím myš protein Siglec 1.

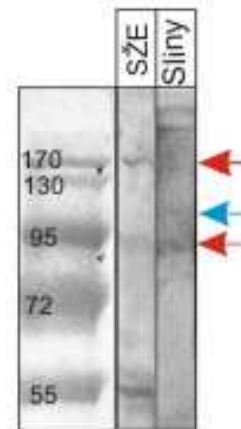
Pro potvrzení, zda se jedná o hostitelský protein Siglec 1, jsem komerčně vyráběnou polyklonální protilátkou proti N-konci proteinu Siglec 1 značila elektroforeticky rozdělené a na membránu přenesené proteiny SŽE. Pozitivní reakce byla detekována u přibližně 70 kDa proteinu, u dvou proteinů o velikosti přibližně 95 kDa a u proteinu přibližně o velikosti 140 kDa (obr. 23.).

Tuto komerční protilátku jsme navázali na kolonu a použili ji k izolaci proteinů afinitní chromatografií. Byl izolován protein o velikosti 90 kDa, který nebyl značen v extraktu SŽ, a protein o velikosti 140 kDa (obr. 23.).

Oba proteiny získané afinitní chromatografií s navázanou protilátkou proti proteinu Siglec 1 nebo MAA II afinitní chromatografií byly zaslány k analýze MS. Výsledky analýz byly zatím negativní.

Obr. 20. Detekce terminální kyseliny sialové v SŽE a slinách částečně nasáté samice klíštěte pomocí afinitního značení lektinem MAA II.

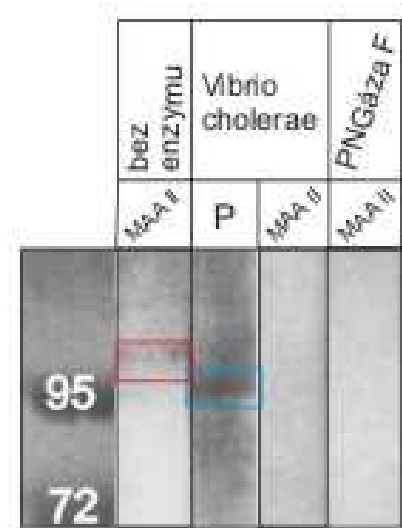
Červenou šipkou jsou označeny proteiny SŽE i slin, které se značí lektinem MAA II. Modrou šipkou je označen 100 kDa protein obsažený ve slinách.



Obr. 21. Detekce terminální kyseliny sialové na proteinech izolovaných pomocí MAA II- afinitní chromatografie .

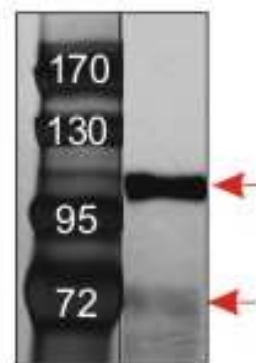
Proteiny eluční frakce byly štěpeny enzymy PNGáza F a neuraminidázou (*Vibrio cholerae*). Detekce proteinů je provedena pomocí afinitního značení lektinem MAA II nebo barvením Protogoldem (P).

Červený rámeček označuje 100 kDa protein, značený lektinem MAA II. Protein nebyl deglykosylován. Po štěpení enzymem neuraminidázou je velikost proteinu menší (barvení Protogoldem, modrý rámeček), a značení lektinem MAA II je negativní. Enzymatická deglykosylace s enzymem PNGáza F změnila také přibližně 100 kDa protein, značení lektinem MAA II bylo také negativní.



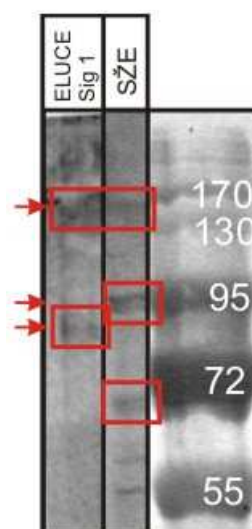
Obr. 22. Proteiny izolované MAA afinitní chromatografií rozdělené v gelu a obarvené stříbrem.

Eluční frakce po delším uchovávání, kromě 100 kDa proteinu se objevuje přibližně 70 kDa protein.



Obr. 23. Značení proteinů SŽE a proteinů izolovaných pomocí afinitní chromatografie s protilátkou proti N-terminálnímu konci proteinu Siglec 1.

Červené šipky označují izolované proteiny z eluční frakce značené protilátkou proti N-terminálnímu konci



5. Diskuze

5.1. Manosylované glykoproteiny

Přítomnost manosylovaných proteinů ve SŽ nasátých i nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* byla nepřímo detekována afinitním značením s lektinem GNA. Byl detekován větší počet GNA specifických proteinů, ale výrazná reakce značení byla u proteinu o přibližné velikosti 120 kDa. Z extraktu SŽ nasáté samice klíštěte jsem pomocí GNA afinitní chromatografie izolovala a značením GNA lektinem potvrdila přítomnost proteinu o velikost přibližně 120 kDa. Tento izolovaný protein byl deglykosylován pomocí enzymu PNGáza F. Velikost proteinu se zmenšila a afinitní značení bylo negativní. Enzym PNGáza F odštěpuje N-glykan od proteinu v případě, že není na P-jádro glykanu navázána α 1,3-fukóza (Tretter a kol. 1991). Získané výsledky ukazují, že izolovaný GNA specifický protein je glykoprotein s N-vázaným glykanem. Lektin GNA specificky váže zejména terminální α 1,3-manózu nejlépe v oligosacharidu Man α 1,3Man (Shibuya a kol. 1988). Enzymatická deglykosylace izolovaného GNA specifického proteinu pomocí α 1,6-manosidázy prokázala, že manóza není vázaná přes vazbu α 1,6-. Předpokládáme tedy její připojení přes vazbu α 1,3- právě v oligosacharidu Man α 1,3Man.. Potvrzení vazby lektinu GNA/Man α 1,3Man glykan jsem provedla negativní kontrolou a inhibiční reakcí s metyl- α -D-manosidem, který je nejlepším inhibítorem vazby Man α 1,3Man (Shibuya a kol. 1988).

V eluční frakci získané GNA afinitní chromatografií byly přítomné další proteiny, které byly detekovány pouze barvením Protogoldem. Tyto proteiny postrádaly afinitu k lektinu GNA. Jde pravděpodobně o fragmenty izolovaného GNA specifického proteinu.

Eluční frakce v roztoku byla analyzována hmotnostní spektrometrií peptidového mapování. Získané sekvence peptidů jsme porovnali s databází a byly přiřazeny k sekvenci karboxypeptidázy M (podtřída N/E) z klíštěte *I. scapularis*. Pokrytí zjištěné sekvence se sekvencí této karboxypeptidázy byla pouze 4 % a identifikovány byly pouze dva peptidy. Velmi přesná fragmentační spektra těchto peptidů a jejich velká shoda se sekvencí karboxypeptidázy M podporují identifikaci purifikovaného proteinu jako karboxypeptidázy M (obr. 10.). Velikost karboxypeptidázy je 28 176 Da, což neodpovídá velikosti nejvýraznějšího proteinu při afinitním značením lektinem GNA (přibližně 120 kDa) Vzorkem pro analýzy byl roztok izolovaných proteinů eluční frakce, z čehož plyne, že MS analýzou mohl být zachycen protein, který afinitním značením nebo barvením Protogoldem nebyl detekován.

Karboxypeptidáza je enzym, který specificky odštěpuje aminokyseliny z C-terminálního konce z peptidů. U klíšťat byly zjištěny různé typy karboxypeptidáz. Přítomnost karboxypeptidázy N byla předpovězena u klíštěte *Ixodes dammini* na základě enzymatické aktivity (Ribeiro a Spielman 1986). Tento enzym inaktivuje farmakologicky aktivní látky, jako jsou anafylotoxin a bradykinin, odštěpováním aminokyselin (Oshima a kol. 1974). Karboxypeptidáza N z klíštěte *I. dammini* zatím nebyla izolována. Karboxypeptidázová aktivita je známá také u proteinu Bm91, který byl nejprve identifikován jako vhodný antigen pro vakcíny ze střeva klíštěte *Boophilus microplus* (Riding a kol. 1994). Kompletní sekvenace genu proteinu Bm91 (Whitfield a kol., Jarney a kol. 1995) ukázala velkou podobnost s karboxypeptidázou savčího typu ACE (Riding a kol. 1994). Jarney a kol. (1995) zkoumali enzymatickou aktivitu proteinu Bm91 a prokázali, že se jedná o karboxypeptidázu ACE. Tento enzym byl v klíštěti lokalizován ve střevě a slinných žlázách a jeho funkce v klíštěti zůstává neznámá. Jarney a kol. (1995) se domnívají, že tento enzym by mohl hrát roli v kontrole peptidů zapojených do fyziologických procesů sání na hostiteli. U klíštěte *Haemaphysalis longicornis* byla ve střevních buňkách identifikována serinová karboxypeptidáza o velikosti 53 kDa (HISCP1; Motobu a kol. 2007). Pokusy s rekombinantní HISCP1 ukázaly, že tento enzym také štěpí hemoglobin a dochází k jeho zvýšené expresi během trávení krve. U klíštěte *I. scapularis* byla potvrzena aktivita kininázy. Kynináza je metaloenzym štěpící najednou dvě aminokyseliny z bradykininu (Ribeiro a Mater 1998). Její přítomnost byla již detekována na základě enzymatických reakcí (Ribeiro a kol. 1985), ale zatím nebyla nijak určena její velikost. Glykosylace karboxypeptidáz, identifikovaných u klíšťat, byly potvrzeny pouze u proteinu Bm91, afinitním značením lektinem *Lens culinaris* (Jarney a kol. 1995). Karboxypeptidáza HISCP1 (Motobu a kol. 2007) obsahuje podle aminokyselinové sekvence tři potencionální místa glykosylace.

U klíštěte *I. scapularis* byly určeny geny pro celou řadu předpokládaných manosyltransferáz (manosyltransferáza 1, GPI manosyltransferáza, β 1,4-manosyltransferáza) a také protein O-manosyltransferáza. Dále byly v cDNA knihovnách klíšťat nalezeny geny pro prekursor α 1,2 manosidázy a α -manosidázy (databáze NCBI) a zjištěna byla také α 2,3-manosyltransferázová aktivita (hypotetický protein). Jejich exprese a funkce jsou u klíšťat zatím neznámé. Přestože funkce glykosylačních enzymů je u klíšťat málo prozkoumaná, několik informací existuje o hmyzích enzimech. Enzym GPI manosyltransferáza (*Drosophila*) se podílí na biosyntéze fosfolipidů a enzym β 1,4-manosyltransferáza (*Drosophila*) ovlivňuje biosyntézu glykosylfosfatidylinositol kotvy-GPI (Swiss-Prot databáze). Manosidázy zpracovávají nově vzniklé N-glykany nebo štěpí zralé glykoproteiny.

Dvě skupiny α -manosidáz se dělí na třídu 1, které jsou specifické z GA a štěpí vazbu 1-2 mezi Man. Třída 2 jsou lysozomální α -manosidázy a hydrolyzují vazby α 1,2-, α 1,3- a α 1,6- (Daniel a kol. 1994). Enzym α 1,2-manosidáza z ER tvoří $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ izomer B z $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, zatímco enzym α 1,2-manosidáza z GA upravuje $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a dává tak vzniknout $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Herscovics 2001).

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) jsme pozorovali přítomnost velkého množství manosylovaných proteinů $\text{Man}\alpha$ 1,3Man v sekrečních buňkách *b* a *c* acinů typu II a v buňkách *f* acinu typu III. Z výsledků vyplývá, že jsou tyto proteiny vylučovány SŽ klíštěte a jsou pravděpodobně i klíštěcího původu. Vazba s lektinem GNA byla také na povrchu acinů III. Inhibiční reakce s metyl- α -D-manosidem byla částečná, lektin GNA se vázal na některých granulích *c* buněk acinu II a v *b* buňkách, kde značení přetrvávalo pouze na periférii granul. Toto by mohlo souviset s větší afinitou k oligosacharidům než k monosacharidům. Přítomnost velkého množství manosylovaných proteinů v sekrečních buňkách byla také prokázána značením lektinem Concanavalin A (Vancová a kol. 2006). Na povrchu acinu typů II a III SŽ byla manóza identifikována pomocí fluorescence také u klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Kamwendo a kol. 1993).

Ve slinných žlázách nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* bylo detekováno větší množství GNA specifických proteinů. Izolovány byly pouze dva proteiny 110 kDa a 130 kDa. Proteiny byly nestabilní a docházelo k jejich postupnému rozpadu. Analýzami MS byly izolované proteiny předběžně identifikovány jako protein podobný arylsulfatáze B z klíštěte *Ixodes* a Sojo protein cytoskeletu klíštěte *Ixodes*. MS spektra identifikovaných peptidů byla nekvalitní a skóre pro tyto proteiny nízké. Tyto výsledky bude nutné ověřit, abychom mohli potvrdit či vyloučit přítomnost těchto proteinů v SŽE nenasátých samic. Arylsulfatáza B identifikována z klíštěte *I. scapularis* (B7PIU9) je hydroláza s aktivitou pro sulfátové zbytky vázané na 4-té pozici sacharidu GalNAc (podle EMBL/GenBank/DDBJ databází, Gene ID 8029592; VectorBase ISCW004093). V AK sekvenci arylsulfatázy A, která je vnitrobuněčným rozřazovacím lysozomálním enzymem, byla nalezena tři potenciální N-glykosylační místa (Gieselmann a kol. 1992).

5.2. Glykoproteiny modifikované N-acetyl-D-galaktosaminem /D-galaktózou

Přítomnost GalNAc/Gal ve slinných žlázách byla zkoumána lektiny specifickými pro GalNAc jako jsou HPA, SBA a DBA. Lektin specifický pro Gal je SBA lektin, který váže

oligosacharid GalNAc α 1,3Gal. Nejlepších výsledků jsme dosáhli pomocí značení lektinem HPA, proto byla provedena HPA afinitní izolace. Afinitním značením extraktu proteinů ŠŽ jsem detekovala protein o velikosti přibližně 85 kDa, ale reakce při značení eluční frakce byla slabá a spíš se značila oblast proteinů o velikostech přibližně 80–95 kDa a 45–65 kDa. Barvením Protogoldem bylo v eluční frakci potvrzeno několik proteinů o velikostech přibližně 85 kDa a 56 kDa, 43 a 40 kDa. Získaná eluční frakce obsahovala nízkou koncentraci proteinů (150 μ g/ml). Vazba glykanu pomocí enzymů nebyla zkoumána.

GalNAc a Gal sacharidy jsou přítomné v komplexních typech N-glykanů, které se u hmyzu vyskytují jen vzácně (März a kol. 1995, Aoki a kol. 2007). zatímco u klíšťat jsou zastoupeny poměrně často (Štěrba a kol., výsledky zatím nepublikovány) GalNAc nebo Gal-GalNAc disacharidy byly identifikované u rekombinantních proteinů hmyzích buněk jako součást O-glykanů (Thomsen a kol. 1990).

Sekvence zjištěná MS analýzou z roztoku proteinů eluční frakce získané HPA afinitní chromatografií byla přiřazena k sekvenci proteinu určeného jako Trappin 12 z morčete (*Cavia porcellus*). Trappin 12 izolovaný z morčete je vylučován sekretorickým epitelem semenných váčků (je androgen-dependentní) a má inhibiční aktivitu proti elastáze leukocytů (Furutani a kol. 2005). U člověka je známý Trappin 2 jinak nazývaný pre-elafin. Je to inhibitor neutrofilních serinových proteáz a vyskytuje se především ve sliznicích (plíce, kůže). Trappin 2 je známý svou antibakteriální a antifungální aktivitou a poskytuje ochranu proti proteázám (Baranger a kol. 2008). Baranger a kol. (2008) se domnívají, že má klíčovou roli v ochraně plic a sliznic člověka před patogenními organismy. Velikost Trappinu 12 je 157 766 Da, což odpovídá velikostně pozorovaným fragmentům izolovaných proteinů. Výskyt asi 30 shodných peptidů v celém spektru sekvence Trappinu naznačuje, že protein Trappin 12 se skutečně nacházel v eluční frakci HPA AF chromatografie, i přesto, že pokrytí sekvence bylo jen 26 %. U Trappinu nebyly pozorovány N- glykosidová místa (Furutani a kol. 2005), to ovšem nevyklučuje přítomnost O-vázaných glykanů obsahujících GalNAc/Gal (Thomsen a kol., 1990).

Přítomnost a aktivita enzymu β 1,4-galaktosyltransferázy, která by potvrdila vlastní syntézu GalNAc a Gal glykoproteinů a potvrdila tak syntézu komplexního typ N-glykanů u hmyzu byla prokázána u hmyzích linií buněk (Abdul-Rahman a kol. 2002). Aktivita enzymu β 1,4GalNAc-transferázy byla také pozorována v buňkách hmyzu (van Die a kol. 1996). Nedávno byla u háďátka *Caenorhabditis elegans* zjištěna aktivita enzymu fukosid β 1,4-galactosyltransferázy, která připojuje β 1,4Gal k α 1,6-fukóze vázané na GlcNAc P-jádra N-glykanu (Titz a kol. 2009). V cDNA klíšťat byly zjištěny geny pro enzymy

galaktosyltransferázu, β 1,3-galaktosyltransferázu, N-acetylgalaktosamin- α -r β 1,3-galaktosyltransferázu a β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferázu jsou u klíštěte *I. scapularis* uvedeny v databázi NCBI.

5.3. Fukosylované glykoproteiny

Fukóza ve slinných žlázách částečně nasátých samic byla zkoumána lektiny AAA, AAL, LTL a UEA I. Tyto lektiny se liší afinitou k různým vazbám fukózy připojené v oligosacharidu (viz kapitola 1.4.4).

Z výsledků značení pomocí lektinů a enzymatické deglykosylace proteinů SŽE pomocí enzymů PNGáza A (štepí všechny typy N-glykanů bez ohledu na Fuc vázanou na P-jádro), PNGáza F (neštepí glykany s α 1,3Fuc vázanou na P-jádro) a jejich kombinací jsme získali informace o vazbě fukózy v glykanech klíštěte. Fukóza by ve většině případů mohla být vázaná vazbou α 1,3- nebo α 1,6- k GlcNAc P-jádra N-glykanu. Fukóza může být přítomna také v anténách N-glykanů vazbou α 1,2- , α 1,3-, ale také vazbou α 1,6- ke GalNAc. Značení s lektinem UEA I bylo nejslabší ze všech použitých lektinů, proto fukóza vázaná α 1,2- vazbou bude u klíšťat méně častá. Pravděpodobně se zde také nachází O-vázaná fukóza, protože deglykosylací enzymem PNGasaA zůstává pozitivní značení s lektiny u proteinu velkém přibližně 45 kDa.

Klíšťata tedy pravděpodobně mají stejně jako hmyz fukózu nejčastěji vázanou α 1,3- vazbou na P-jádro N-glykanu. Fukóza vázaná α 1,3- ke GlcNAc je typickou pro rostliny (Ishihara a kol. 1979), je součástí glykoproteinů včelího jedu (Prenner a kol. 1992), nachází se u parazitických schistosom (Khoo a kol. 2001), ale i u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Hirabayashi a kol. 2002). Fukóza vázaná touto vazbou může vyvolat alergickou reakci (Tretter a kol. 1993). U savců je α 1,3- vázaná fukóza na P-jádro N-glykanů přítomná pouze u některých patologických změn, jako jsou například rakovinné změny buněk plic a tlustého střeva (Becker a Lowe 2003). Pro savce je běžná také vazba α 1,6Fuc na P jádro N-glykanů, tato vazba byla u klíšťat potvrzena MS analýzou (Štěrba, nepublikované výsledky).

Pomocí fluorescenční mikroskopie a vazby lektinů jsme lokalizovali fukózu ve SŽ a střevě částečně nasáté samice klíštěte. Pozitivní výsledky značení se objevily pouze u značení řezů pomocí lektinu AAL. Vazba s lektinem AAL byla pozitivní pravděpodobně kvůli jeho nejširší vazebné specifitě (Kochibe a Furukawa 1980). U ostatních lektinů nebyla prokázána žádná pozitivní reakce. To může znamenat, že se dané glykany na řezech nevyskytují, nebo přítomné glykany jsou na řezech omezeně přístupné pro vazbu s lektinem. Pro zlepšení

přístupu lektinů a enzymů ke glykanům lze použít metodu značení na roztátých kryorezech (viz kapitola 1.4.4.3).

U savců se fukóza α 1,6- připojuje k P-jádru oligomanóзовého typu N-glykanům přes GlcNAc pomocí enzymu GlcNAc-transferáza I (Longmore a Schachter 1982). Fukosylace oligomanóзовého typu N-glykanu u hmyzu však probíhá pomocí specifické fukosyltransferázy, jejíž aktivitu spouští přítomnost tzv. přechodných GlcNAc (Szumilo a kol 1986, Kubelka a kol. 1993). Aktivita fukosyltransferáz byla také zkoumána na motýlích buněčných liniích (Staudacher 1992, Altmann a kol. 1993). Bylo zjištěno připojování fukózy vazbou α 1,6- ke GlcNAc P-jádra. Enzym α 1,3-fukosyltransferáza byl pravděpodobně také přítomen, ale zvolenými metodami nemohla být změřena její aktivita. U glykanů jednoho typu hmyzích buněk bylo pozorováno připojení fukózy vazbou α 1,3- ke GlcNAc, na které již byla vázána α 1,6-fukóza, vznikla tak formace tzv. difukosylovaných glykanů (Kubelka a kol. 1994). Přítomnost difukosylovaných glykanů (Fuc α 1,3- a Fuc α 1,6- připojených ke GlcNAc) byla potvrzena v jedových žlázách včel (Staudacher a kol. 1991). Také u včel musí být přítomná fukosyltransferáza, která je odpovědná za připojení fukózy do antén glykanů fosfolipázy A₂ (Kubelka a kol. 1993).

Fukosylované proteiny se nacházely ve střevních buňkách a střevním obsahu částečně nasátého klíštěte a patrně se tedy jedná o proteiny hostitelského původu. Přítomnost fukózy v granulích sekrečních buněk acinů typu II a III naznačuje produkci vlastních klíštěcích fukosylovaných proteinů. Detailnější lokalizaci v granulích sekrečních buněk acinů typů II a III bude ještě nutno provést pomocí lektin-afinitního značení pozorovaného pomocí TEM.

Geny enzymů fukosyltransferáza, α 1,3-fukosyltransferáza a O-fukosyltransferáza byly určeny u klíštěte *I. scapularis* (databáze NCBI). O-fukosyltransferáza iniciuje připojení fukózy do O-glykosidové vazby (Swiss-Prot databáze).

5.4. Přítomnost kyseliny sialové

Přítomnost kyseliny sialové ve slinných žlázách částečně nasáté samice klíštěte jsme detekovali afinitním značením lektinem MAA II, který je vazebně specifický pro kyselinu sialovou vázanou α 2,3- vazbou ke Gal/GalNAc. Potvrzení vazby kyseliny sialové v glykanu jsme zkoumali enzymatickou deglykolyzací extraktu SŽ a slin enzymy PNGáza F a neuraminidázou izolovanou z bakterie *Vibrio cholerae*. Pomocí MAA II afinitní chromatografie jsme izolovali 100 kDa protein. Analýza tohoto proteinu (přeneseného na PVDF membránu) byla provedena Edmanovou degradací. Získali jsme sekvenci N-

terminálního konce izolovaného proteinu, která naznačila podobnost s lidským/myším sialoadhesinem (Siglec 1). Izolovaný MAA II specifický protein je tedy pravděpodobně hostitelského původu. Ke zjištění proteinu Siglec 1 přímo v extraktu SŽ jsme použili značení na membránách pomocí komerční polyklonální protilátky proti N-konci proteinu Siglec 1. Touto protilátkou proti N-terminálnímu konci Siglec 1 jsme v SŽ detekovali přibližně stejně velké proteiny (obr. 23). Protein Siglec 1 je lektin, které rozpoznává α 2,3- vázanou kyselinu sialovou ke Gal/GalNAc a zprostředkovává mezibuněčné interakce v lymfatických tkáních. Siglec 1 je hlavní membránovou molekulou makrofágů a účastní se jejich mezibuněčné interakce s dalšími buňkami (Crocker a kol. 1994). Afinity chromatografií s použitím protilátky proti N-terminálnímu konci Siglec 1 jsme opakovaně izolovali ze SŽ ve velmi malém množství (100 μ l o koncentraci 100 μ g/ml) proteiny o velikostech 90–100 kDa, 60–65 kDa a 130–140 kDa ze SŽ. Prozatím nám získané výsledky z MS neumožnily potvrdit ani vyvrátit přítomnost Siglec 1. Tento výsledek může být způsoben malým pokrytím morčecích proteinů v dostupných databázích, a bude proto nutné tyto vzorky znovu analyzovat citlivějšími metodami (FT-MS). Pro ověření, zda se opravdu jedná o hostitelský protein z morčete, se pokusíme izolovat Siglec 1 z celé krve morčete. Negativní výsledky analýz metodou PMF byly obdrženy pravděpodobně z důvodu získání malého množství eluční frakce s nízkou koncentrací proteinů.

Přítomnost kyseliny sialové u hmyzu je sporným tématem. Mnohé studie potvrzují nejenom přítomnost kyseliny sialové, ale také její endogenní syntézu u hmyzu. Roth a kol. (1992) detekoval α 2,8- polysialovou kyselinu u larev mouchy *Drosophila*. Pomocí přímých (MS) a nepřímých metod (značení lektiny) byla prokázána kyselina sialová i u larev cikády *Philaenus spumarius* (Malykh a kol. 1999). Watanabe a kol. se zabývali možností použití pro výrobu rekombinantních sialovaných glykoproteinů systém hmyzí buňky-baculovirus. Bylo prokázáno, že β -N-acetylglukosaminidáza hmyzích buněk způsobuje odstranění zbytků GlcNAc z N-glykanového prekurzoru, a tak zabraňuje galaktosylaci a terminální sializaci glykoproteinů. Použitím systému hmyzí buňky-baculovirus k získání rekombinantního proteinu v přítomnosti inhibitoru pro enzym β -N-acetylglukosaminidáza byla obnovena schopnost vytvořit sialyzovaný N-glykan savčího typu. Snížení či zrušení aktivity tohoto enzymu může umožnit schopnost hmyzích buněk produkovat rekombinantní glykoproteiny modifikované N-glykany savčího typu (Watanabe a kol. 2002). Syntéza kyseliny sialové u hmyzu byla potvrzena přítomností genu pro sialyltransferázu v cDNA mouchy *Drosophila* (Koles a kol. 2004), z kterého byl připraven rekombinantní protein s potvrzenou aktivitou sialyltransferázy (Koles a kol. 2007). V klíštěti *I. scapularis* byl určen gen pro předpokládaný

enzym CMP-N-acetylneuraminát- β galaktosid- α 2,3-sialyltransferáza (databáze NCBI, ISCW018738). Tato sialyltransferáza by mohla být zodpovědná za syntézu NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc, která se nalézá v oligosacharidových řetězcích O-vázaných glykanů a také jako terminální sekvence na některých gangliosidech (Swiss-Prot databáze). U sanců má tento enzym širokou specifiku a může modifikovat glykoproteiny a glykolipidy kyselinou sialovou nezávisle na předchozích /výchozích strukturách (Zuber a Roth 2009).

6. Závěr

Cílem této práce bylo izolovat glykoproteiny ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus* na základě jejich specifity k vybraným lektinům, charakterizovat je biochemickými metodami (SDS-PAGE, „Western blot“, enzymatické deglykosylace), připravit z nich vzorky pro analýzu MS a detekovat je v tkáních klíštěte.

Lektinem GNA jsem detekovala manosylované proteiny v SŽ částečně nasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Pomocí GNA afinitní chromatografie jsem izolovala glykoproteiny s dominantním glykoproteinem o velikosti 120 kDa. U tohoto glykoproteinu bylo určeno připojení glykanu N- glykosidovou vazbou. Terminální manóza byla v sacharidu připojena pravděpodobně α 1,3- vazbou. Glykoprotein byl nestabilní a rozpadal se. V roztoku eluční frakce získané GNA afinitní chromatografií byla MS analýzou zjištěna karboxypeptidáza M (podtřída N/E). Bylo lokalizováno velké množství pravděpodobně klíštěcích manosylovaných proteinů v sekrečních buňkách *b* a *c* acinů typu II a buněk *f* acinu typu III a na povrchu acinu typu III SŽ částečně nasáté samice klíštěte.

Z nenasátých SŽ samic klíštěte jsem izolovala dva glykoproteiny o velikosti 110 a 130 kDa, specifické pro značení GNA lektinem. I v tomto případě byly proteiny nestabilní a docházelo k postupnému rozpadu. V eluční frakci GNA afinitní chromatografie byly identifikovány proteiny jako arylsulfatáza B a Sojo protein cytoskeletu klíštěte *Ixodes*. Tyto výsledky bude nutné potvrdit. Manosylované proteiny byly také lokalizované v sekrečních buňkách v acinech typu II a III SŽ nenasáté samice. Jsou to tedy glykoproteiny pravděpodobně sekretované klíštětem.

Dva glykoproteiny o velikosti 85 a 56 kDa obsahující GalNAc byly získány ze SŽ částečně nasáté samice klíštěte HPA afinitní chromatografií. Značení těchto proteinů bylo negativní, ale byly detekovány barvením Protogoldem. V roztoku eluční frakce byl MS analýzou identifikován morčecí protein Trappin 12. Trappin postrádá N-glykosylační místa, proto lze předpokládat, že tento glykoprotein je modifikován O-glykany.

Metodou afinitního značení lektiny AAA, AAL, UEA I a LTL a enzymatickou deglykosylací byla v proteinech SŽ nasáté samice klíštěte detekována fukóza, která by mohla být vázána vazbou α 1,2-; α 1,3- a α 1,6- v anténách oligosacharidu nebo vazbou α 1,3- a α 1,6- na GlcNAc P-jádra N-glykanu. Fukóza vázaná přes O-glykosidovou vazbu se také pravděpodobně nachází v glykoproteinech SŽ samice klíšťat. Potvrdili jsme přítomnost fukosylovaných proteinů sekretovaných klíštětem v granulích sekrečních buněk acinů typu II

a III SŽ pomocí fluorescenčního značení s lektinem AAL. Ve střevních buňkách a v obsahu střeva klíštěte jsme detekovali také fukosylované proteiny hostitelského původu.

Přítomnost kyseliny sialové v glykoproteinech SŽ a slinách nasáté samice klíště byla nepřímo prokázána vazbou s MAA II lektinem. Podle N-terminální sekvence izolovaného MAA II specifického proteinu (100 kDa) získané Edmanovou degradací byl tento protein určen jako sialoadhesin (Siglec 1) z myši (*Mus musculus*). Afinitní chromatografii s použitím protilátky proti N-terminálnímu konci Siglec 1 byly z SŽE opakovaně izolovány jen velmi nízké koncentrace proteinů (100 µg/ml). Zastoupené proteiny byly o velikostech 90–100 kDa, 60–65 kDa a 130–140 kDa identifikovány pomocí afinitního značení protilátkou proti N-konci proteinu Siglec 1. Dosavadní výsledky MS analýz v elučních frakcích zatím nepotvrdily ani nevyvrátily přítomnost kyseliny sialové a proteinu Siglec 1 v SŽ nasátých klíšťat.

Dokázala jsem přítomnost glykosylovaných proteinů ve slinných žlázách samic klíštěte *I. ricinus*, nejen hostitelského původu, ale také klíštěcího (mannosylované a fukosylované glykoproteiny, karboxypeptidáza M). Manosylované proteiny jsou hojně sekretovány ve SŽ, stejně jako fukosylované proteiny.

7. Literatura

- Abdul-Rahman B, Ailor E, Jarvis http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TFF-46RV9GN-7&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1155410146&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3ef55c262075ab48fa0d79eb3f9da464 - aff3 D, Betenbaugh M, Lee LC (2002) β -(1 \rightarrow 4)-Galactosyltransferase activity in native and engineered insect cells measured with time-resolved europium fluorescence. *Carbohydrate Research* 337:2181–2186
- Altmann F, Fabini G, Ahorn H, Wilson IB (2001) Genetic model organisms in the study of N-glycans. *Biochimie* 83:703–712
- Altmann F, Kornfeld G, Dalik T, Staudacher E, Glössl J (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology* 3:619–25
- Altmann F, Schweiszer S, Weber C (1995) Kinetic comparison of peptide: N-glycosidases F and A reveals several differences in substrate specificity. *Glycoconjugate Journal* 12:84–93
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH, März L (1999) Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* 16:109–123
- Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase PW, Rincón M, Kantor FS, Fikrig E (2002) Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16:849–859
- Aoki K, Perlman M, Lim J-M, Cantu R, Wells L, Tiemeyer M (2007) Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Journal of biological chemistry* 282:9127–9142

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database¹. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473:4–8

Balashov YS (1967) Bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of disease in man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 8:161–376. překlad z Ruštiny

Baranger K, Zani ML, Chandener J, Dallet-Choisy S, Moreau T (2008) The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *The FEBS Journal* 275:2008–20

Barker DM, Ownby CL, Krolak JM, Claypool PL, Bauer JR (1984) The effects of attachment, feeding and mating on the morphology of the type I alveolus of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Journal of Parasitology* 70: 99–113

Barondes SH (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem Sci.* 13:480–2

Becker DJ, Lowe JB (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:41R–53R

Bergman DK, Palmer MJ, Caimano MJ, Radolf JD, Wikel SK (2000) Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermaacentor andersoni* salivary gland. *Journal of Parasitology* 86:516–525

Bianchet MA Odom EW, Vasta GR, Amzel LM (2002) A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nature Structural Biology* 9:628–634

Binington KC, Kemp DH (1980) Role of Tick Salivary Glands in Feeding and Disease Transmission. *Advances in parasitology* 18:315–339

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99

Bowman AS, Sauer JR (2004) Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 129: S67–S81.

Boyd W (1963) The Lectins: Their Present Status. *Vox Sanguinis* 8:1–32

Bozola JJ, Russell LD (1992) *Elektron microscopy: principles and techniques for biologists*. Bartlett Publisher, Inc. 2.vydání

Buskas T, Ingale S, Boons GJ (2006) Glycopeptides as versatile tool for glycobiology. *Glycobiology* 16:113R–136R

Carlemalm E, Garavito RM and Villiger W (1982) Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *Journal of Microscopy* (Oxford) 126:123–143

Conzelmann E, Sandhoff K (1987) Glycolipid and glycoprotein degradation. *Advances in enzymology* 60:89–216

Crocker PR, Mucklow S, Bouckson V, McWilliam A, Willis AC, Gordon S, Milon G, Kelm S, Bradfield P (1994) Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains. *The EMBO Journal* 13:4490–503

Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61:636–643

Cummings RD (1994) Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods in Enzymology* 230:66–86

Daniel M, Danielová V, Kříž B, Kott I (2004) An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology* 293:55–62

Daniel PF, Winchester B, Warren CD (1994) Mammalian {alpha}-mannosidases--multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* 4:551–566

Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Pal U, Wolgemuth CW, Eggers CH, Balic A, Radolf JD (2009) Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within tick. *The Journal of Clinical Investigation* 119:3652–3665

Dwek RA (1996) *Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars*. *Chemical Reviews* 96:683–720

Edman P (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Archives of Biochemistry* 22:475

El Hakim AE, Shahein YE, Abouelella AM, Selim ME (2007) Purification and characteristics of two larval glycoproteins from cattle tick, *Boophilus annulatus*. *Journal of Veterinary Science* 8:175–180

Endo T (1999) O-Mannosyl glycans in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1473(1), 237–246.

Endo T (2004) Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconjugate Journal* 21:3–7

Etzler ME, Gupta S, Borrebaeck C (1981) Carbohydrate binding properties of the Dolichos biflorus lectin and its subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 256:2367–2370

Feldman-Musham B, Borut S, Saliternik-Givant S (1970) Salivary secretion of the male tick during copulation. *Journal of Insect Physiology* 16:1945–1949

Fernandes JG, Sanchez AJ, Melcon C, Chamorro CA, Garcia C, Paz P (1994) Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. *Journal of Anatomy* 184:137–145

Flory LL (1966) Differences in the H Antigen on Human Buccal Cells from Secretor and Non-Secretor Individuals. *Vox Sanguinis* 11:137–156

Francischetti IM, Valenzuela JG, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM (2002) Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology* 205:2429–2451

Francischetti IM, Mans BJ, Meng Z, Gudderra N, Veenstra TD, Pham VM, Ribeiro JM (2008) An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:1–21

Furutani Y, Kato A, Fibriani A, Hirata T, Kawai R, Jeon JH, Fujii Y, Kim IG, Kojima S, Hirose S (2005) Identification, evolution, and regulation of expression of Guinea pig trappin with an unusually long transglutaminase substrate domain. *The Journal of biological chemistry* 280:20204–15

Geyer H, Geyer R (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764:1853–1869

Gieselmann V, Schmidt B, von Figura K (1992) In vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites of arylsulfatase A. Effects on glycosylation, phosphorylation, and intracellular sorting. *Journal of Biological Chemistry* 267: 13262–13266

Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE (1965) Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. *Biochemistry* 4:876–883

Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N (1980) What should be called a lectin? *Nature* 285:66

Görg A, Postel W, Gunther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9:531–546

Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2009, ID 593232, 12 stran. doi:10.1155/2009/593232

Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T (2005) O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:765–774

Gutternigg M, Ahrer K, Grebher-Meier H, Bürgmayr S, Staudacher E (2004) Neutral N-glycans of the gastropod *Arion lusitanius*. *European Journal of Biochemistry* 271:1348–1356

Hammaström S, Westöö A, Björk I (1972) Subunit Structure of Helix pomatia A Hemagglutinin. *Scandinavian Journal of Immunology* 1:295–309

Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM, Bowman AS (2004) Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* 113:401–8

Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies : a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory

Haselhorst T, Weimar T, Peters T (2001) Molecular recognition of sialyl Lewis(x) and related saccharides by two lectins. *Journal of the American Chemical Society* 123:10705–10714

Herscovics A (2001) Structure and function of Class I [α]1-2mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie* 83:757–762

Hirabayashi J, Hayama K, Kaji H, Isobe T, Kasai K (2002) Affinity capturing and gene assignment of soluble glycoproteins produced by the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The journal of biochemistry* 132:103–14

Honda S, Kashiwagi M, Miyamoto K, Takei Y, Virose S (2000) Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine nature of eel Fucose-binding lectins. *Journal of Biological Chemistry* 275:33151–33157

Hovius JW, Levi M, Fikrig E (2008) Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. *PLoS medicine* 5:43

Ishihara H, Takahashi N, Oguri S, Tejima S (1979) Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. An application of the almond glycopeptidase for structural studies of glycopeptides. *The Journal of Biological Chemistry* 254:10715–10719

Ishiyama I, Uhlenbruck G (1971) On the nature of the anti-dextran activity of the *Helix pomatia* "anti A" agglutinin. *Zeitschrift fur naturforschung* 266:1198–1199

Jarmey JM, Riding GA, Pearson RD, McKenna RV, Willadsen P (1995) Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: A "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25:969–974

Kamwendo SP, Ingram GA, Musisi FL, Trees AJ, Molyneux DH (1993) Characteristics of tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, glands distinguished by surface lectin binding. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87:525–35

Khoo KH, Huang HH, Lee KM (2001) Characteristic structural features of schistosome cercarial *N*-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* 11:149–163

Kim K, Lawrence SM, Park J, Pitts L, Vann WF, Betenbaugh MJ, Palter KB (2002) Expression of a functional *Drosophila melanogaster* N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) phosphate synthase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects. *Glycobiology* 12:73–83

Kochibe N, Furukawa K (1982) *Aleuria aurantia* hemagglutinin. *Methods in Enzymology*, 83:373–377

Kochibe N, Furukawa K (1980) Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of *Aleuria aurantia*. *Biochemistry* 19:2841–6

Kocourek J, Hořejší V (1981) Defining a lecithin. *Nature* 290:188

Koles K, Irvine KD, Panin VM (2004) Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 279:4346–57

Koles K, Lim JM, Aoki K, Porterfield M, Tiemeyer M, Wells L, Panin V (2007) Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Glycobiology* 17:1388–403

Krolak JM, Ownby CL, Bauer JR (1982). Alveolar structure of salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.): unfed females. *Journal of Parasitology* 68:61–82

Kubelka V, Altmann F, Kornfeld G, März L (1994) Structures of the N-Linked Oligosaccharides of the Membrane Glycoproteins from Three Lepidopteran Cell Lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308:148–157

Kubelka V, Altmann F, Staudacher E, Tretter V, März L, Hård K, Kamerling JP, Vliegenthart JF (1993) Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2. *European Journal of Biochemistry* 213:1193–204

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685

Lawrie CH, Nuttall PA (2001) Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. *Parasite Immunology* 23:549–556

Lescar J, Sanchez JF, Audfray A, Coll JL, Breton C, Mitchell EP, Imberty A (2007) Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by *Helix pomatia* lectin. *Glycobiology* 17:1077–1083

Liebler DC (2002) Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Humana Press Inc, Totowa, NJ

Lis H, Sharon N (1993) Protein glycosylation. *European Journal of Biochemistry* 218:1–27

Liu X, McNally DJ, Nothaft H, Szymanski CM, Brisson JR, Li <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac060516m> - [ac060516mAF1](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac060516mAF1) J (2006) Mass Spectrometry–Based Glycomics Strategy for Exploring N-Linked Glycosylation in Eukaryotes and Bacteria. *Analytical Chemistry* 78:6081–6087

Loo JA (2000) Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* 200:175–186.

Longmore GD, Schachter H (1982) Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose:2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucoside (FUC goes to Asn-linked GlcNAc) 6-alpha-L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver. *Carbohydrate Research* 100:365–92

Lowe CR (1996) Affinity Chromatography and Related Techniques: Perspectives and Trends. *Advances in Molecular and Cell Biology* 15:513–522

Ma B, Simala–Grant JL, Taylor DE (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes, *Glycobiology* 16:158R–184R

Malykh YN, Krisch B, Gerardy-Schahn R, Lapina EB, Shaw L, Schauer R (1999) The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconjugate journal* 16:731–9

Man P, Kovár V, Sterba J, Strohalm M, Kavan D, Kopáček P, Grubhoffer L, Havlíček V (2008) Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 14:345–54

März L, Altmann F, Staudacher E, Kubelka V (1995) Protein Glycosylation in Insects. In: Montreuil J, Schachter H, Vliegenthart JFG (eds). *Glycoproteins*. Elsevier Science, Amsterdam Vol. 3, pp 543–563

McSwain JL, Essenberg RC, Sauer JR (1982) Protein changes in the salivary glands of the female lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *The Journal of Parasitology* 68: 100–106

Montreuil J (1980) Primary structure of glycoprotein glycans. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry* 37:157–223

Morgan WTJ, Watkins WM (1953). The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *British Journal of Experimental Pathology* 34:94–103

Motobu M, Tsuji N, Miyoshi T, Huang X, Islam MK, Alim MA, Fujisaki K (2007) Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *The FEBS Journal* 274:3299–312

Mulder H, Dideberg F, Schachter H, Spronk BA, De Jong-Brink M, Kamerling JP, Vliegthart JFG (1995) In the biosynthesis of N-glycans in connective tissue of the snail *Lymnaea stagnalis* of incorporation GlcNAc by b2GlcNAc-transferase I is an essential prerequisite for the action of bGlcNAc-transferase II and b2Xyl-transferase. *European journal of biochemistry* 232:272–283

Nuttall PA (1999) Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 289: 492–505.

O'Neill RA (1996) Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis. *Journal of Chromatography A* 720:201–215

Oshima G, Kato J, Erdös EG (1974) Subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I; anaphylatoxin inactivator). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 365: 344–348

Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E (2004) OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation* 113:220–230

Parker GF, Williams PJ, Butters TD, Roberts DB (1991) Detection of the lipid-linked precursor oligosaccharide of N-linked protein glycosylation in *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters 290:58–60.

Pereira MEA, Kabat EA, Sharon N (1974) Immunochemical studies on the specificity of soybean agglutinin. Carbohydrate Research 37:89–102

Pereira MEA, Kisailus EC, Gruezo F, Kabat EA (1978) Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin 1 from *Ulex europeus* seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics 185:108–15

Piller V, Piller F, Cartron J (1990) Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. European Journal of Biochemistry 191:461–466

Prenner C, Mach L, Glössl J, März L (1992) The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1-3fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine. The Biochemical journal 284:377–80

Regoli D, Barabe J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. Pharmacological Reviews 32:1–46

Reisner Y, Itzicovitch L, Meschorer A, Sharon N (1978) Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75:2933–2936

Ribeiro JMC, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IMB, Mans BJ, Mater TN, Valenzuela JG, Wikel SK (2006) An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* tick. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36:111–129

Ribeiro JMC, Francischetti IM (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual review of entomology* 48:73–88

Ribeiro JMC, Makoul G, Levine J, Robinson D, Spielman A (1985) Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of Experimental Medicine* 161:332–344

Ribeiro JMC, Makoul G, Robinson D (1988) *Ixodes dammini*: Evidence for salivary prostacyclin secretion. *Journal for Parasitol.* 74:1068–1069

Ribeiro JMC, Mather TN (1998) *Ixodes scapularis*: Salivary Kininase Activity is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. *Experimental Parasitology* 89:213–221

Ribeiro JM, Spielman A (1986) *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental Parasitology* 62:292–297

Riding GA, Jarney J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P (1994) A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology* 153:5158–5166

Righetti PG, Gelfi C (1983) Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. II. A case report. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 8:157–172.

Roseman S (2001) Reflections on glycobiology. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 1527–41542

Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256: 673–675

Schäffer C, Dietrich K, Unger B, Scheberl A, Rainey FA, Köhlig H, Messner P (2000) A novel type of carbohydrate-protein linkage region of the tyrosine-bound S-layer glycan of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* D120-70. *European Journal of Biochemistry* **267**: 5482–5492

Schumacher U, Adam E (1997) Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *The Histochemical Journal* 29: 677–684

Schumacher U, Mitchell BS, Brooks SA, Delpech B, Leathem AJ (1996) Does the lectin *Helix pomatia* agglutinin bind to hyaluronic acid in breast and colon cancer? *Acta Histochemica* 98: 435–440

Sharon N, Lis H (2003) *Lectins*. Springer. Netherlands

Shibuya N, Berry JE, Goldstein IJ (1988) One-step purification of murine IgM and human alpha 2-macroglobulin by affinity chromatography on immobilized snowdrop bulb lectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267:676–680

Shibuya N, Goldstein IJ, Van Damme EJ, Peumans WJ (1988) Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *The Journal of Biological Chemistry* 263:728–734

Sonenshine DE (1991) *Biology of ticks*, volumes 1,2. Oxford University Press, New York.

Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12:43–56

Spiro RG (1973) Glycoproteins. *Advances in Protein Chemistry* 27:349–467

Springer GF, Desai PR (1971) Monosaccharides as specific precipitinogens of eel anti-human blood-group H(O) antibody. *Biochemistry* 10:3749–3761

Staudacher E, Kubelka V, März L (1992) Distinct N-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *European Journal of Biochemistry* 207:987–93

Staudacher E, Altmann F, Glössl J, März L, Schachter H, Kamerling JP, Hård K, Vliegthart JF (1991) GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to (Fuc alpha 1-6GlcNAc)-Asn-peptide)alpha 1-3-fucosyltransferase activity in honeybee (*Apis mellifica*) venom glands. *The*

difucosylation of asparagine-bound N-acetylglucosamine. *European Journal of Biochemistry* 199:745–751

Steen NA, Barker SC, Alewood PF (2006) Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks) Pharmacological features and biological significance. *Toxicon* 47:1–20

Szumilo T, Kaushal GP, Elbein AD (1986) Demonstration of GlcNAc transferase I in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134:1395–403

Tatchell RJ (1967) A modified Method for obtaining tick oral secretion. *Journal of Parasitology* 53:1106–1107

Taylor ME, Drickamer K (2003) *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press Inc, New York

Thomsen DR, Post LE, Elhammer AP (1990) Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *Journal of Cellular Biochemistry* 43:67–79

Titz A, Butschi A, Henrissat B, Fan YY, Hennet T, Razzazi-Fazeli E, Hengartner MO, Wilson IB, Künzler M, Aebi M (2009) Molecular basis for galactosylation of core fucose residues in invertebrates: identification of *Caenorhabditis elegans* N-glycan core alpha1-6fucoside beta1,4-galactosyltransferase GALT-1 as a member of a novel glycosyltransferase family. *Journal of Biological Chemistry* 284:36223–33

Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *Journal of Cell Biology* 57:551–65

Towbin H, Staehelin J, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 76:4350–4354

Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker WM (1993) Fucose alpha 1-3 linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *International Archives of Allergy and Immunology* 102:259–266

Tretter V, Altmann F, März L (1991) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European journal of biochemistry* 199:647–52

Uhlíř J, Grubhoffer L, Borský I, Dusbábek F (1994) Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology* 8:141–150

Valenzuela JG (2002) Exploring the messages of the salivary glands of *Ixodes ricinus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66:223–224

Valenzuela JG, Charlab R, Mater TN, Ribeiro JMC (2000) Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scaluparis*. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:18717–18723

Vancová M, Zacharovová K, Grubhoffer L, Nebesárová J (2006) Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *Journal of Parasitology* 92:431–440

van Damme EJ, Allen AK, Peumans WJ (1987) Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Letters*, 215:140–144

van Die I, van Tetering A, Bakker H, van den Eijnden DH, Joziase DH (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a beta 1-->4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology* 6:157–64

Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97–130

Varki A, Sharon N (2009) Historical Background and Overview in Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME eds. Essentials of Glycobiology. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California

Varki NM, Varki A (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation* 87:851–857

Watanabe S, Kokuho T, Takahashi H, Takahashi M, Kubota T, Inumaru S (2002) Sialylation of N-glycans on the recombinant proteins expressed by a baculovirus-insect cell system under beta-N-acetylglucosaminidase inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 5090–5093

Wheeler CM, Coleman JL, Benach JL (1991) Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity. *Journal of Parasitology* 77: 965–73

Whitfield P. L., Johnson M. C., Smith D. R. J., Snelson V. J., Clifton G. F., Brown G. S., Cairns D., Irving D. O. and Cobon G. S. cit. v Jarney a kol. 1995

Wikel SK (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology* 29:851–859

Wilson IB (2003) Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 13:141

Yamamoto K, Konami Y, Irimura T (1997) Sialic Acid-Binding Motif of *Maackia amurensis* Lectins. *Journal of Biochemistry* 121:756–761

Yan L, Wilkins PP, Alvarez-Manilla G, Do SI, Smith DF, Cummings RD (1997) Immobilized *Lotus tetragonolobus* agglutinin binds oligosaccharides containing the Lex determinant. *Glycoconjugate Journal* 14: 45–55

Zuber C., Roth J (2009) N-glycosylation. In: The sugar code. Ed.by Gabius H.J. Wiley-Vch Verlag. p. 87–110.