

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Purifikace hemlipoglykoproteinu z hemolymfy klíštěte
Dermacentor marginatus

Bakalářská práce

Rita Urbanová

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitelé specialisté: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., RNDr. Jarmila Dupejová

České Budějovice 2012

Bakalářská práce

Urbanová, R., 2012: Purifikace hemlipoglykoproteinů z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus*. [Purification of hemlipoglycoprotein from hemolymph of the tick *Dermacentor marginatus*. BSc. Thesis, in Czech.] 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of the study was the purification of hemlipoglycoprotein, a carrier protein from hemolymph of the tick *Dermacentor marginatus*. The protein was purified in native form and also as a denatured protein from a SDS-PAGE gel, which was refolded. The purified protein was studied by surface plasmon resonance and circular dichroism.

Financování:

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: MSM 6007665801, LC06009, Grantová agentura AVČR: KJB600960906, Studentská grantová agentura PŘF JU: SGA2008/017, SGA2009/017

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 5.12.2012

.....

Rita Urbanová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Janku Štěrbovi, za to, že mě vzal do svého týmu, poodhalil mi tajemný závoj biochemie i kouzlo práce na vlastním výzkumu a pomáhal mi přes všechna úskalí pokusů moudrou radou i pomocí. Velký dík patří i panu profesoru Liboru Grubhofferovi, Jarce Dupejové a všem z laborky 327 za trpělivé zodpovídání mých dotazů, ochotu a veselé přátelské prostředí. Děkuji doc. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D., Mgr. L. Malinovské, Ph.D. a Mgr. P. Rozumové z Národního centra pro výzkum biomakromolekul (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno) za pomoc při analýze mých vzorků a Janu Erhartovi z Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. za poskytnutí klíčů.

Mami a tati, dík, že jste při mně stáli a pomáhali mi ve studiu. Děkuji tobě Ríšo, že tu jsi vždy, když tě potřebuji a když je mi nejvíc smutno, dokážeš mě rozesmát. Rozárko a Pavlíku, jste a navždy budete mí nejmilejší sourozenci. A děkuji vám všem, moji kamarádi, kteří se mi dáváte radost z každého dne.

Bez vás všech by tato práce asi nikdy nevznikla, děkuji, že vás mám.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1. Klíšťata.....	3
3.1.1. <i>Dermacentor marginatus</i>	3
3.1.2. Sání klíšťat a jejich sliny.....	4
3.1.3. Hemolymfa klíšťat	5
3.2. Imunitní systém členovců.....	6
3.2.1. Imunitní systém klíšťat.....	6
3.3. Lektiny.....	7
3.3.1. Fibrinogenu podobné proteiny (FReP).....	8
3.3.1.1 Hemlipoglykoprotein (HLGP).....	8
4. MATERIÁL A METODY.....	9
4.1. Složení roztoků a pufrů.....	9
4.2. Odebírání hemolymfy.....	10
4.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	11
4.4. Imunoblotting.....	11
4.5. Barvení polyakrylamidového gelu barvivem Page Blue.....	12
4.6. Elektroeluce.....	12
4.7. Refolding.....	13
4.8. Imunoprecipitace.....	14
4.9. Barvení stříbrem.....	14
4.10. Povrchová rezonance plasmonu (SPR).....	15
4.11. Cirkulární dichroismus (CD).....	16
5. VÝSLEDKY.....	17
5.1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	17
5.2. Imunoblotting.....	18
5.3. Elektroeluce.....	19
5.4. Refolding.....	20
5.5. Imunoprecipitace.....	20
5.6. Povrchová rezonance plasmonu.....	21
5.7. Cirkulární dichroismus	22
6. DISKUSE.....	24
7. ZÁVĚR.....	26
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	27
9. SEZNAM LITERATURY.....	28

1. ÚVOD

Klíšťata patří, spolu s komáry, mezi nejvýznamější přenašeče patogenů napadajících zvířata i člověka, ale molekuly rozpoznávající patogeny a mechanismus jejich přenosu nejsou stále plně vysvětleny.

Hemlipoglykoprotein (HLGP), identifikovaný v klíštěti *D. marginatus*, patří pravděpodobně do skupiny lektinů. Po nasátí klíštěte váže a transportuje hem. Ačkoli samci sají méně krve než samice, obsah HLGP v jejich hemolymfě je srovnatelný. Je tedy pravděpodobné, že v organismu zastává i jiné důležité funkce. Zjistilo se například, že je schopen vázat sacharidy. Abychom objasnili veškeré jeho funkce, je nutné určit jeho strukturu.

Cílem mé bakalářské práce bylo izolovat HLGP v nativním i denaturovaném stavu. Denaturovaný protein byl před další analýzou refoldován. Následně jsem se podílela i na jeho biochemické charakterizaci pomocí povrchové rezonance plasmonu a cirkulárního dichroismu.

2. CÍLE PRÁCE

- purifikace hemlipoglykoproteinů z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus* elektroelucí z polyakrylamidového gelu
- purifikace hemlipoglykoproteinů z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus* imunoprecipitací
- příprava hemlipoglykoproteinů pro jeho další biochemickou charakterizaci

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Klíšťata

Klíšťata řadíme mezi významné roztoče patřící do kmene členovců (*Arthropoda*), podkmene klepítkatců (*Chelicerata*), třídy pavoukoců (*Arachnida*). Řád roztoči (*Acarina*) zahrnuje 5 podřádů včetně klíšťat (*Ixodida*). *Ixodida* dělíme na 3 čeledi: *Ixodidae* (720 druhů, zařazených do 13 rodů – např. *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*,...), *Argasidae* (186 druhů v 5 rodech – např. *Argas*, *Antricola*, *Otobius*,...) a *Nuttalliellidae* (jedinný rod - *Nuttalliella*) (Ruppert, Barnes, 1994; Sonenshine, 1991).

Čeď *Ixodidae* se vyznačuje tvrdým štítkem, který pokrývá celý hřbet samců, u samic dosahuje zhruba do jedné třetiny. Jsou to ektoparazité obojživelníků, plazů, ptáků a savců, včetně člověka. Po 2-6 týdenní inkubační době se z vajíčka líhne šestinohá larva, která se mění v osminohou nymfu a ta posléze v imago. Dospělí samci již nepřijímají potravu a umírají po kopulaci, samice po naklazení vajíček. Během svého životního cyklu vystřídají jednoho až tři hostitele. Jejich ústní ústrojí jsou uzpůsobena k zachycení se na hostiteli a sání krve. Výskyt klíšťat je vázán na přítomnost vhodného hostitele, žijí především v lesích, křovinách a okolí řek (Ruppert, Barnes, 1994).

Klíšťata jsou přenašeči závažných patogenů. Kromě nejznámějšího viru klíšťové encefalitidy (čeď *Flaviridae*) a spirochety *Borrelia burgdorferi* přenáší i horečku skalistých hor, tularémii, texaskou horečku dobytka, theileriózu, babeziózu, Q horečku, erlichiózu a další (Ruppert, Barnes, 1994; Sonenshine, 1991; Sonenshine, 1993). Klíšťovou encefalitidu posal již v roce 1931 rakouský lékař H. Schneider, o 6 let později prokázal L. A. Zilber, že se jedná o virus přenášený klíštětem (Dumpis *et al.*, 1999). *B. burgdorferi* z čeledi *Treponematacea* identifikoval poprvé tým Dr. W. Burgdorfera roku 1982 v klíštěti *Ixodes dammini* (nyní nazývaném *I. scapularis*) (Burgdorfer *et al.*, 1982).

3.1.1. *Dermacentor marginatus*

Piják stepní (*Dermacentor marginatus*, Obr. 1) patřící do čeledi *Ixodidae* je jedním ze dvou druhů pijáků žijících v Evropě. Je také rozšířen ve stepních oblastech Asie a severní Ameriky. Jeho vývoj je trojhostitelský. Specializuje se především na větší savce, člověka napadá pouze ojediněle.

D. marginatus přenáší bakterii *Rickettsia slovaca* (Řeháček *et al.*, 1990; Beati *et al.*, 1993) způsobující horečnaté onemocnění. Tato bakterie byla poprvé izolována na Slovensku roku 1968 (Sekeyová *et al.*, 2012). Píják je též vektorem viru klíšťové encefalitidy, viru konžsko-hemoragické horečky, viru Bhanja, bakterií *B. burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *R. conorii*, *R. sibirica* a prvoků rodu *Babesia* a *Nuttalia* (Hubálek, 2000).



Obrázek 1: Samice a samec klíštěte *Dermacentor marginatus*.

<http://www.ijon.de/zecken/images/zecke03.jpg>; 5.12.2012

3.1.2. Sání klíšťat a jejich sliny

Klíště se zachycuje na hostiteli pomocí chelicer s háčky. Během jejich zatahování vtlačuje do kůže hostitele hypostom, jímž nasává krev a vypouští do rány své sliny. Hostitel má k dispozici různé obranné mechanismy jako vazokonstrikci, srážení krve (hemostatika), vyvolání imunitní odpovědi nebo lokálního zánětu. Aby se klíště mohlo živit krví, musí jeho sliny obsahovat látky, které reakci hostitele potlačí.

V klíštěcích slinách se nachází přes 50 popsanych proteinů – enzymů, inhibitorů enzymů, amin-vázajících proteinů, homologů cytokinů, látek s anestetickým účinkem, protizánětlivých a imunomodulačních činitelů. Srážení hostitelovy krve brání antikoagulanty (Mans *et al.*, 2004) a inhibitory koagulačních kaskád – např. Ixolaris (Francischetti *et al.*, 2002) a Salp14 (Narasimhan *et al.*, 2002). Prostaglandiny a apyrázy předcházejí vzniku sraženin tím, že působí proti shlukování krevních destiček (Mans *et al.*, 2004). K potlačení alergické reakce hostitele slouží histamin vázající proteiny (Paesen *et al.*, 1999). Ve slinách je přítomen i hemlipoglykoprotein, který váže hem (Gudderra *et al.*, 2001; Maya-Monterio *et al.*, 2000) a má pravděpodobně i další, zatím neznámé funkce (Dupejová *et al.*, 2011).

3.1.3. Hemolymfa klíšťat

Hemolymfa členovců je obdobou krve u obratlovců, zajišťuje tedy transport nutričních i hormonálních látek, navíc je oporou pro tkáň. Skládá se z plasmy a hemocytů.

Plasma udržuje stálost vnitřního prostředí, tedy osmotický tlak. Jsou v ní rozpuštěny anorganické soli, sacharidy, aminokyseliny, lipidy, enzymy, hormony, proteiny, pigmenty a další látky důležité pro správnou funkci organismu. Mezi významné plasmatické proteiny řadíme viteliny a jejich prekurzory vitelogeniny, defenziny, lysosomy, makroglobuliny, hemlipoglyko-transportní proteiny a lektiny. Tyto proteiny hrají důležitou roli v humorální imunitě (Sonenshine, 1991).

Vitelogeniny jsou produkovány hemolymfou a transportovány do oocytů, kde zajišťují tvorbu žlutkových proteinů potřebných pro vývoj vajíčka (Gudderra *et al.*, 2001). Tyto proteiny na sebe navazují hem (James a Oliver, 1997). Vitelogeniny byly izolovány např. z klíštěte *D. variabilis* (Rosel a Coons, 1992), *I. scapularis* (James a Oliver, 1997) nebo *Ornithodoros moubata* (Taylor a Chinzei, 2001).

Defenziny brání organismus proti G+ bakteriím, některé jejich izoformy se uplatní i proti G- bakteriím, houbám a prvokům (Nakajima *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*, 2003, Tsuji *et al.*, 2007).

Lysosomy s antimikrobiální aktivitou byly potvrzeny u klíšťat *D. variabilis* a *Amblyomma hebraeum* (Johns *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2004).

α -2-makroglobulin inhibuje proteázy bezobratlých živočichů (Hoffmann *et al.*, 1999), vyskytuje se např. u *O. moubata* (Kopáček *et al.*, 2000).

Hemlipoglyko-transportní proteiny (CP, carrier proteins) se účastní trávení krve - váží, transportují a skladují hem (Maya-Monterio *et al.*, 2000; Gudderra *et al.*, 2001).

Lektiny rozpoznávají povrchové molekuly erytrocytů, mikroorganismů a buněk trávicího traktu, váží na sebe např. kyselinu sialovou, *N*-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) a volné i komplexní sacharidy (glykoproteiny, glykolipidy, polysacharidy, monosacharidy) (Pneumans a van Damme, 1995). Izolací prvních klíštěcích lektinů se zabýval tým prof. Grubhoffera a potvrdil jejich výskyt u *O. papilipes*, *O. tartakovski* a *A. polonicus* (Grubhoffer *et al.*, 1991). Významnou skupinu lektinů tvoří fibrinogenu podobné proteiny (FReP), mezi něž patří pravděpodobně i hemlipoglykoprotein (HLGP), který se nachází nejen v hemolymfě samic, samců, nymf a larev, ale i v jejich slinných žlázách.

Hemocyty tvoří 50 – 60 % hemolymfy. U klíšťat jsou známy 3 základní typy hemocytů: granulocyty, plasmacyty a prohemocyty (Kuhn a Haug, 1994).

3.2. Imunitní systém členovců

Na rozdíl od vyšších organismů nemají bezobratlí specifickou imunitu, ale pouze nespecifickou neboli vrozenou. Specifická imunita vzniká až po prvním kontaktu s antigenem, reakce probíhá pomaleji, a to prostřednictvím vysoce specializovaných buněk, z nichž některé mají schopnost dlouhodobě si zapamatovat antigen, se kterým se už setkaly, zatímco nespecifická imunita reaguje na cizorodé těleso okamžitě dvěma základními mechanismy. Prvním z nich je identifikace patogenů pomocí receptorů rozpoznávajících motivy (PRRs, pattern recognition receptors), které rozlišují molekuly typické pro patogeny jako např. glykany, peptidoglykany, β -1,3-glukany nebo liposacharidy. Po navázání buněčných receptorů na povrchové molekuly mikroorganismů se spouští signální kaskáda vedoucí k likvidaci patogenu – koagulaci či aktivaci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) (Mushegian a Medzhitov, 2001; Taylor, 2006). Druhým typem je rozpoznávání vlastních buněk inhibičními receptory. Pokud se jedná o cizorodou buňku, pak absence specifických markerů vyvolá imunitní odpověď.

Vrozená imunita se skládá ze dvou složek – humorální a buněčné. Humorální imunita je založena na rozpoznávání povrchových molekul patogenů, tedy např. glykanů. Buněčnou imunitu zajišťují hemocyty pomocí fagocytózy, nodulace nebo enkapsulace. Při fagocytóze hemocyty nejprve rozpoznají antigen a vzniká fagosom, do kterého je pohlceno cizí těleso. Fagosom dozrává a mění se v fagolysosom. Během nodulace migrují hemocyty k místu výskytu patogenu, kde vytvoří agregáty. Enkapsulace znamená uzavření cizích mikroorganismů v několika vrstvách buněk.

Nedílnou součástí obrany proti patogenům jsou i fyzikální bariéry – tedy kutikula a epitel trávicího systému. Do těchto bariér pronikají buňky imunitního systému a humorální látky a napomáhají je tak udržet neprostupné pro cizorodé organismy (Mushegian a Medzhitov, 2001; Taylor, 2006).

3.2.1. Imunitní systém klíšťat

Imunitní systém klíšťat se velmi podobá ostatním bezobratlým živočichům. Zajišťuje ochranu před bakteriemi, viry a patogeny (Sonenshine, 1991).

U klíšťat byly prokázány 3 typy hemocytů: granulocyty, plasmacyty a prohemocyty (Kuhn a Haug, 1994). V klíšťákově *D. marginatus* byl navíc objeven čtvrtý

typ hemocytů podobající se sferulocytům hmyzu (Borovičková a Hypša, 2005; Kadota *et al.*, 2003).

Po napadení klíštěte mikroorganismem se v hemocytech, tukovém tělese a střevních buňkách syntetizují antimikrobiální proteiny a peptidy - lysozymy, defenziny, lektiny. Jsou v malém množství přítomny v hemolymfě stále, ale během infekce se jejich množství zvýší.

Lysozymy štěpí β -1,4 glykosidické vazby mezi kyselinou *N*-acetylmuramovou a *N*-acetyl-glukosaminem a tím narušují peptidoglykan buněčných stěn bakterií (Podboronov, 1990).

Lektiny mají schopnost aglutinace, rozpoznávání povrchových molekul savčích buněk i mikroorganismů (glykokonjugátů a glykosylovaných struktur bakterií, hub i virů) a umožňují reverzibilní specifickou vazbu se sacharidy (Pneumans a van Damme, 1995).

3.3. Lektiny

Lektiny jsou glykoproteiny obsahující alespoň jedno vazebné místo umožňující specifickou reverzibilní vazbu se sacharidem (Pneumans a van Damme, 1995). Vyskytují se ve všech eukaryotických organismech, v mnoha druzích bakterií, hub a virů. Účastní se přirozené imunity obratlovců i bezobratlých živočichů, intra- a interbuněčné signalizace apod. U klíšťat jsou zastoupeny v hemolymfě, hemocytech, střevě a slinných žlázách (Grubhoffer a Kovář, 1998). Po navázání na sacharidovou složku buněčné stěny bakterií mohou aktivovat komplement (Grubhoffer *et al.*, 2004).

Podle domén, které jsou schopny vázat sacharidy, dělíme lektiny na tři podskupiny. Merolektiny obsahují pouze jednu doménu, hololektiny mají dvě a více homologních domén. Součástí chimerolektinů není pouze doména vázající sacharid, ale ještě jedna se specifickou aktivitou (Pneumans a van Damme, 1995).

Lektiny dále dělíme dle jejich struktury a funkce do několika rodin, například: galektiny (S-lektiny), kolektiny, selektiny, pentraxiny, C-lektiny, P-lektiny, R-lektiny nebo fibrinogenu podobné proteiny (FReP, fibrinogen-related protein) (Dodd a Drickamer, 2001).

3.3.1. Fibrinogenu podobné proteiny (FReP)

Fibrinogenu podobné proteiny obsahují v C-koncové oblasti fibrinogenu podobné domény (FReD, fibrinogen-related domain), které jsou blízce příbuzné doménám Tachylektinu 5A a 5B izolovaných z ostrorepa *Tachypleus tridentatus*. Tachylektiny rozpoznávají N-acetylovou strukturu sacharidů a účastní se aglutinace bakterií. Je tedy pravděpodobné, že FReP klíšťat také hrají roli v rozpoznávání a přenosu patogenů (Kovář *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2005, 2006).

Prvním purifikovaným a plně charakterizovaným FReP se stal Dorin M o velikosti 640 kDa z klíštěte *O. moubata* (Kovář *et al.*, 2000; Man *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2005, 2006). Do rodiny FReP taktéž řadíme Amblyomin (*A. americanum*), Ixoderin A a B (*I. ricinus*), Ixoderin A-like (*I. ricinus*, *I. scapularis*), OMFREP (*O. moubata*) (Grubhoffer *et al.*, 2008).

3.3.1.1 Hemlipoglykoprotein (HLGP)

Hemlipoglykoprotein je protein o velikosti cca 290 kDa patřící pravděpodobně do rodiny FReP. Skládá se ze dvou podjednotek (100 a 95 kDa). Byl identifikován v klíštěti *D. marginatus* pomocí imunoblotu jako protein blízce příbuzný hemlipoglyktransportnímu proteinu (DvCP) z *D. variabilis*. V nativním stavu vytváří komplex (450 kDa) s dalšími proteiny (Dupejová, 2010; Dupejová *et al.*, 2011).

Po nasátí klíštěte HLGP váže a uskladňuje hem. Vyskytuje se v hemolymfě, hemocytech, střevě a slinných žlázách klíšťat. Po nasátí se jeho obsah v hemocytech zvyšuje. Ačkoli samci sají méně krve než samice, obsah HLGP v jejich hemolymfě je srovnatelný. Je tedy zřejmé, že kromě transportu hemu zastává v organismu i jiné důležité funkce. Pomocí rezonance povrchového plasmonu bylo prokázáno, že váže galaktózu. Vazba sacharidů je pravděpodobně ovlivňována ionty Ca^{2+} . Ve slinných žlázách klíšťat se vyskytuje ve dvou formách – glykosylované (290 kDa) a deglykosylované (250 kDa), velikost N-glykanových zbytků je tedy přibližně 40 kDa. MS spektra prokázala přítomnost vysoce manosylovaných struktur ($HexNAc_2Hex_9$, $HexNAc_2Hex_{10}$) a komplexních glykanů ($HexNAc_4Hex_7$, $HexNAc_4Hex_8$) (Dupejová, 2010; Dupejová *et al.*, 2011).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Složení roztoků a pufřů

Odebírání hemolymfy:

Fyziologický roztok: 0,15 M NaCl v destilované vodě

Gelová elektroforéza (SDS-PAGE):

30% akrylamid: 30% akrylamid v destilované vodě

10% APS: 10% persíran amonný v destilované vodě

TEMED: tetramethylethylendiamin

separační pufr: 90,8 g Tris, 10 ml 10% SDS (dodecylsírán sodný), pH 8,8

zaostřovací pufr: 60,54 g Tris, 10 ml 10% SDS, pH 6,8

5xLB: 0,313 M Tris-HCl, 10% SDS, 0,05% bromfenolová modř, 50% glycerol, pH 6,8

4xLB: 0,25 M Tris-HCl, 8% SDS, 0,04% bromfenolová modř, 40% glycerol, 400 mM DTT, pH 6,8

10x elektrodový pufr (Running buffer): 75,75 g Tris-base, 360 g glycin, 25 g SDS, 2,5 l destilované vody; před použitím naředit 10x

Imunoblotting:

1x koncentrovaný blotovací pufr: 20% methanol, 25 mM Tris-base, 150 mM glycin

PBS: 14 mM NaCl, 0,15 mM KH_2PO_4 , 1,8 mM Na_2HPO_4 , 0,27 mM KCl, pH 7,4

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

5% mléko: 5% odtučněné sušené mléko v PBS

vyvíjecí roztok: 18 ml destilované vody, 2 ml 1M Tris (pH 7,2), 0,5 mg/ml diaminobenzidinu

Elektroeluce:

1x koncentrovaný elektroeluční pufr: 200 mM glycin, 25 mM Tris-HCl, 0,025% SDS, pH 8,5

Refolding:

10x HEPES pufr: 11,915 g 100 mM HEPES pufr, 43,8 g 1,5 M NaCl, 0,25 ml 0,05% Tween 20, 0,5 l destilovaná voda

Barvení stříbrem:

Tab. 1: Příprava roztoků pro barvení stříbrem.

	Gel fix solution 1	Gel fix solution 2	Sensitising solution	Staining solution	Developing solution	Stop solution
ethanol	12,5 ml	15 ml				
kys. octová	2,5 ml					
Sensitiser concentrate			0,1 ml		2,5 µl	
Staining reagent				1 ml		
Developing reagent					2,5 ml	
Stop reagent						2 ml
formaldehyd*				13,5 µl	6,75 µl	
destilovaná voda	10 ml	35 ml	25 ml	25 ml	25 ml	23 ml

* přidává se až těsně před použitím roztoku

4.2. Odebírání hemolymfy

K práci jsem použila hemolymfu z osmi samic klíštěte *D. marginatus* z chovu Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích nasátých na morčatech.

Na sklíčku jsem smíchala 50 µl fyziologického roztoku s 0,5 µl inhibitory proteáz (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific). Klíšťatům jsem odstříhla koncovou část končetiny, hemolymfu jsem opatrně vytlačila na sklíčko do připraveného roztoku. Takto získaný roztok jsem přepipetovala do mikrozkušavky a centrifugovala jsem jej 10 minut (3000 ot/min) v chlazené centrifuze o teplotě 4 °C. Tím se hemocyty usadily na dně zkumavky. Supernatant jsem centrifugovala 30 minut při 14 000 ot/min. Tímto jsem získala hemolymfu, kterou jsem dále naředila fyziologickým roztokem v poměru 1:5. Takto připravený vzorek jsem po celou dobu následující práce udržovala v mraženém stavu (- 20 °C) nebo při 4 °C.

4.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů dle jejich velikosti. Pracovala jsem s 10% gelem připraveným dle Tabulky 2.

Tabulka 2: Příprava 10% polyakrylamidového gelu.

Separační gel		Zaostřovací gel	
30% akrylamid	3,3 ml	30% akrylamid	330 μ l
separační pufr	2,5 ml	zaostřovací pufr	500 μ l
destilovaná voda	4,1 ml	destilovaná voda	1,15 ml
10% APS	100 μ l	10% APS	20 μ l
TEMED	4 μ l	TEMED	2 μ l

Pro detekci HLGP imunoblotem jsem smíchala 12 μ l vzorku s 3 μ l 5x koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru (bez DTT – 5xLB), respektive 11,25 μ l vzorku s 3,75 μ l 4x koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (s DTT – 4xLB), vše jsem zvortexovala, denaturovala 3 min při 95 °C a 30 s centrifugovala. Do první jamky gelu jsem nanasla 4 μ l markeru, do druhé 4 μ l vzorku s 5xLB, do třetí 4 μ l vzorku s 4xLB.

Pro elektroeluci jsem si připravila jednojamkový preparační gel. Smíchala jsem 50 μ l hemolymfy ředěné 1:5 s 12,5 μ l 5x koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru, vzorek jsem zvortexovala, centrifugovala a denaturovala. Do gelu jsem nanášela 15 μ l vzorku a 4 μ l markeru.

Jako marker jsem použila nebarvený Unstained Protein Ladder 10 – 250 kDa (New England BioLabs Inc.).

Elektroforéza probíhala 1,5 h ve stejnosměrném elektrickém poli, nejprve při 100 V, po přestupu proteinů ze zaostřovacího gelu do separačního při 120 V.

4.4. Imunoblotting

Imunoblot je technika používaná k detekci konkrétního proteinu pomocí specifických protilátek.

Po ukončení rozdělování proteinů elektroforézou jsem gel přenesla do 1x koncentrovaného blotovacího pufru. PVDF blotovací membránu (Bio-Rad) jsem namočila

na 3 min do methanolu, poté jsem ji na 3 min přenesla opět do 1x koncentrovaného blotovacího pufru. Sestavila jsem následující blotovací sendvič: blotovací papír, membrána, gel, blotovací papír. Každou vrstvu jsem uhladila skleněnou tyčinkou, abych odstranila bubliny. Blotovací sendvič jsem zalila 1x koncentrovaným blotovacím pufrem. Blotování probíhalo 1 h při 20 V.

Membránu jsem promyla v 1x koncentrovaném PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4) a inkubovala 1 h v 5% roztoku sušeného mléka v PBS. Poté jsem ji promývala 3 x 5 min v 10 ml PBS-Tweenu 20. Následovala inkubace 1 h s primárními myšimi protilátkami anti-HLGP připravenými J. Dupejovou (Balb/c 7 Ner) (Dupejová, 2010) ředěnými v 5% mléce v poměru 1:1000 a opětovné promývání 3 x 5 min v PBS-Tweenu 20. Poté jsem nechala membránu inkubovat 1 h s anti-myšimi sekundárními protilátkami, konjugovanými s peroxidázou (Peroxidase labeled horse anti-mouse IgG H+L, Vector Laboratories) naředěnými stejným způsobem jako primární. Membránu jsem promyla 2 x 5 min v PBS-Tweenu 20 a 1 x 5 min v PBS.

Připravila jsem si vyvíjecí roztok, který jsem 30 min míchala na vortexu a těsně před vyvoláváním jsem přidala 6 μ l H_2O_2 . Do tohoto roztoku jsem vložila membránu. Jakmile byla dobře viditelná reakce, zastavila jsem vyvíjení opláchnutím membrány destilovanou vodou.

4.5. Barvení polyakrylamidového gelu barvivem Page Blue

Polyakrylamidové gely jsem po elektroforéze promývala 3 x 10 min v destilované vodě, 1 h v PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific) obsahujícím barvivo Coomassie Brilliant Blue a pak opět 3 x 10 min v destilované vodě. Gely jsem vyfotila gel-dokumentačním systémem Bio-Imaging Systems (MiniLumi).

4.6. Elektroeluce

Elektroeluce je metodou extrakce proteinu z polyakrylamidového gelu.

Pomocí SDS-PAGE jsem rozdělila proteiny hemolymfy *D. marginatus* a následným imunoblotem identifikovala HLGP. Skalpelem jsem z jednojamkového preparačního gelu vyřízla pruh obsahující neredukovaný HLGP a rozdělila jej na 12 částí. Membránu dialyzační zkumavky (Thermo Scientific) jsem navlhčila deionizovanou vodou.

Připravila jsem si 0,7 l 1x koncentrovaného pufru pro elektroeluci. Do dialyzační zkumavky jsem napipetovala 0,8 ml pufru a přidala proužek obsahující HLGP. Zkumavku jsem vložila do horizontální aparatury na elektroforézu a zalila pufrem tak, aby byly obě protilehlé membrány ponořeny a proud mohl procházet skrz membrány. Elektroeluce probíhala v chladicí místnosti (4 °C) 3 h při 100 V. Poté jsem na 30 s obrátila směr elektrického proudu, aby se protein eluovaný z gelu uvolnil z membrány do roztoku.

Ze zkumavky jsem vyjmula gelový proužek, umístila jsem ji do plováku a dialyzovala přes noc (8 h) při 4 °C v 1 l PBS (pH 7,4).

Poté jsem obsah dialyzační zkumavky přepipetovala do centrifugační zkumavky a srážela jej 1-6 h ve 4 ml ledového acetonu (- 20 °C). Roztok obsahující vysrážený protein jsem centrifugovala při 4 °C 10 min 14 000 ot/min. Odebrala jsem supernatant, pelet vysušila ve vakuu, rozpustila v 50 µl deionizované vody a změřila spektrofotometrem Nanophotometr (Implen) koncentraci.

Proužky gelu jsem uschovala pro pozdější kontrolu účinnosti elektroeluce.

4.7. Refolding

Refolding jsem použila k tomu, abych denaturovanému elektroeluovanému proteinu vrátila jeho původní konformaci.

Smíchala jsem vzorky 3 až 5 a označila je jako HLGP A1, a vzorky 6 až 8 jako HLGP A2. Refolding jsem prováděla dvěma způsoby. HLGP A1 jsem dialyzovala 112 h (aby celková doba dialýzy byla shodná s délkou dialýzy u HLGP A2) v 250 ml 1x konc. HEPES pufru při 4 °C, HLGP A2 jsem dialyzovala v 250 ml postupně rostoucí a následně klesající koncentraci močoviny v 1x konc. HEPES pufru (Tab. 3), v každém roztoku 8 h, respektive v 6M močovinně a 0,1% PBS 16 h.

Tabulka 3: Příprava různých koncentrací roztoků močoviny pro refolding.

koncentrace močoviny v roztoku [M]	1	2	3	4	5	6
g močoviny / 250 ml 1x konc. HEPES pufru	15,015	30,03	45,045	60,06	75,075	90,09

4.8. Imunoprecipitace

Imunoprecipitace slouží k získání nativního proteinu.

10 μ l magnetických kuliček jsem smíchala s 10 μ l roztoku protilátek anti-HLGP (Ab4-2) a 30 min míchala. Zkumavku jsem vložila do magnetického stojánku, kuličky se přiblížily ke stěně nejbližší magnetu. Odebrala jsem roztok a kuličky rozsuspendovala v 500 μ l PBS (pH 7,4). Toto promývání jsem opakovala třikrát. Poté jsem ke kuličkám přidala 20 μ l hemolymfy ředěné 1:5, 3 μ l 100x konc. inhibitorů proteáz a 277 μ l PBS. Vše jsem míchala 1 h při 4 °C. V magnetickém stojánku jsem odebrala roztok, označila ho jako flow-through (FT) a kuličky jsem rozpustila v 500 μ l PBS. Po 5 minutách mírného míchání jsem opět odebrala roztok a označila ho wash (W). Znovu jsem rozmíchala kuličky v 500 μ l PBS, tentokrát jsem však roztok neuschovávala. Ke kuličkám jsem přidala 35 μ l Elution Buffer (Thermo Scientific), 15 min inkubovala za neustálého třepání a supernatant označila jako elution (EL). Tento krok jsem opakovala ještě jednou. Změřila jsem koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích.

Elektroforézou jsem ověřovala v kterých frakcích (FT, W, EL) je přítomen HLGP. Gel jsem barvila stříbrem.

4.9. Barvení stříbrem

K barvení gelu stříbrem jsem použila Silver Stain Kit (Thermo Scientific).

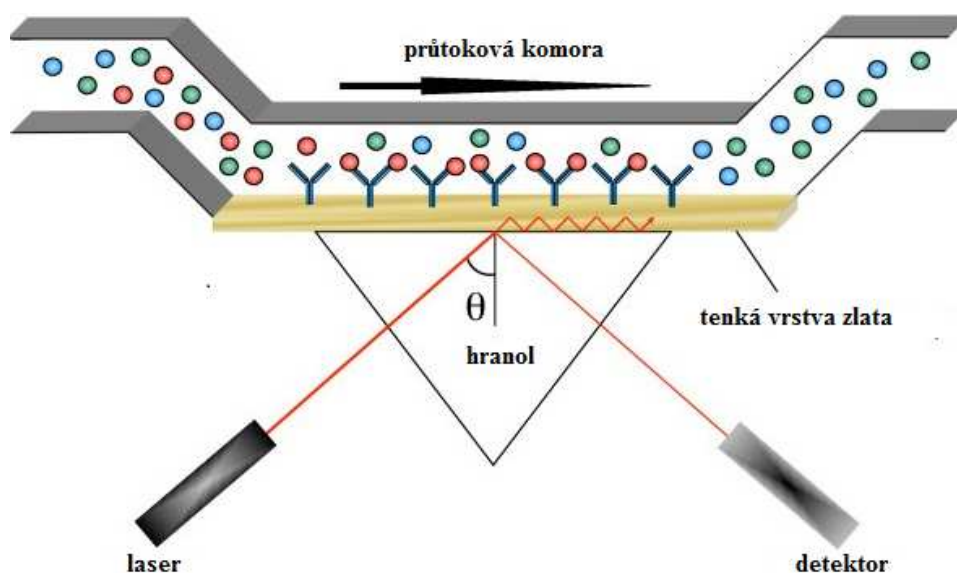
Gel jsem promývala 3 min v destilované vodě a poté jsme jej zahřívala 30 s v roztoku Gel fix solution 1 v mikrovlnné troubě. Gel jsem následně v tomto roztoku 10 min houpala. Přemístila jsem gel do Gel fix solution 2, opět vložila na 30 s do mikrovlnné trouby a 10 min houpala. Promyla jsem ho 2x 20 s v destilované vodě, pak promývala 1 min v Sensitising solution a opět 2x 20 s v destilované vodě. Staining solution působil 20 min, následovalo další promytí 2x 20 s v destilované vodě. Developing solution jsem po 4 min vyvíjení slila a barvení ukončila Stop solution (5 min). Gel jsem přenesla do destilované vody a vyfotila.

4.10. Povrchová rezonance plasmonu (SPR, surface plasmon resonance)

Povrchová rezonance plasmonu je optická metoda, při níž se měří posun rezonančního úhlu odrazu monochromatického záření, které dopadá na materiál adsorbovaný na kovové destičce a které interaguje s delokalizovanými elektrony v povrchové vrstvě kovu, proti kontrolnímu světlu (Pattanaik, 2005).

Byl použit přístroj Surface Plasmon Resonance Instrument Biacore 3000. Zařízení využívá chipy s tenkou vrstvou zlata, na kterou jsou pevně navázané biomolekuly (v mém případě sacharidy). Tato vrstva přichází do kontaktu s roztokem, který obsahuje zkoumanou molekulu (HLGP). Pokud dojde k navázání molekuly z roztoku na pevně vázané částice, změní se úhel lomu světla, který je zaznamenán detektorem (Obr. 2). Jakmile je dosaženo rovnovážného stavu, zavádí se do průtokové komory pufr, který navázané molekuly uvolní. Změna indexu lomu je opět zaznamenána detektorem. Asociační a disociační míra molekulární interakce popisuje kinetiku vazebné reakce a jejich kvocient je přímým měřítkem síly interakce. Výstupem je graf závislosti SPR odpovědi na čase (E. Sundberg, Boston Biomedical Research Institute, http://www.bbri.org/index.php/biacore_3000.html, 8.12.2012).

Za pomoci doc. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D. a Mgr. L. Malinovské, Ph.D. z Národního centra pro výzkum biomakromolekul (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno) jsem touto metodou stanovovala vazebnou specifitu HLGP s galaktosou, mannosou a fukosou.

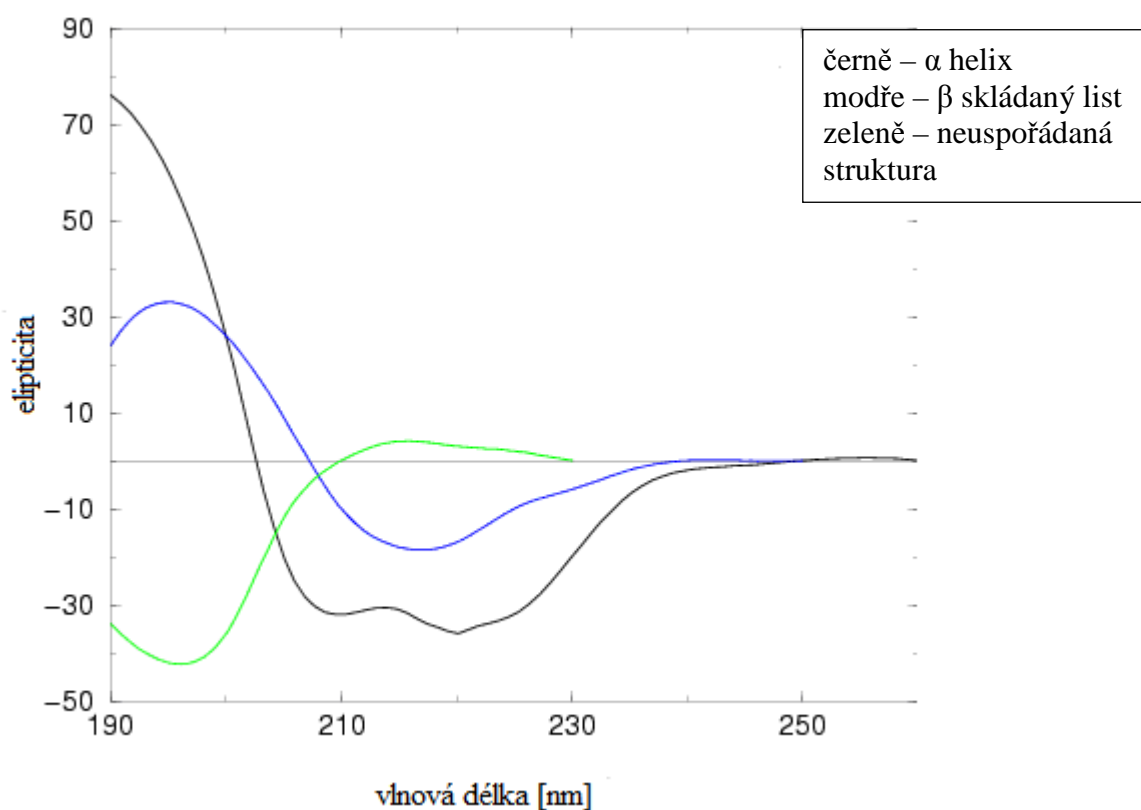


Obrázek 2: Princip měření povrchové rezonance plasmonu (Richens, 2009).

4.11. Cirkulární dichroismus (CD, circular dichroism)

Cirkulární dichroismus je používán ke stanovení sekundární struktury biomakromolekul. Metoda je založena na rozdílné absorpanci levo- a pravotočivého polarizovaného světla ve zkoumané látce. Pracovala jsem za asistence doc. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D. a Mgr. P. Rozumové z Národního centra pro výzkum biomakromolekul (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno) se spektrometrem JASCO J-815. Pokud převládá struktura β skládaný list, klesá křivka přibližně při 240 nm pod úroveň nulové osy, vytváří jedno minimum (215 – 220 nm) a vrací se nad nulovou hladinu (195 – 205 nm). Převažující α helix tvoří křivku se dvěma minimy (222 a 208 nm), nad osu 0 se dostává při 190 – 200 nm. Neuspořádané struktury se vyznačují tím, že jejich křivka klesá pod nulovou hladinu později (220 – 210 nm) (<http://chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture1.html>, 1.11.2012).

Vložila jsem vzorky HLGP do spektrometru v čase t_0 ($t = 4$ °C, měření 1) a $t_1 = 5$ min ($t = 4$ °C, měření 2). Poté jsem měřila vzorek HLGP při laboratorní teplotě ($t = 20$ °C, měření 3).



Obrázek 3: Sekundární struktura proteinů určená pomocí cirkulárního dichroismu.

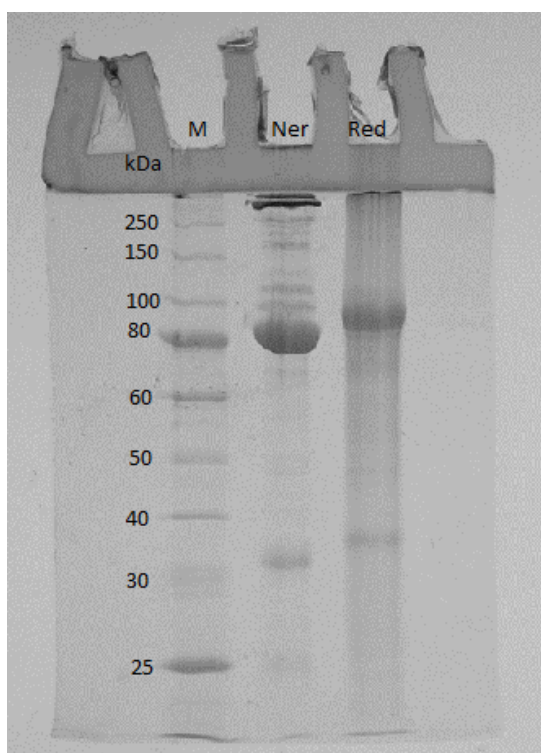
<http://besley.chem.nottingham.ac.uk/research/research-prospec.html>, 7.5.2012

5. VÝSLEDKY

5.1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Proteiny hemolymfy klíštěte *D. marginatus* jsem smíchala s neredukujícími a redukujícími vzorkovými pufrů a elektroforeticky jsem je rozdělila ve stejnosměrném elektrickém poli dle jejich molekulové hmotnosti. Gel jsem obarvila roztokem Page Blue. Na Obrázku 4 je vidět elektroforetický profil neredukovaných a redukovaných proteinů z plasmy *D. marginatus*.

Plasma je tedy tvořena směsí proteinů o různé molekulové hmotnosti. Redukující prostředí narušilo disulfidické můstky v monomerních proteinech i proteinech složených z vícero podjednotek, což se projevilo ve změněném elektroforetickém profilu vzorků.

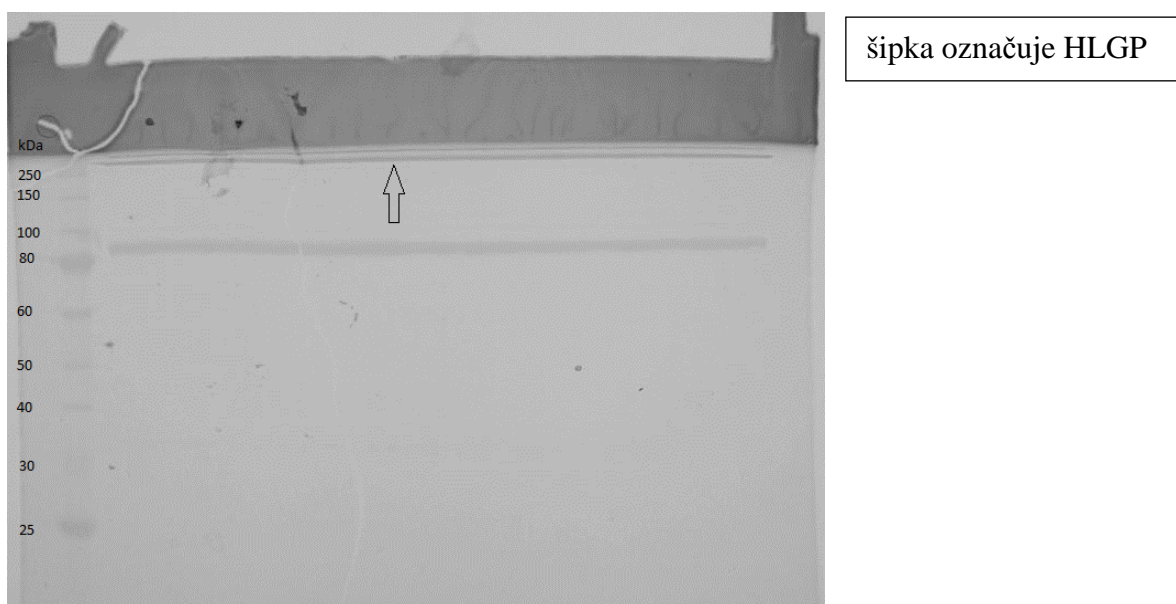


M – molekulový standard
Ner – neredukované proteiny hemolymfy
Red - redukované proteiny hemolymfy

Obrázek 4: SDS-PAGE neredukovaných a redukovaných proteinů hemolymfy *D. marginatus* barvených barvivem Page Blue.

Pro pozdější elektroeluci jsem si připravila jednojamkový preparační gel, ze kterého jsem po elektroforéze vyřízla proužek obsahující pouze neredukovaný HLGP, na

Obrázku 5 označený šipkou. HLGP má molekulovou hmotnost 290 kDa. Pomocí imunoblotu jsem potvrdila, že se jedná opravdu o HLGP.

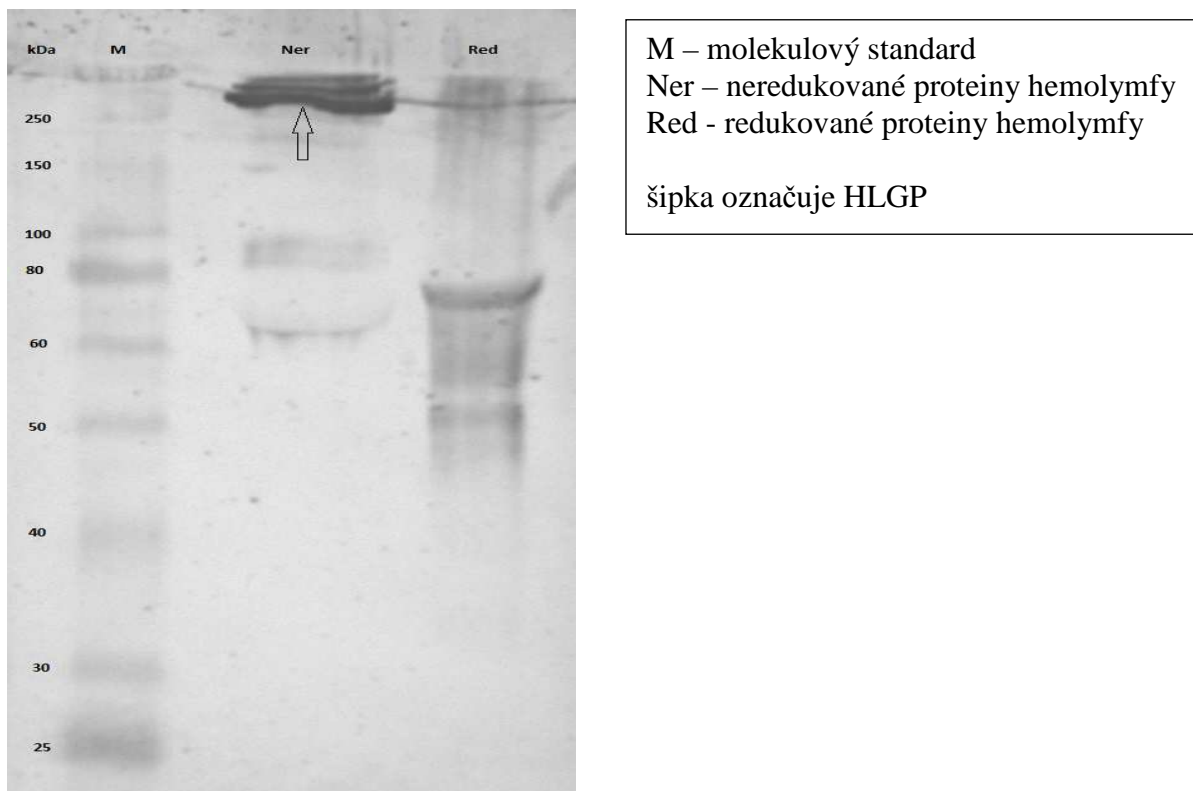


Obrázek 5: Jednojamkový preparační gel s neredukovanými proteiny hemolymfy *D. marginatus* barvenými roztokem Page Blue.

5.2. Imunoblotting

Elektroforézou rozdělené neredukované a redukované proteiny (Obr. 4) jsem přeblotovala na membránu. Tu jsem pak inkubovala s myšími primárními protilátkami rozeznávajícími. Ty byly značeny sekundárními protilátkami anti-myšími, konjugovanými s peroxidázou. Po ukončení vyvíjení barevné reakce byl na membráně patrný proužek o velikosti 290 kDa.

Pomocí imunoblotu jsem tedy ověřila, že protein izolovaný z hemolymfy klíštěte *D. marginatus* je skutečně hemlipoglykoprotein (Obr. 6).



Obrázek 6: Neredukované a redukované proteiny hemolymfy *D. marginatus* přebílotované na membránu.

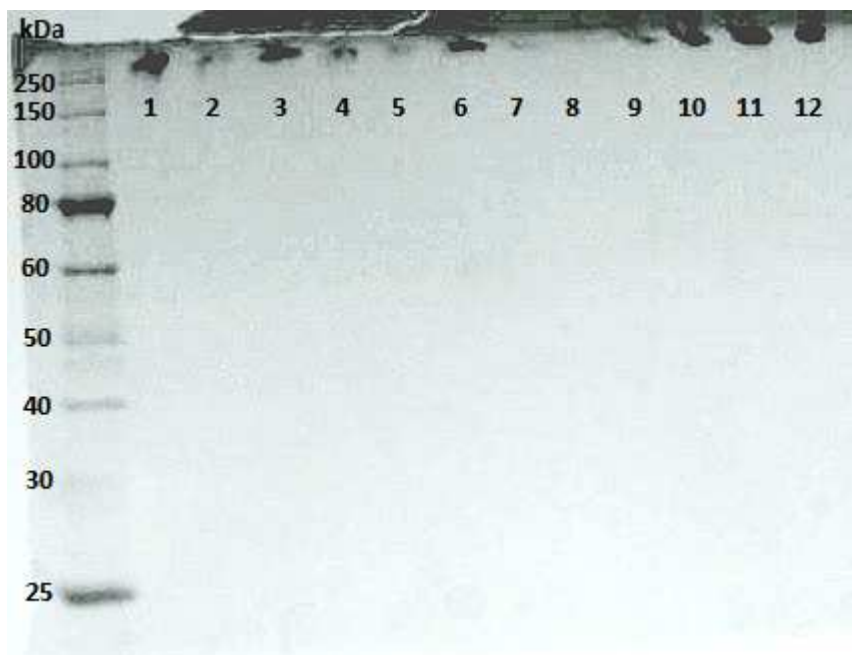
5.3. Elektroeluce

Z jednojankového preparačního gelu s neredukovanými proteiny z hemolymfy *D. marginatus* barvenými roztokem Page Blue (Obr. 5) jsem vyřízla proužek obsahující HLGP a rozdělila ho na 12 částí. Elektroelucí jsem převedla protein z gelu do roztoku. Po centrifugaci, vysrážení a vysušení jsem vzorky rozpustila v 50 μ l deionizované vody a změřila jsem koncentraci HLGP (Tab. 4).

Tabulka 4: Koncentrace HLGP ve vzorcích 1 - 12.

vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
koncentrace HLGP [μ g/ml]	204	110	345	642	768	376	646	486	439	783	501	407
srážení v ledovém acetonu [h]	1	1	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5

Účinnost elektroeluce jsem ověřila elektroforézou gelových proužků zbylých po elektroeluci (Obr. 7).



Obrázek 7: Ověření účinnosti elektroeluce. Detekce HLGP zbylého v proužcích gelu 1-12 po elektroeluci

Z Obrázku 7 je patrné, že elektroeluce neproběhla u některých proužků úplně. U vzorků č. 7 a 8 byla nejúčinnější. Tomu také odpovídaly koncentrace v eluátech (Tab. 4).

5.4. Refolding

Vzorky 3 až 5 označené jako HLGP A1 jsem dialyzovala 112 h v 250 ml 1x HEPES pufru, vzorky 6 až 8 – HLGP A2 v 250 ml postupně rostoucí a následně klesající koncentraci močoviny v 1x HEPES pufr, celkově taktéž 112 h. Změřila jsem koncentraci refoldovaného HLGP (Tab. 5).

Tabulka 5: Koncentrace refoldovaného HLGP.

vzorek	HLGP A1	HLGP A2
koncentrace HLGP [$\mu\text{g/ml}$]	125	62,7

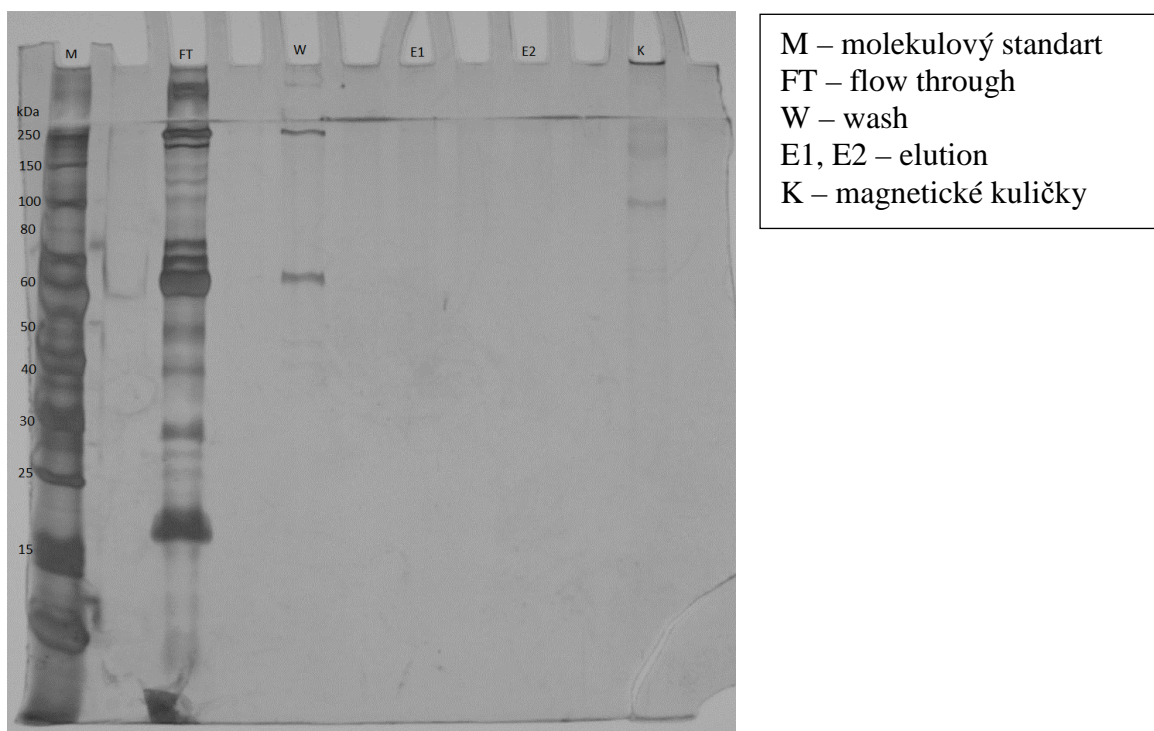
5.5. Imunoprecipitace

Nativní HLGP jsem izolovala imunoprecipací přímo z hemolymfy *D. marginatus* pomocí magnetických kuliček s navázanými protilátkami anti-HLGP. Postupně jsem odebrala tři frakce – flow-through (FT), wash (W) a elution (EL1, 2) a v nich změřila koncentrace proteinů (Tab. 6).

Tabulka 6: Koncentrace proteinů v imunoprecipitačních frakcích.

frakce	FT	W	EL1	EL2
koncentrace proteinů [$\mu\text{g/ml}$]	564	266	141	15,7

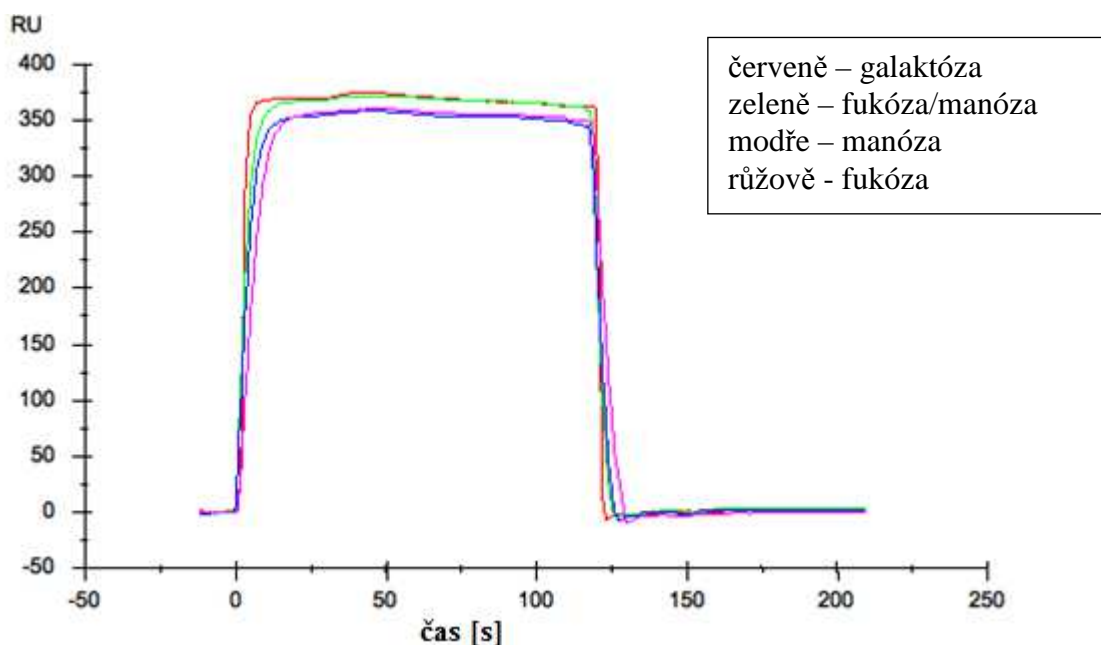
Elektroforézou jsem ověřila přítomnost HLGP v jednotlivých frakcích. Kvůli nízké koncentraci HLGP ve vzorcích jsem gel obarvila stříbrem (Obr. 8). Koncentrace HLGP v EL1 a 2 je tak nízká, že protein z těchto vzorků nebyl v gelu obarven.



Obrázek 8: Imunoprecipitační frakce barvené stříbrem.

5.6. Povrchová rezonance plasmonu

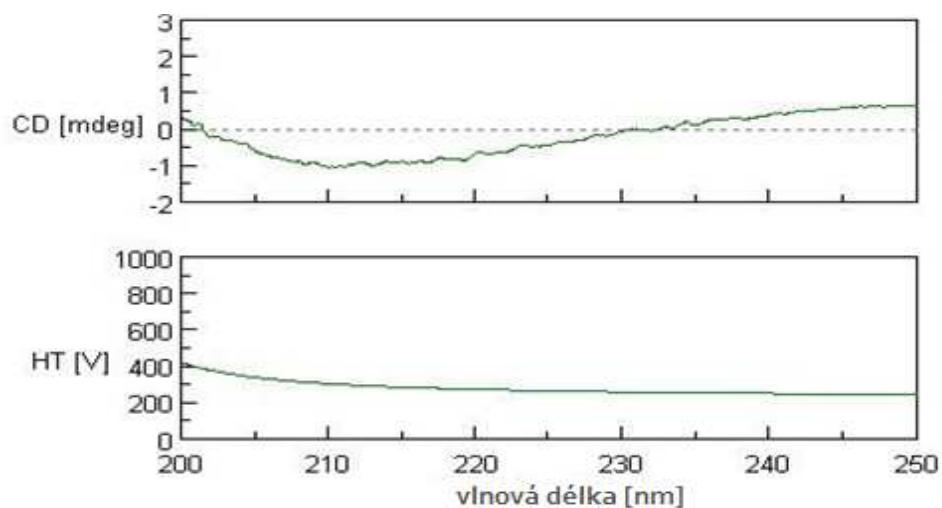
Při měření povrchové rezonance plasmonu nebyla zaznamenána žádná vazba HLGP s použitými sacharidy. Tvar křivek odpovídá nulové vazbě.



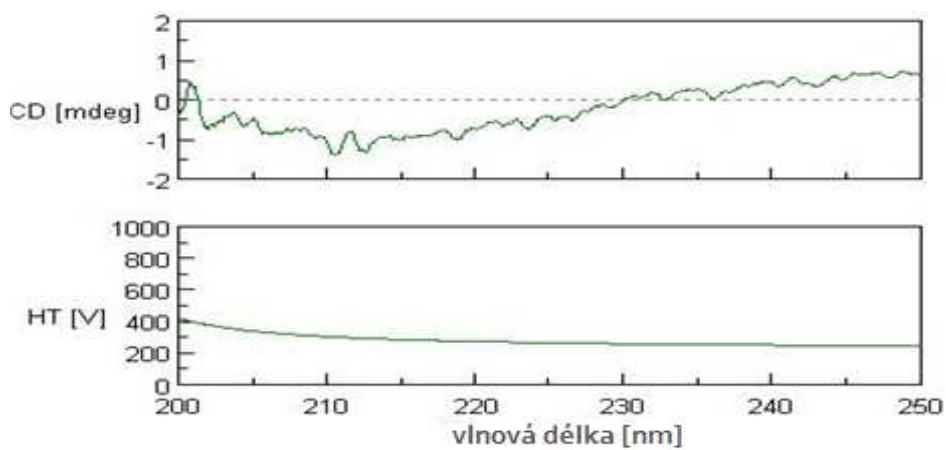
Obrázek 9: SPR záznam vazebné specifity HLGP se sacharidy.

5.7. Cirkulární dichroismus

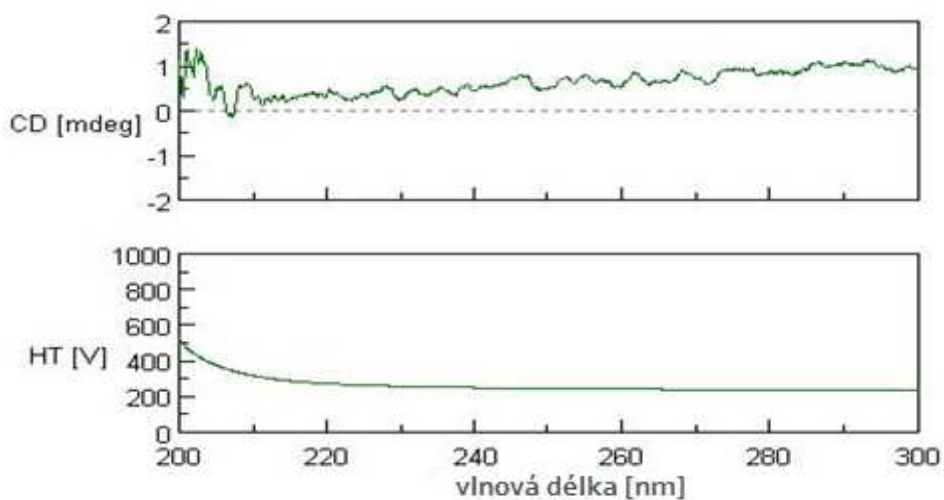
Ze záznamu cirkulárního dichroismu nelze určit sekundární strukturu HLGP, jelikož intenzita signálu je příliš slabá (Obr. 10, 11 a 12). Důvodem je pravděpodobně precipitace proteinu. Precipitaci proteinu lze vysledovat při porovnání křivek v čase t_0 (Obr. 10) a t_1 (Obr. 11), kdy se kvalita signálu v čase zhoršuje. Porovnáním záznamu měření při teplotě 4 °C (Obr. 10) a při laboratorní teplotě (Obr. 12) lze také vysledovat precipitaci proteinu.



Obrázek 10: Záznam CD měření 1 (v čase t_0).



Obrázek 11: Záznam CD měření 2 (v čase t_1).



Obrázek 12: Záznam CD měření 3 (při laboratorní teplotě).

6. DISKUSE

Proteiny hemolymfy klíštěte *D. marginatus* jsem elektroforeticky rozdělila ve stejnosměrném elektrickém poli dle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny se však tímto procesem denaturují, proto je pro jejich další použití v některých typech pokusů nutné je refoldovat, aby opět získaly svou sekundární strukturu. Proteiny lze refoldovat v roztoku, proto jsem je nejprve převedla elektroelucí z gelu do roztoku. Refoldingem proteinu v HEPES pufru byla získán vzorek o koncentraci HLGP 125 µg/ml, u vzorku, u kterého byl proveden refolding ve vzrůstající a opět klesající koncentraci močoviny, bylo dosaženo koncentrace 62,7 µg/ml. Přestože na HLGP A1 i A2 byly použity 3 gelové proužky o průměrné koncentraci HLGP 585 µg/ml, respektive 497 µg/ml, byl výtěžek velmi malý. Účinnost elektroeluce a následného refoldingu je 7,12 %, respektive 4,21 %. Při použití této metody dochází tedy k velkým ztrátám. Neúplnost elektroeluce byla prokázána elektroforézou zbylých gelových proužků.

Primární myší anti-HLGP protilátky rozeznaly HLGP. Jeho velikost (290 kDa) odpovídá výsledkům J. Dupejové (Dupejová, 2010).

Nativní HLGP se získává imunoprecipitací. Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla nízká, nejnižší v elution 2 (15,7 µg/ml). Nejvíce proteinů obsahuje flow-through (564 µg/ml). Kvůli nízké koncentraci proteinu v elučních frakcích jsem jej nemohla detekovat po separaci pomocí SDS-PAGE.

Metodou SPR nebyla prokázána vazba HLGP s galaktózou, manózou ani fukózou, ačkoli HLGP obsahuje domény vázající sacharidy (Dupejová, 2010). Pozdější CD analýzou bylo zjištěno, že protein v roztoku precipitoval, proto také nemohlo dojít k navázání takového množství HLGP na sacharidy, aby byla vyvolána odezva při SPR pokusech. Kromě minimálního množství proteinu (5 – 10 µg) je pro analýzu SPR nejdůležitější jeho čistota a vysoká úroveň aktivity (van der Merwe, 2001).

Pro určení sekundární struktury pomocí CD byla koncentrace HLGP ve vzorcích příliš nízká, protože téměř ihned došlo precipitaci HLGP, což dokazuje roztřesená křivka. Z Obrázku 10 a 11 vyplývá, že s rostoucím časovým intervalem dochází k větší precipitaci proteinu. HLGP je též vysoce teplotně nestabilní (porovnejte Obr. 10 a 12).

Proto je důležité pracovat s HLGP velmi rychle a opatrně, udržovat jej při teplotě do 4 °C. Protein mohl být poškozen i během transportu z Českých Budějovic do Brna, kde probíhalo měření, převážela jsem jej 10 hodin na suchém ledu. Odezva cirkulárního dichroismu mohla být také rušena pufrem, v němž byly vzorky rozpuštěny (Zhu *et al.*, 2003). Bylo by tedy vhodné vzorky co nejvíce zakoncentrovat. Optimální koncentrace vzorku pro CD analýzu je 0,2 – 1 mg/ml (Kelly, Price, 2000). Tyto informace budou využity při budoucích analýzách.

7. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo izolovat hemlipoglykoprotein z hemolymfy nasátých samic klíštěte *D. marginatus* a připravit jej pro následnou charakterizaci.

Elektroforézou jsem rozdělila a denaturovala proteiny hemolymfy klíštěte *D. marginatus*. Pomocí imunoblotu jsem ověřila, že mnou izolovaný protein o velikosti 290 kDa je skutečně hemlipoglykoprotein. Elektroelucí jsem extrahovala HLGP z gelu a následně jej refoldovala.

Imunoprecipitací jsem získala nativní HLGP převážně ve frakcích flow-through a wash. Koncentrace HLGP ve frakci elution byla velmi nízká.

Kromě přípravy proteinu jsem se podílela i na jeho další analýze pomocí SPR a CD. HLGP je velmi náchylný ke změnám teplot, což prokázal i cirkulární dichroismus.

Ke stanovení sekundární struktury HLGP a jeho specifické vazby se sacharidy je nutné vzorky zakoncentrovat. Měření se musí provádět v co nejkratším časovém intervalu, protože velmi rychle dochází k precipitaci proteinu.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS – amonium persulfát

CP – carrier proteins, hemlipoglyko-transportní proteiny

CD – cirkulární dichroismus

DTT – dithiotreitol

DvCP – hemlipoglyko-transportní protein

EL – elution

FReD – fibrinogen-related domain, fibrinogenu podobná doména

FReP – fibrinogen-related protein, fibrinogenu podobný protein

FT – flow-through

GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin

HEPES – kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová

HLGP – hemlipoglykoprotein

LB – loading buffer

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

PBS - phosphate buffered saline, fosfátový pufr s chloridem sodným

PRRs – pattern recognition receptors, receptory rozpoznávající motivy

PVDF – polyvinylidenfluorid

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SDS – sodium dodecyl sulfate, dodecylsírán sodný

SDS-PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza

SPR – surface plasmon resonance, povrchová plasmonová rezonance

TEMED – tetramethylethylendiamin

W – wash

9. SEZNAM LITERATURY

Beati, L., Raoult, R. 1993. *Rickettsia massiliae* sp. Nov., a new spotted fever group rickettsia. Int. J. Sys. Bacteriol. 43, 839-840.

Borovičková, B., Hypša, V., 2005. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. Exp. Appl. Acarol. 35, 317-333.

Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P. 1982. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? Science 216, 1317

Dodd, R.B., Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. Glycobiology 11, 71-79.

Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J. 1999. Tick-borne encephalitis. Clin. Infect. Dis. 28, 882 – 890.

Dupejová, J. 2008. Izolace a biochemická charakterizace proteinů FREP u klíštěte *Dermacentor marginatus*. BSc. Thesis, in Czech. 63 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Dupejová, J. 2010. Hemlipoglykoprotein z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus*: purifikace a biochemická charakterizace. Mgr. Thesis, in Czech. 64 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Dupejová, J., Štěřba, J., Vancová, M., Grubhoffer, L. 2011. Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. Parasites & Vectors 4, 4.

Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M. 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VII/tissue factor complex. Blood 99, 3602-3612.

Grubhoffer, L., Vereš, J., Dusbábek, F. 1991. Lectins as the molecular factors of recognition and defense reactions of ticks. In: Dusbábek, F., Bukva, V. (editors). Modern Acarology vol. 2. SPBA Academic Publishing, The Hauge, 381-388.

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

Grubhoffer, L., Kovář, V., Rudenko, N. 2004. Tick lectins: structural and functional properties. Parasitology 129, 113-125.

Grubhoffer, L. 2008. Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Nuttal, P.A., Bownam, A.S. (editors). Ticks: Biology, disease and control. Cambridge University Press 406-458.

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

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A.J.R., Ezekowitz, R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284, 1313-1318.

Hubálek, Z. 2000. Mikrobiální zoonózy a saponózy. Masarykova univerzita.

James, A.M., Oliver, J.H. 1997. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 27, 639-649.

Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L. 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in thick hemolymph. J. Med. Entomol. 35, 458-464.

Kadota, K., Walter, S., Claveria, F.G., Igarashi, I., Taylor, D., Fujisaki, K. 2003. Morphological and populational characteristics of hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysial phase. *J. Med. Entomol.* 40, 770-776.

Kelly, S.M., Price, N.C. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science* 1, 349-384.

Kopáček, P., Weise, C., Saravan, T., Vítová, K., Grubhoffer, L. 2000. Characterisation of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 465-475.

Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L. 2000. Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30, 195-205.

Kuhn, K.H., Haug, T. 1994. Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterisation of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: *Chelicerata*). *Cell Tissue Res.* 277, 493-504.

Lai, R., Lomas, L.O., Jonczy, J., Turner, P.C., Rees, H.H. 2004. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem. J.* 379, 681-685.

Man, P., Kovář, V., Štěřba, J., Strohalm, M., Kavan, D., Kopáček, P., Grubhoffer, L., Havlíček, V. 2008. Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 14, 345-354.

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

Maya-Monterio, C.M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F.A., Alves, E.W., Capurro, M.L., Zigali, R., Almeida, I.C., Oliveria, P.L. 2000. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 36584-36589.

Maya-Monterio, C.M., Alves, E.W., Pinhal, N., Abdalla, D.S.P., Oliveria, P.L. 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 81-87.

van der Merwe, P.A. 2001. Surface Plasmon Resonance in Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry Practical Approach series. Oxford University Press p. 137-170.

Mushegian, A., Medzhitov, R., 2001. Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J. Cell. Biol.* 155, 705-710.

Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M. 2001. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 3, 747-751.

Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D., Yamakawa, M. 2003. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 1624, 125-130.

Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Capello, M., Fikrig, E. 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* 11, 641-650.

Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttal, P.A., Stuart, D.I. 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Mol. Cell* 3, 661-671.

Pattnaik, P. 2005. Surface Plasmon Resonance, Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction. Virology Division, Defence Research and Development Establishment Jhansi Road, Gwalior 474 002 India. Humana Press Inc.

Pneumans, W.J., van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-352.

Podboronov, V.M. 1990. Comparative characteristics of lysozymes of different origin. *Antibiot Khimioter* 35, 22-25.

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

Rego, R.O., Kovář, V., Kopáček, P., Weise, C., Man, P., Šauman, I., Grubhoffer, L. 2006. The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 291-299.

Richens, J.L., Urbanowicz, R.A., Lunt, E., Metcalf, R., Corne, J., Fairclough, L., O'Shea, P. 2009. Systems biology coupled with label-free high-throughput detection as a novel approach for diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research.* 10.

Rossel, R., Coons, L.B. 1992. The role of fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. *Int. J. Parasitol.* 22, 341-349.

Ruppert, E.E., Barnes, R.D. 1994. *Intervertebrate zoology*, sixth edition. Saunders College Publishing.

Řeháček, J., Kováčová, E., Lisak, V., Rumin, W. 1990. Occurrence of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia slovacica* and organisms resembling bacillary rickettsiae in their natural foci in Slovakia 20 years after their first detection. *Folia Parasitol.* 37, 285-286.

Sekeyová, Z., Mediannikov, O., Subramanian, G., Kowalczywska M., Quevedo-Diaz, M., Kocianová, E., Raoult, D. 2012. Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. *Acta Virol.* 56 (3), 247-252.

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

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

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

Taylor, D. 2006. Innate Immunity in Ticks: A review. *J. Acarol. Soc. Jpn.* 15, 109-127.

Tsuji, N., Battseteg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J.H.jr., Fujisaki, K. 2007. Babesial vector tick defensin against *Babesia sp.* parasites. *Infect. Immun.* 75, 3633-3640.

Zhu, L., Zhang, X.J., Wang, L.Y., Zhou, J.M., Perett, S. 2003. Relationship between stability of folding intermediates and amyloid formation for the yeast prion Ure2p: a quantitative analysis of the effects of pH and Buffer system. *Jour. Mol. Biol.* 328, 235-254.