Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce a lokalizace fukosylovaných glykanů v klíštěcích buněčných liniích (*Ixodes ricinus*) s využitím alkynových derivátů fukózy

Bakalářská práce

Hana Zavadilová

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.
Školitelé specialisté: RNDr. Jarmila Dupejová, prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice 2013

Zavadilová, H., 2013: Detekce a lokalizace fukosylovaných glykanů v klíštěcích buněčných liniích (*Ixodes ricinus*) s využitím alkynových derivátů fukózy. [Detection and localization of fucosylated glycans in cell lines of tick (*Ixodes ricinus*) using alkyne-fucose derivates. BSc. Thesis, in Czech.] 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of study was the detection and localization of fucosylated glycans in the tick *Ixodes ricinus* cell lines using bioorthogonal chemistry. Fucosylated glycoproteins were detected in tick cell line homogenates by SDS-PAGE and Western blotting and localized in the cell by fluorescence and electron microscopy.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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, 13.12.2013 ……

Hana Zavadilová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům Jarce a Jankovi za to, že mě vzali pod svá křídla, naučili mě pracovat v laboratorním prostředí a umožnili mi podílet se na jejich práci. Také bych jim ráda poděkovala za velkou trpělivost při učení všech metod a hlavně při psaní této práce, kdy mi byli oporou a pomohli vždy, když jsem si nevěděla rady. Dále bych ráda poděkovala profesoru Liboru Grubhofferovi, že mě přijal do laborky a umožnil mi poznat nové lidi a naučit se novým věcem. Také děkuji všem z laborky 327 za pomoc při práci a přátelské prostředí. Děkuji Marušce Vancové, že mi ukázala co to je elektronová mikroskopie a strávila se mnou plno svého času při učení metod.

Za největší podporu při psaní děkuji svému příteli Péťovi, který se mnou měl pevné nervy a vždy mě podržel, když už jsem začala všechno vzdávat a mnohokrát mi pomohl se psaním samotným. Velké díky patří také mým rodičům za podporu a hlavně možnost studovat na této škole, bez nich bych nebyla tam, kde teď jsem. Také děkuji všem svým kamarádům, zejména Verče a Radkovi, kteří mě kdykoliv vyslechli a rozesmáli.

OBSAH

ÚVOD 1
CÍLE PRÁCE 2
LITERÁRNÍ PŘEHLED 3
3.1 KLÍŠŤATA 3
3.1.1 Klíště druhu Ixodes ricinus 5
3.2 NEMOCI PŘENÁŠENÉ KLÍŠŤATY 6
3.2.1 Klíšťová encefalitida 6
3.2.2 Lymská borelióza 6
3.2.3 Tularémie 7
3.2.4 Babesióza 7
3.3 KLÍŠTĚCÍ BUNĚČNÉ LINIE 8
3.4 GLYKOPROTEINY 8
3.5 GLYKOSYLACE 9
3.5.1 O-glykosylace 9
3.5.2 N-glykosylace 10
3.6 GLYKOSYLACE U BEZOBRATLÝCH 11
3.6.1 Glykosylace u klíšťat 13
3.7 BIOORTOGONÁLNÍ CHEMIE 13
3.8 FLUORESCENČNÍ A ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE 15
3.8.1 Fluorescenční mikroskop 15
3.8.2 Elektronový mikroskop 15
MATERIÁLY A METODY 17
4.1 CHEMIKÁLIE 17
4.1.1 Inkubace klíštěcích buněk s alkyn-fukózou: 17
4.1.2 Značení klíštěcích buněk pro fluorescenční mikroskopii: 17
4.1.3 Příprava proteinů z klíštěcích buněk 17
4.1.4 SDS-PAGE elektroforéza 18
4.1.5 Western blotting 18
4.1.6 Elektronová mikroskopie 18
4.2 METODY 20
4.2.1 Kultivace klíštěcích buněk s alkyn-fukózou 20

4.2.2 Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii 20
4.2.3 Příprava proteinů z klíštěcích buněk 22
4.2.4 Elektronová mikroskopie 25
VÝSLEDKY 27
5.1 Fluorescenční mikroskopie 27
5.2 Elektronová mikroskopie 31
5.3 Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a afinoblotu 32
DISKUZE 36
ZÁVĚR 39
CITACE 40

ÚVOD

Klíšťata spolu s komáry patří mezi nejčastější krevsající ektoparazity člověka a zvířat. Setkáváme se s nimi po celém světě a patří mezi nejvýznamnější přenašeče patogenů, kteří jsou původci různých onemocnění. Mechanismus jejich přenosu klíšťaty není stále dostatečně vysvětlen.

Fukosylované glykany byly prokázány v různých klíštěcích vzorcích ve velkém množství a jejich role byla také prokázána pro infekci klíštěte patogenem *Anaplasma marginale.*

Cílem mé bakalářské práce bylo prokázat přítomnost fukosylovaných glykanů v klíštěcích buněčných liniích za použití alkynových derivátů fukózy a využít tyto deriváty pro specifickou detekci glykanů pouze klíštěcího původu.

CÍLE PRÁCE

- Kultivace klíštěcích buněčných linií za přítomnosti alkynových derivátů fukózy.
- Lokalizace značených fukosylovaných glykanů pomocí fluorescenčního mikroskopu a elektronové mikroskopie.
- Detekce značených fukosylovaných glykanů pomocí SDS-PAGE a Western blotu.
- Purifikace proteinů a jejich identifikace hmotnostní spektrometrií.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

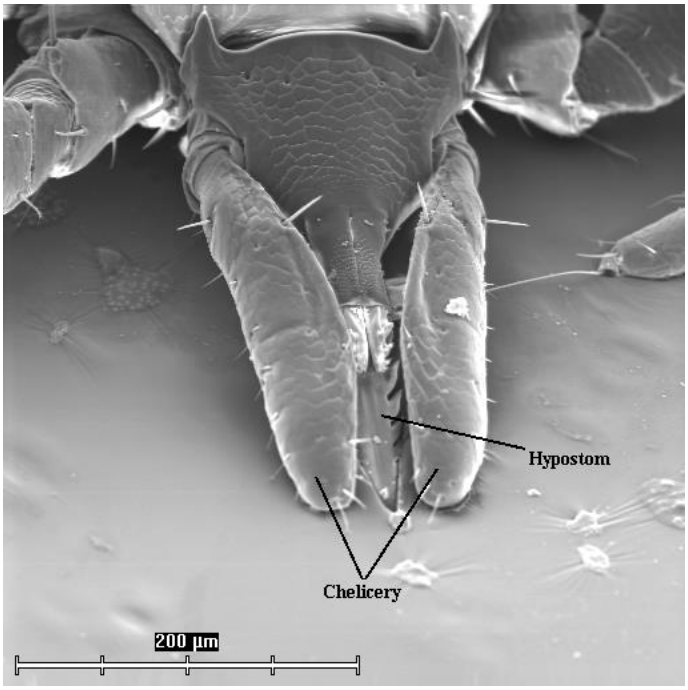
3.1 KLÍŠŤATA

Klíšťata patří mezi roztoče (Acarina), do třídy pavoukovci (Arachnida), do řádu Ixodida a čeledi Ixodidae. Čeleď Ixodidae zahrnuje přibližně 650 druhů. V České republice jsou nejznámějšími zástupci klíšťat klíště obecné (*Ixodes ricinus*), piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) a klíšť lužní (*Haemaphysalis concinna*). Poslední dva zástupci se vyskytují převážně na jižní Moravě.

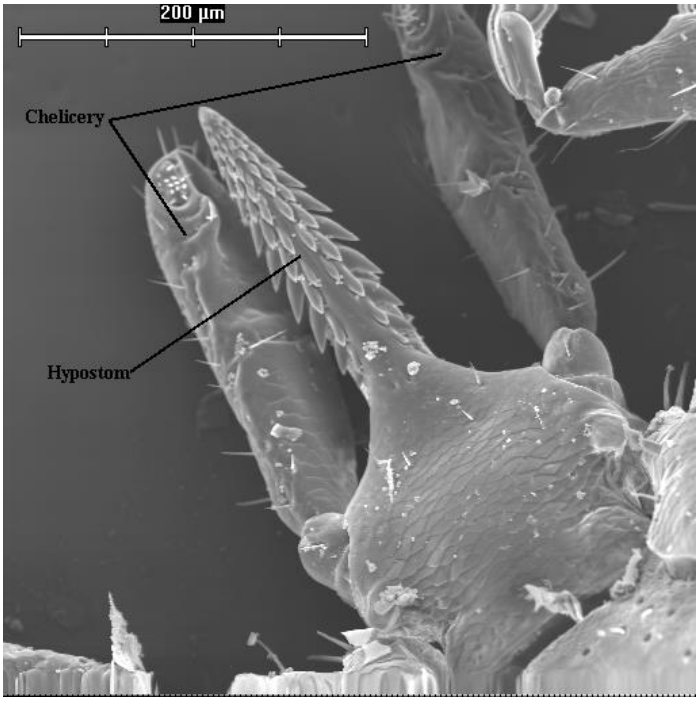
Klíšťata jsou krevsající členovci, kteří mají čtyři vývojová stádia: vajíčko, larva, nymfa a imago (dospělec). Larva klíštěte se po nasátí krve z hostitele mění v nymfu a po dalším sání v imago, tedy v dospělého jedince (Hoogstraal, 1978). Většina druhů klíšťat potřebuje ke svému vývoji tři různé hostitele, neboli mají trojhostitelský cyklus (*Rhipicephalinae s. l., Haemaphysalinae* a mnoho dalších *Ixodidae*). Některé druhy klíšťat jsou ale dvou- (všechny *Rhipicephalus* a některé druhy *Hyalomma*) nebo jednohostitelská (všechny druhy *Boophilus, Anocentor nitens* a *Dermacentor albipictus*) (Murrel a spol., 2001).

Tito roztoči se vyskytují hlavně na vlhkých stanovištích, nejvíce v lesích s travnatým porostem. Nesvědčí jim přílišné teplo a sucho, a proto je můžeme potkat v listnatých i smíšených lesích, na jejich okrajích či na vlhkých loukách. V průběhu roku mají klíšťata dvojvrcholový výskyt, kdy se nejvíce objevují na jaře okolo května a na podzim během září (Randolph, 2008).

Jak už bylo zmíněno, klíšťata se živí jedině krví z hostitele, u dospělců ale krev saje obvykle pouze samička. Dospělí samci u některých druhů včetně klíšťat rodu *Ixodes* krev nesají, pouze se samičkami kopulují a to nejčastěji na hostiteli (Volf a spol., 2007). K sání krve mají vyvinuté bodavé sací ústrojí, které se skládá z hypostomu a chelicer. Bodavé ústrojí je ukázáno na Obr. 1 a 2. Klíšťata napadají člověka, suchozemské savce, ještěrky, hady a ptáky. Spolu s komáry patří mezi velmi nebezpečné přenašeče různých onemocnění (Volf a spol., 2007).



Obrázek 1: Sací ústrojí klíštěte *Ixodes ricinus*, snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu – pohled shora.



Obrázek 2: Sací ústrojí klíštěte *Ixodes ricinus*, snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu – pohled zdola.

3.1.1 Klíště druhu Ixodes ricinus

Klíště obecné (*I. ricinus*) je rozšířeno hlavně v mírném pásmu Evropy a Asie, ale žije také v severní Americe a Africe. *I. ricinus* se nejvíce vyskytují v nížinách ve vlhkém prostředí. Tato klíšťata jsou slepá (na rozdíl například od rodu *Dermacentor*, který oči má) a reagují pouze na hostitelem vydechovaný CO_2 (popřípadě jiné signální molekuly) pomocí speciálního orgánu - Hallerův orgán (Volf a spol., 2007). Na Obr. 3 jsou znázorněna jednotlivá stádia tohoto klíštěte a jejich přibližné velikosti.

Obrázek 3: Jednotlivá životní stádia klíštěte *I. ricinus* a jejich velikosti v milimetrech.

(http://www.mudrvincent.cz/klistova-encefalitida)

Klíště obecné je trojhostitelský ektoparazit se životními stádii larva, nymfa a dospělec. Larva má pouze tři páry nohou a nejčastěji saje na drobných hlodavcích. Následuje metamorfóza v nymfu, která má 4 páry nohou a saje již na větších zvířatech (zajíc, pes atd.). Následuje konečná přeměna v dospělce, u kterých saje pouze samička a to na větších zvířatech jako srnčí, koně či člověk. Celý tento vývoj, od vajíčka po dospělce, trvá obvykle 2-3 roky. Klíště obecné je jedním z hlavních ektoparazitů člověka a přenašečem závažných onemocnění lidí, hlavně lymské boreliózy a klíšťové encefalitidy v ČR a v Evropě. Dále může přenášet i tularémii, ehrlichiózu (anaplazmóza) či babeziózu (Schorn a spol., 2011).

3.2 NEMOCI PŘENÁŠENÉ KLÍŠŤATY

Při napadení hostitele klíště prorazí jeho kůži pomocí hypostomu a vypustí sliny, které obsahují různé látky pro tlumení bolesti (anestetika), proteiny vázající histamin (protizánětlivý účinek) a jiné látky tlumící zánět nebo imunitní reakci. Další farmakologicky aktivní molekuly zvyšují průtok krve v ráně a blokují srážení krve (Štibrániová a spol., 2013). Mezi nejčastější nemoci přenášené klíšťaty patří klíšťová encefalitida, lymská borelióza, tularémie a babezióza.

3.2.1 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida nebo také klíšťová meningoencefalitida (KE, angl. zkratka TBE – tick-borne encephalitis), je způsobena arboviry z rodu Flavivirus a patří mezi zánětlivá onemocnění centrální nervové soustavy. Flaviviry jsou viry o velikosti přibližně 50 nm s glykoproteinovými výběžky a jedno-řetězcovou lineární RNA. Tyto viry se do klíšťat dostávají při sání z malých obratlovců, například z hlodavců nebo z lesních zvířat (Bednář a spol., 1996).

KE se může projevovat jako zánět mozku, zánět mozkové membrány a míchy nebo zánět mozku i mozkových plen. U nemocných dochází většinou k neurologickým problémům, horečnatým stavům, halucinacím a poruchám spánku. Toto onemocnění je nejvíce závažné u dospělých nad 60 let a malých dětí (Dumpis a spol., 1999). Pokud se nemoc nepodchytí včas, může dojít až k ochrnutí a ve vzácných případech k úmrtí. Léčba se většinou provádí podáváním analgetik a antipyretik.

V dnešní době existuje proti klíšťové encefalitidě očkování, které je velmi účinné a snižuje počet nakažených. Další možnost jak se chránit, je nosit do míst výskytu klíšťat správné oblečení, jako jsou dlouhé kalhoty nebo používat ochranné prostředky (repelenty apod.).

3.2.2 Lymská borelióza

Lymská borelióza je infekční onemocnění způsobené bakteriemi komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Tyto bakterie mají spirálovitý tvar, pohybují se pomocí periplazmatických bičíků a patří mezi gramnegativní bakterie ze skupiny spirochét. Přenašeči těchto patogenů jsou hlavně drobní hlodavci, ze kterých se bakterie do klíšťat dostanou při sání jejich krve.

V případě přenosu borelie na člověka se většinou přibližně po dvou týdnech od sání klíštěte objeví v místě sání skvrna (*erythema migrans*) se zarudlými okraji (Volf a spol., 2007). Mezi další příznaky patří únava, bolest hlavy, artritida, v horších případech pak spirochéty - borelie napadnou periferní nervy nebo centrální nervovou soustavu (Burrascano, 2008). Mezi nejvíce známé lidské patogeny patří *B. afzelii, B. garinii* a *B. burgdorferi*. Příznaky se mohou lišit u různých kmenů borelií. Například při nakažení *B. garinii* jsou častější neurologické projevy nemoci, u *B. burgdorferi* je častější spíše artritida a *B. afzelii* způsobuje primárně kožní infekce (Gerold a Strle, 2003).

Pokud se onemocnění zjistí včas z krevních testů, pomáhá velmi účinně léčba antibiotiky (erytromycin, doxycyklin, amoxycilin, azithromycin). Proti tomuto onemocnění neexistuje bohužel žádná humánní vakcína.

3.2.3 Tularémie

Tato nemoc se také někdy nazývá zaječí nemoc, protože postihuje nejčastěji zajíce či hlodavce. Způsobuje ji gramnegativní tyčinkovitá bakterie *Francisella tularensis*.

Přenašeči jsou opět hlodavci (hlavně zajíci a králíci). Člověk se může nakazit od klíštěte, které sálo krev nakaženého zvířete nebo přímo infikovaným zvířetem přes sliznice či špatně upraveným masem (Ghaffar, 2010).

V místě vniknutí se objeví vřed, následuje horečka, zimnice a lymfadenopatie. K léčbě se nejčastěji používá streptomycin, dále pak rifampicin. Existuje i prevence pomocí vakciny.

3.2.4 Babesióza

Babesióza je způsobena prvoky rodu *Babesia*, druhu *B. divergens* nebo *B. bovis*.

Babesie vegetují v červených krvinkách hostitele (hlodavec), kde se vytvářejí stádia zvaná merozoit. Jakmile se na hostitele přisaje klíště, babesie se dostávají krví do střeva klíštěte. Odtud se pak dostávají do slinných žláz klíštěte, kde se vyvíjejí sporoblasty obsahující budoucí sporozoity. Po přisátí klíštěte na teplokrevné obratlovce (hlodavec apod.) se uvolní zralé sporozoity. Ti napadají erytrocyty a dále se mění v další stádia (trofozoity, meronty a merozoity) až dojde k rozpadu buňky a napadení dalších erytrocytů (Hausmann a Hülsmann, 2003).

Mezi hlavní příznaky patří únava, deprese, bolest hlavy, zvracení a horečky. Nejlepší léčba je podávat antibiotika (kombinace chininu a klindamycinu). Vakcína proti babesiím zatím není k dostání. Toto onemocnění často doprovází lymskou boreliózu (Homer a spol., 2000).

3.3 KLÍŠTĚCÍ BUNĚČNÉ LINIE

Termín buněčné kultury anebo buněčné linie označuje soubory buněk, které jsou pěstovány *in vitro* v kultivačních médiích a většinou mají neomezenou životnost a schopnost neomezeného buněčného dělení.

V případě klíštěcích buněčných linií není jasné, jaké typy buněk tyto kultury obsahují. Používají se linie odvozené od různých klíšťat, například IRE (*I. ricinus* embryo), DAE (*D. andersoni* embryo), AVL (*Amblyomma variegatum* larva), RAN (*Rhipicephalus appendiculatus* nymph) a mnoho dalších. Celkem je známo přes 40 buněčných linií (Bell-Sakyi a spol., 2007).

Klíštěcí buněčné linie jsou užitečné pro výzkum vztahu hostitel - vektor - patogen, pro studium interakcí mezi klíštěcími buňkami a virovými či bakteriálními patogeny. Jsou vhodné pro výzkum klíšťat a patogenů přenášených klíšťaty, popřípadě k výzkumu léčby onemocnění způsobených těmito patogeny.

3.4 GLYKOPROTEINY

Glykoproteiny jsou bílkoviny, které vznikají procesem nazývaným glykosylace. Tyto bílkoviny obsahují kovalentně navázanou cukernou (sacharidovou) složku, díky níž se glykoproteiny stávají hydrofilnější. Sacharidovou složku nazýváme také glykan. Mezi glykoproteiny patří například různé hormony, enzymy, plasmové a membránové bílkoviny (Kodíček, 2004).

Vazba sacharidu na protein probíhá během posttranslační modifikace proteinu, kdy jsou k molekule proteinu připojovány různé sacharidové podjednotky a vznikají tak různé varianty glykoproteinů. Tyto modifikace jsou důležité pro různé funkce proteinů, ovlivňují jejich stabilitu, rozpustnost nebo enzymovou aktivitu. Připojené sacharidy se rovněž podílejí na interakci receptoru s ligandem. Příkladem receptoru a ligandu je například C-terminální

doména CD69 vážící vápník (Pavlíček a spol., 2003). Proces glykosylace má často ochrannou funkci. Chrání před proteolýzou, stabilizuje protein v prostředí s vysokým či velmi nízkým pH (Kundra a Kornfeld, 1999).

Protein je syntetizován v ribosomu, ale sacharidová část je připojována pomocí posttranslačních modifikací v endoplazmatickém retikulu (ER) a Golgiho aparátu (GA). Sacharidová složka může být připojena přes dva základní druhy vazeb – *O*-glykosidovou nebo *N*-glykosidovou vazbou na postranní řetězec aminokyselin (viz níže). Máme tedy dva základní typy glykosylace, *O*-typ a *N*-typ. Dalším častým typem glykosylace je *C*-typ (Varki a spol., 2009).

O-glykosidovou vazbou je sacharidová část připojena na aminokyseliny serin anebo threonin přes -OH skupinu. Takové glykoproteiny se nazývají *O*-glykoproteiny.

N-glykosidovou vazbou je sacharidová část připojena na $-NH_2$ skupinu asparaginu. Tyto glykoproteiny se nazývají *N*-glykoproteiny. *N*-glykosidové vazby a některé *O*-glykosidové vazby jsou zprostředkované pomocí *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc), který představuje jednu z nejdůležitějších složek glykoproteinů (Varki a spol., 2009).

3.5 GLYKOSYLACE

Glykosylace je proces, kdy se k proteinu enzymaticky připojuje sacharidová složka (glykan). Vazba je převážně *O*-glykosidová nebo *N*-glykosidová. Rozmanitost glykosylace je ale obrovská ať už mezi druhy, v rámci jednoho druhu či v biologických strukturách toho samého organizmu (Gagneux a Varki, 1999).

3.5.1 O-glykosylace

O-glykany jsou vázány na hydroxylovou skupinu aminokyselin serinu nebo threoninu (Wilson a spol., 2009). Připojené glykany pak mohou podléhat dalším modifikacím, jako je acetylace nebo sulfatace.

Jedním ze základních sacharidů, který se připojuje k proteinu, je *N*-acetyl-α-D-galaktosamin (GalNAc). Dále je v GA obvykle připojen další sacharidový zbytek a to galaktóza. Následně jsou častokrát připojené dva zbytky záporně nabité kyseliny sialové, což je specifické hlavně pro obratlovce (Lodish a spol., 2000). Podobným způsobem mohou

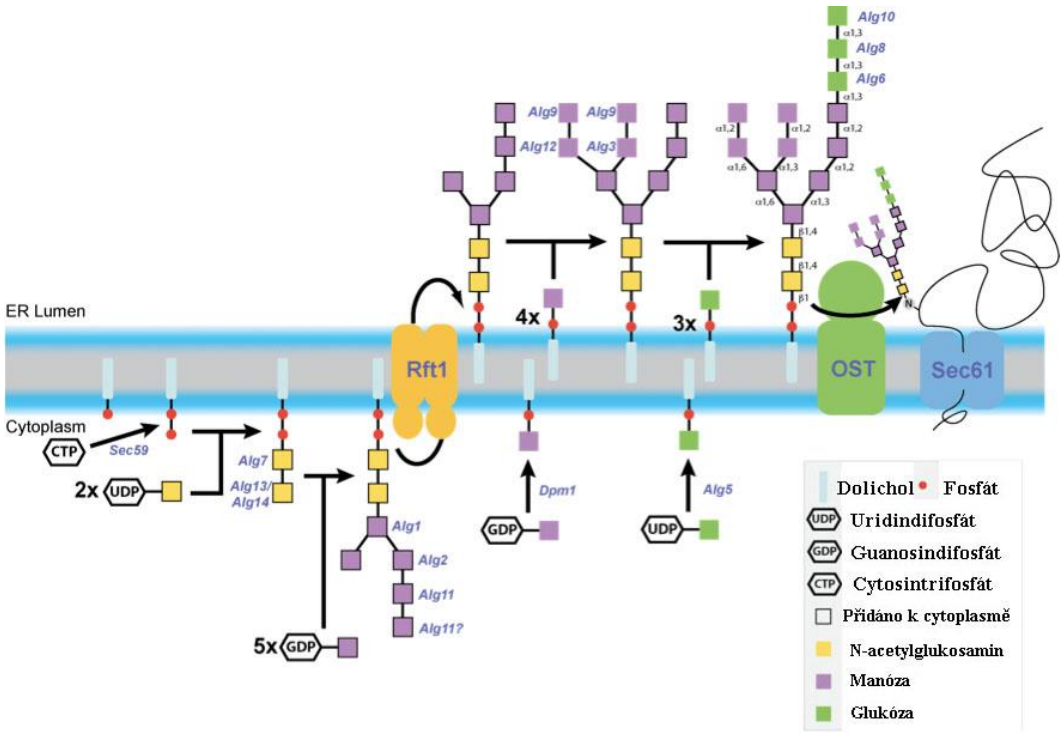
vznikat i další struktury připojením jiných glykanů jako je GlcNAc, manóza nebo fukóza (Patsos a spol., 2009).

O-glykosylace je na rozdíl od *N*-glykosylace mnohem více různorodá, co se týče glykosylačních míst nebo enzymů a výsledných struktur (Wilson a spol., 2009).

3.5.2 N-glykosylace

N-glykosylace, neboli připojení molekul sacharidů na -NH_2 skupinu asparaginu je nejběžnějším typem glykosylace u eukaryotických organismů. K výzkumu tohoto procesu velmi přispělo studium kvasinek (Aebi, 2013), hojně využívaným modelovým organismem je také háďátko *Caenorhabditis elegans* (Hanneman a spol, 2006).

Celý proces *N*-glykosylace začíná v ER, do jehož membrány se naváže lipidový nosič dolichol, tvořený dlouhým řetězcem isoprenů. Na jeho fosfátovou skupinu se postupně navazují dva *N*-acetylglukosaminy a pět manóz. Následně se k tomuto komplexu připojí další 4 manózy a 3 glukózy a vznikne prekurzor $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (Lodish a spol, 2000). Schéma je znázorněno na Obr. 4



Obrázek 4: Schéma *N*-glykosylace.

(http://clemonslab.caltech.edu/uploads/1/2/8/1/12817760/610200_orig.png)

Tento prekurzor je připojen k asparaginu v sekvenci proteinu Asn-Xxx-Ser/Thr (angl. sequon), kde Xxx může být jakákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu. U všech organismů platí všeobecně tato sekvence, pouze u bakterií je tato sekvence rozšířená na Asp-Xxx-Asn-Xxx-Ser/Thr (Weerapana a spol., 2006). Těsně před opuštěním ER se z *N*-vázaného oligosacharidu většinou odštěpí 3 glukózy a 1 manóza a zbylý glykoprotein je přemístěn do GA. Zde dochází k postupným úpravám, až nakonec vznikne konečná podoba oligosacharidu, který může obsahovat 4 GlcNAc, 3 kyseliny sialové, 3 galaktózy, 3 manózy a jednu fukózu. Stavba oligosacharidu se liší u jednotlivých organismů (Gabius, 2009). Například bakterie používají glykany které obsahují bacillosamin pro adhezi k hostitelské buňce, pseudoaminovou kyselinu a její deriváty. Archebakterie mohou mít ve svých oligosacharidech 2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-β-glukuronovou kyselinu nebo 2-acetamido-2-deoxy-β-manuronovou kyselinu. U rostlin převládají hlavně glykany typu high-mannose, u nižších eukaryot glykany α1,3-fukosylované a u vyšších eukaryot převážně paucimanózové glykany (Voisin a spol., 2005).

3.6 GLYKOSYLACE U BEZOBRATLÝCH

Většina posttranslačních modifikací, které jsou známé u savců, jsou známé i u bezobratlých. Převážně se proces glykosylace u rostlin, bezobratlých a savců mezi sebou liší. Nejvíce tyto modifikace byly prozkoumány u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) (Gabius, 2009). V současné době nejsou ale dobře známé enzymatické pochody vedoucí ke glykosylaci u bezobratlých.

Velmi dobře byly N- a O-glykany popsány u *D. melanogaster*. *N*-glykany jsou u *D. melanogaster* méně rozvětvené než u savců. Nejvíce dominantními *N*-vázanými strukturami jsou glykany manózového typu, které mají velmi často fukosylovaná jádra – to znamená, že na proximální GlcNAc je připojena fukóza. Identifikovány byly také tzv. paucimanózové glykany (oproti glykanům manózového typu se liší tím, že mají fukosylované jádro) a glykany obsahující kyselinou sialovou, které se našli v buňkách střeva (Aoki a spol., 2007).

Výzkum glykosylace a glykoproteinů byl intenzivně studován i u modelového organismu háďátka *C. elegans*. Při výzkumu Burnham-Marusich a spol (2012) bylo zjištěno, že embryonální buňky *C. elegans* si dokáží inkorporovat azidové analogy *N*-

acetylgalaktosaminu a *N*-acetylglukosaminu. Díky výzkumu glykoproteinů se podařilo identifikovat několik nových glykoproteinů *C. elegans*, které patřily k mitochondriálním proteinům (Burnham-Marusich a spol., 2012).

Nejčastější fukosylované *N*-glykany u vyšších organismů jsou α1,6-fukosylované. Glykany α1,3-fukosylované jsou společným znakem hmyzích, parazitických a rostlinných *N*-glykanů a vedou k produkci protilátek IgE a alergické reakci u obratlovců (Bencúrová a spol., 2004). Toto se například týká včel, kdy jsou α1,3-fukosylované glykany rozeznávány IgE protilátkami pacientů alergických na včelí jed (Tretter a spol., 1993).

U hlístice *Haemonchus contortus*, která napadá domácí přežvýkavce a je rezistentní k většině užívaných antihelmintik, se zjistilo, že její imunogenní proteiny jsou také glykosylované. Díky tomuto zjištění se vědci snaží najít vakcínu, která by byla založena na vytváření protilátek následně sloužících k identifikaci proteinů na povrchu střeva. Jako jeden z kandidátů byl identifikován protein H11, který je *N*-glykosylovaný (Haslam a spol., 1996). U nematod *Acanthocheilonema viteae* a *Onchocerca volvulus* bylo zjištěno, že jejich buňky obsahují fosforylcholin navázaný na glykoproteiny, který sekretují během parazitování do hostitele. Předpokládá se, že fosforylcholin ovlivňuje imunitní systém tím, že inhibuje proliferaci T-lymfocytů (Haslam a spol., 1999).

U plžů byly rozsáhle studovány *N*-glykanové struktury pocházející z jejich kůže a střeva. Tento výzkum by mohl velmi pomoci při vývoji nových buněčných kultur nebo při identifikaci epitopů sacharidů, které by mohli být podstatné pro imunitní odpověď. Plži jsou schopni produkovat všechny glykosylované struktury jako mají savci, rostliny či jiní bezobratlí. U plžů bylo zjištěno, že obsahují hlavně oligomanosidické glykoproteiny, dále obsahují methylované manosidické glykoproteiny či α1,6-fukosylované glykoproteiny (Gutternigg a spol., 2007).

U bezobratlých živočichů bylo prokázáno, že protein-sacharidové interakce mají roli ve vztahu parazit-hostitel (Comstock a spol., 2006) a parazit-patogen (Pedra a spol., 2010). Comstock a jeho spolupracovníci (2006) ve své práci diskutují o tom, že mnoho bakterií má svojí vnější vrstvu složenou z glykanů, kterou využívají při interakci s buňkami hostitele. Pedra a jeho spolupracovníci (2010) zkoumali bakterii *A. phagocytophilum*, kterou přenáší klíště *I. scapularis* a který u lidí způsobuje granulocytní anaplazmózu (podrobněji popsáno v kapitole 3.6.1).

3.6.1 Glykosylace u klíšťat

O glykosylaci členovců bylo v minulosti zjištěno velice málo informací a k jejich studiu nejvíce přispělo značení lektiny a enzymatická deglykosylace (Gabius, 2009). V poslední době je glykosylace více zkoumána díky rozvoji a větší dostupnosti hmostnostních spektrometrů. U klíšťat bylo nejvíce různých glykoproteinů nalezeno ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* (Uhlíř a spol., 1994), například sialové glykany (Vancová a spol., 2006 a 2012). Bylo také prokázáno, že glykoproteiny ze slinných žláz klíštěte fungují jako antigenní determinanty pro imunitní odpovědi hostitele (Francischetti a spol., 2009).

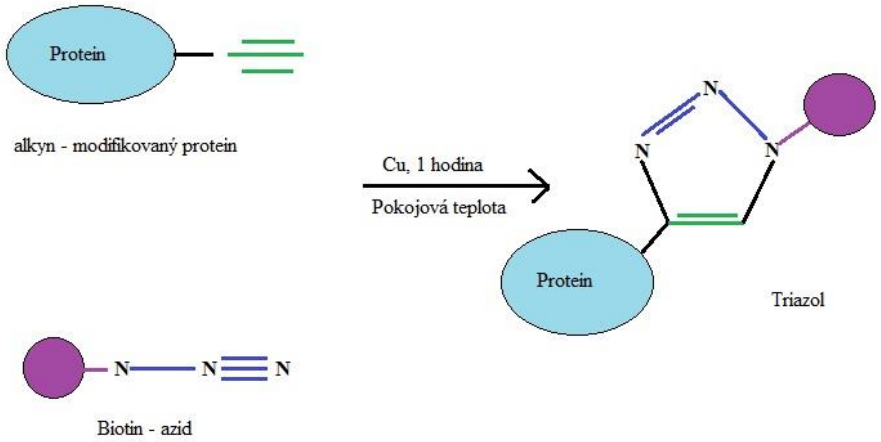
U klíštěte *Ornithodoros moubata*, které je přenašečem bakterie *B. duttoni*, byl z hemolymfy izolován lektin Dorin M (Kovář a spol., 2000). Analýzou hmotnostní spektrometrií byly u něj identifikovány glykany manózového typu a glykany s fukózou vázanou na jejich jádře (Man a spol., 2008). U lektinu Dorin M bylo zjištěno, že má fibrinogen-related doménu a je podobný tachylektinům u ostrorepa (Marchalonis a Edelman, 1968). Tachylektiny rozpoznávají cizorodé molekuly, takže se dá předpokládat, že podobnou funkci má i lektin Dorin M u klíšťat.

Pedra a jeho spolupracovníci (2010) zjistili, že bakterie *A. phagocytophilum* modifikuje expresi α1,3-fukosyltransferáz u infikovaného klíštěte a že umlčení genů RNA inhibicí této fukosyltransferázy snižuje kolonizaci klíštěcích buněčných linií anaplasmami. Tyto výsledky pomohly odhalit nové mechanismy patogenní kolonizace u členovců (klíšťat).

3.7 BIOORTOGONÁLNÍ CHEMIE

Bioortogonální chemie je souhrnný název pro všechny reakce, které mohou probíhat uvnitř živých systémů a nezasahují přitom do přirozených biochemických procesů (Sletten a Bertozzi, 2009). Tato chemie využívá modifikovaných molekul, které nesou malou reaktivní skupinu (sondu). Malá velikost těchto přídavných skupin umožňuje využití těchto molekul enzymy organismu. Na reaktivní skupiny, které nesou tyto modifikované molekuly, se poté mohou specificky navázat další molekuly nesoucí například fluorescenční barvy, nanočástice zlata a mnoho dalších. Molekuly nesoucí tyto malé skupiny je pak možné detekovat například blotovacími metodami nebo pod mikroskopem.

Jednou z reakcí využívající bioortogonálně značené molekuly je Click reakce. Click reakce byla poprvé definována Karlem Barrym Sharplessem v roce 2001. Při Click reakci mohou být využívány malé funkční molekuly – azidy a alkyny. Jedna z těchto skupin (azid nebo alkyn) je konjugována například s molekulou sacharidu a druhá je konjugována značkou (fluorofor, biotin), která se pak použije pro následnou detekci. Při této reakci se tvoří pouze 1,4-substituované produkty a jde o cykloadici, katalyzovanou ionty Cu^{+}. Její výhodou je, že průběh této reakce není závislý na rozpouštědle, ve kterém probíhá, a může se tedy provádět v různých rozpouštědlech a při pokojové teplotě (Lahann, 2009). Mezi další výhody Click reakce patří její rychlost. Reakce probíhá až 107x rychleji než nekatalyzované reakce a má velmi vysoký výtěžek. Všechny chemikálie potřebné pro tuto reakci jsou také velmi stabilní (Lahann, 2009).



Obrázek 5: Schéma Click reakce.

V současnosti jsou dostupné cukerné analogy modifikované chemicky inertní alkynovou anebo azidovou skupinou. S alkyny a azidy se dají konjugovat kromě cukrů také nukleosidy, aminokyseliny či lipidy. Díky malé velikosti alkynu a azidu jsou odpovědné enzymy nadále schopné inkorporovat tyto cukerné analogy do glykanů za předpokladu, že jsou tyto enzymy v daném organismu nebo tkáni exprimovány. Alkyny a azidy se dají následně jednoduše označit pomocí výše popsané Click reakce.

Jednou z možností detekce značených proteinů je využití odpovídajícího alkynu anebo azidu konjugovaného s biotinem (Obr. 5) anebo také různými běžně používanými detekčními činidly. Glykany s navázaným biotinem jsou pak snadno detekovatelné pomocí

Streptavidinu značeného vhodnou značkou a následným Western blottingem, fluorescenční anebo elektronovou mikroskopií. Takto značené glykany resp. glykoproteiny, je rovněž možné izolovat pomocí afinitní chromatografie.

Při své práci jsem inkubovala klíštěcí buňky s fukózou, která na sobě měla navázaný alkyn, buňky tuto fukózu zabudovaly do svých glykoproteinů a při Click reakci byly označeny biotin-azidem. Azid a alkyn za působení katalyzátoru Cu^{+} vytvořily triazol, čímž se bioortogonálně značené fukosylované proteiny podařilo naznačit biotinem.

Biotinem značené glykany jsem dále detekovala a purifikovala pomocí Streptavidinu, který vykazuje specifickou a silnou vazbu na biotin. Streptavidin byl konjugován s alkalickou fosfatázou, FITC a nanočásticemi zlata. K detekci jsem využila western blotting, fluorescenční a elektronovou mikroskopii, purifikaci jsem provedla afinitní chromatografií.

3.8 FLUORESCENČNÍ A ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

3.8.1 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop patří mezi optické mikroskopy, který využívá k zobrazení vzorku fluorescenci, tedy excitační záření. Fluorescence je jev, kdy fluorochromy po dopadu světla kratší vlnové délky vyzařují světlo o delší vlnové délce. Tato metoda se používá pro zviditelnění některých struktur v buňce. Pozorované objekty musí být označeny fluorochromem (fluorescenčním barvivem). Používají se například barvy FITC (fluorescein-5-isothiokyanát), TRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát), DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol), ethidium bromid apod.

Pozorované buňky se před značením obvykle zafixují. Jedním z nejčastěji používaných fixačních činidel je paraformaldehyd. Po fixaci a permeabilizaci, která umožňuje průnik barviva dovnitř buňky, se provádí značení fluorescenčními barvami.

3.8.2 Elektronový mikroskop

Elektronový mikroskop k zobrazení vzorku využívá elektrony dopadající na vzorek skrze soustavu čoček. Běžně se využívají dva základní typy elektronových mikroskopů: transmisní (TEM) a skenovací (SEM). TEM umožňuje pozorovat vzorky o tloušťce 40 - 100 nm a pomocí SEM se prohlíží povrchové struktury vzorku.

Stejně jako u fluorescenčního mikroskopu i u elektronového mikroskopu je potřeba vzorky před analýzou fixovat. Fixaci lze provést chemicky různými činidly nebo fyzikálními postupy, například změnou teploty. Nejúčinnější je chemická fixace, kdy se využívá hlavně glutaraldehyd, paraformaldehyd či oxid osmičelý.

Dále se v elektronové mikroskopii využívají metody kryo-elektronové mikroskopie, kdy se po fixaci vzorky zalijí do želatiny, dají se do koncentrovaného roztoku sacharózy (kryoprotektant) a následně se zmrazí tekutým dusíkem. Takto připravené vzorky se pak krájí na mikrotomu s kryo komorou, která chladí celý systém, aby nedošlo k rozmrazení a poškození vzorku. Takto připravené vzorky se naznačí pomocí imunoznačení a pak se prohlížejí v TEM, který je vybavený kryo komorou.

SEM se využívá pro zobrazení povrchových struktur pozorovaného objektu a můžeme tak pozorovat i mnohem větší nebo celé objekty. Objekt se musí před pozorováním očistit, aby se na něm nevyskytovaly nežádoucí částice, jako je prach apod. Poté se vzorek musí zafixovat pomocí fixačních činidel. Mezi nejlepší fixační činidla patří glutaraldehyd či oxid osmičelý. Po fixaci se musí vzorek odvodnit pomocí ethanolu či acetonu, kdy vzorek projde řadou roztoků o zvyšující se koncentraci ethanolu či acetonu. Poté se vzorek vysuší metodou kritického bodu. Tato metoda je založena na principu, kdy se kapalina zahřívá v omezeném prostoru a docílí tak kritického stavu (kritická teplota a tlak), kdy mizí rozdíly mezi oběma fázemi dané látky. V tuto chvíli se převede kapalina na plyn a ten se vypustí z komory. Nakonec se vzorek přilepí na nosič (nejčastěji hliníkové podložky) a nechá se potáhnout vrstvičkou kovu (nejčastěji zlatem).

MATERIÁLY A METODY

4.1 CHEMIKÁLIE

4.1.1 Inkubace klíštěcích buněk s alkyn-fukózou:

Medium L15 pro buněčnou linii IRE/CTVM 19: 20% Bofes (bovine fetal serum), 1% glutamin, 10% TPB (tryptose phosphate broth), 100 U/ml penicilin, 100 μg/ml streptomycin

Alkyn-fukóza: alkyn-fukóza (Life Technologies) v mediu L15

Trypanová modř – 0,5% vodný roztok

4.1.2 Značení klíštěcích buněk pro fluorescenční mikroskopii:

1x PBS pH 7,4: 0,137 M NaCl, 2,68 mM KCl, 2,57 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4

Fixační roztok: 4% paraformaldehyd v 1x PBS pH 7,4

Permeabilizační roztok: 0,25% Triton X-100 v 1x PBS pH 7,4

Blokovací roztok: 3% BSA (Bovine serum albumin) v 1x PBS pH 7,4

1% BSA v 1x PBS pH 7,4

Click-iT Cell Reaction Buffer Kit (Life Technologies)

Biotin-azid (Life Technologies): ředění 1:1000

Streptavidin DyLight®549 (Vector Laboratories): ředění 1:1000 v 1% BSA v PBS pH 7,4

Streptavidin Dylight®488 (Vector Laboratories): ředění 1:1000 v 1% BSA v PBS pH 7,4

VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)

4.1.3 Příprava proteinů z klíštěcích buněk

1x PBS pH 7,4

Lyzační pufr: 1% SDS v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Inhibitory proteáz: HALT ™ Protease Inhibitor Single-USE Cocktail 100x (Thermo Scientific)

Click-iT Protein Reaction Buffer Kit (Life Technologies)

Biotin-azid (Life Technologies)

Methanol

Chloroform

Magnetické kuličky: MagSi – STA 1.0 (Magna Medics)

10% NP-40

4.1.4 SDS-PAGE elektroforéza

30% Akrylamid mix (Merck): směs akrylamidu a bis-akrylamidu 37,5: 1

10% APS: 10% persíran amonný v destilované vodě

TEMED (SERVA)

4x separační pufr: 1,5 M Tris, 4% SDS, pH 8,8

4x zaostřovací pufr: 0,5 M Tris, 4% SDS, pH 6,8

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

10x Elektrodový pufr: 0,25 M Tris-base, 1,92 M glycin, 1% SDS

Protein Marker IV (10-245 kDa) prestained (AppliChem)

PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific)

4.1.5 Western blotting

Methanol

1x blotovací pufr: 20% methanol, 25 mM Tris-base, 192 mM glycin

1x PBS pH 7,4

5% mléko: 5% sušené odstředěné mléko v 1x PBS

Streptavidin Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories)

PBS-Tween 20: 0,05% Tween 20 v PBS, pH 7,4

Vyvíjecí roztok: 1x BCIP/NBT, 100 mM Tris pH 9,5, 0,1 M NaCl a 10 mM $MgCl_2$

PVDF membrána – polyvinyliden difluoridová membrána (Bio-Rad)

4.1.6 Elektronová mikroskopie

2,1 M Sacharóza

10% želatina v dH_2O

Tekutý dusík

1x PBS pH 7,4

4% Paraformaldehyd v 0,1 M fosfátovém pufru

3x promývací roztok: 0,1 M fosfátový pufr, 4% glukóza, 0,01 M glycin

2,3 M směs Methylcelulózy a sacharózy (1:1)

3% BSA v PBS

Click-iT Cell Reaction Buffer Kit (Life Technologies)

Biotin-azid (Life Technologies)

PBS-Tween 20

Streptavidin konjugovaný s nanočásticemi zlata 10 nm (Aurion)

0,5 % BSA v PBS

3% vodný uranylacetát

4.2 METODY

4.2.1 Kultivace klíštěcích buněk s alkyn-fukózou

K práci jsem použila klíštěcí buněčnou linii CTVM/IRE 19 (dále jen IRE 19) kultivovanou v mediu L15 při 28 °C v kultivačních zkumavkách s plochým dnem (Bell-Sakyi a spol., 2007).

Nejdříve jsem buňky v laminárním-boxu rozfoukala skleněnou pipetou, určila celkový objem suspenze a přepipetovala ji do kádinky. Odebrala jsem 50 µl buněčné suspenze do malé kádinky a přidala 50 µl roztoku trypanové modři. Roztok jsem napipetovala do Bürkerovy komůrky a spočítala buňky ve 25 čtvercích. Výsledek jsem vynásobila 20 000x, čímž jsem vypočítala kolik buněk je v 1 ml suspenze.

Do jednotlivých jamek 24-jamkového panelu jsem vložila plamenem sterilizované krycí sklíčka s průměrem 16 mm. Do jamek jsem poté přidala potřebný objem suspenze buněk tak, aby v každé jamce bylo 200 000 buněk a doplnila jsem ji mediem na celkový objem 0,3 ml. Buňky jsem ponechala kultivovat jeden den při teplotě 28 °C v atmosféře 5% CO_2, aby nasedly na sklíčka (Bell-Sakyi, 2002).

Alkyn-fukózu jsem naředila mediem L15 tak, abych získala koncentraci 2x vyšší než je pracovní koncentrace (pracovní koncentrace: 40 µM alkyn-fukóza) a v daných časových intervalech jsem tímto roztokem nahradila polovinu objemu média v jamkách se sklíčky s buňkami. Na jedno sklíčko s buňkami jsem přidávala 300 µl alkyn-fukózy v mediu. Takto připravené buňky jsem dále inkubovala za podmínek uvedených výše.

4.2.2 Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii

4.2.2.1 Fixace a permeabilizace buněk

Nejdříve jsem si připravila fixační roztok 4% paraformaldehydu (PA) v PBS. Do čisté skleněné vialky jsem si odměřila 5 ml dH_2O a k ní jsem v digestoři navážila 0,4 g PA. Směs jsem ohřívala v mikrovlnné troubě a každé 2-3 minuty jsem roztok promíchala, dokud se nezahřál na cca 60 °C. V digestoři jsem ke směsi přidala kapku 10 M NaOH a míchala do vyčiření roztoku. Poté jsem přidala 5 ml 2x koncentrovaného PBS a roztok zfiltrovala přes stříkačkový filtr (0,45 µm).

Po inkubaci s alkyn-fukózou jsem sklíčka s buňkami přemístila do nového 24-jamkového panelu a promývala je 2 x 10 minut v 500 µl 1x PBS pH 7,4. Po odsátí PBS jsem buňky fixovala 15 minut v 500 µl fixačního roztoku, permeabilizovala 15 minut v 500 µl permeabilizačního roztoku a 2x je promyla ve 400 µl 1% BSA po dobu 10 minut.

4.2.2.2 Optimalizace blokování nespecifického značení

Pro potvrzení specifity reakce jsem v některých případech použila před Click reakcí blok Streptavidinem DyLight®488, který jsem ředila 1:500 v 1% BSA. Buňky jsem inkubovala 1 hodinu.

Dále jsem používala jako blok 50mM NH_4Cl v 1% BSA, kdy jsem buňky promývala tímto roztokem dvakrát 10 minut hned po fixaci a permeabilizaci.

4.2.2.3 Značení fukosylovaných glykanů pomocí Click reakce

S takto připravenými buňkami (kapitola 4.2.2.1) jsem provedla tzv. Click reakci.

Podle počtu sklíček, jsem si spočítala potřebné množství reakční směsi pro Click reakci (200 µl na sklíčko). Možnosti přípravy reakční směsi jsou uvedené v Tab. I.

Tabulka I: Příprava reakční směsi pro Click reakci (Click-iT Protein Reaction Buffer Kit).

Komponenty reakce	**Množství jednotlivých komponentů podle celkového objemu**			
Celkový objem	500 µl	1 ml	2,5 ml	5 ml
1x Click-iT reaction buffer	440 µl	880 µl	2,2 ml	4,4 ml
$CuSO_4$	10 µl	20 µl	50 µl	100 µl
Click-iT cell buffer addtive	50 µl	100 µl	250 µl	500 µl
Biotin-azid 4 µM	0,5 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl

Buňky jsem inkubovala v reakční směsi 30 minut ve tmě. Od tohoto kroku jsem pokračovala ve tmě, protože azidová skupina navázaná na biotinu je citlivá na světlo. Buňky jsem dále značila pro fluorescenční mikroskopii.

4.2.2.4 Fluorescenční mikroskopie

Po promytí buněk ve 400 µl 1% BSA jsem buňky nechala 1 hodinu inkubovat v roztoku se Streptavidinem DyLight®549 nebo 488, který jsem ředila 1:1000 v 1% BSA. Buňky jsem poté promývala 3x 20 minut v 1% BSA a 3x 20 minut v PBS.

Připravená sklíčka s buňkami jsem krátce osušila na filtračním papíru. Mezitím jsem si připravila podložní sklíčka s VECTASHIELD® Mouting Mediem s DAPI. Po sušení jsem sklíčka s buňkami přiložila na podložní sklíčka (buňkami vespod) a zafixovala je lakem. Takto připravená sklíčka jsem prohlížela za použití fluorescenčního mikroskopu.

Používala jsem fluorescenční mikroskop značky Olympus BX60 (Olympus Tokio Japan) s objektivem Olympus DP71. Pro zobrazení jednotlivých značení, jsem použila filtry WU (DAPI) a WB (DyLight 549). Pro vyfocení fotek jsem používala kameru Olympus U-RFL-T. Pro složení fotek a jejich úpravu jsem používala program Adobe Photoshop CS6 (Adobe®, San José, Kalifornie).

4.2.3 Příprava proteinů z klíštěcích buněk

Buňky klíštěcí linie IRE 19 jsem nechala inkubovat 2 dny v mediu s 40 μM alkyn-fukózou za výše uvedených podmínek. Poté jsem přisedlé buňky rozfoukala pomocí skleněné pipety.

Suspenzi buněk jsem centrifugovala při 2000 rpm 10 minut při pokojové teplotě. Poté jsem buňky 3x promyla v PBS o stejném objemu jako měla suspenze buněk (2000 rpm, 10 minut).

K promytým buňkám jsem přidala 600 μl lyzačního pufru a inhibitory proteáz (do výsledné koncentrace 1x) a nechala je lyzovat 30 minut na ledu. Poté jsem buňky sonikovala 10 minut, vortexovala 5 minut a centrifugovala na maximální otáčky při 4°C 5 minut. Supernatant jsem odebrala do nové mikrozkumavky a změřila jsem koncentraci proteinů pomocí nanofotometru (Nanophotometer®, Implen, Mnichov, Německo).

Reakční směs pro Click reakci jsem připravila následovně: ke 100 μl Click-iT Reaction Bufferu jsem přidala 1 μl 4mM roztoku biotin-azidu a poté jsem podle koncentrace přidala buněčný lyzát, vždy ale o maximálním objemu 50 μl a dH_2O tak, aby byl konečný objem této směsi 160 μl. Vše jsem vortexovala 5 sekund a přidala jsem 10 μl roztoku $CuSO_4$. Opět jsem vortexovala 5 sekund, přidala jsem 10 μl Click-iT Reaction Buffer Additive 1 a vortexovala 5 sekund. Poté jsem nechala roztok 2-3 minuty stát, přidala jsem 20 μl Click-iT Reaction Buffer Additive 2 a vortexovala 5 sekund. Click reakci jsem nechala probíhat 20 minut za pomalého otáčení na rotátoru.

Proteiny z buněčného lyzátu jsem vysrážela, abych se zbavila nadbytečných složek reakce a nenavázaného biotin-azidu následujícím způsobem. Do mikrozkumavky jsem přidala 600 µl methanolu, krátce zvortexovala, přidala jsem 150 µl chloroformu, opět krátce zvortexovala a přidala jsem 400 µl dH_2O. Po krátkém vortexování jsem vzorek centrifugovala při maximálních otáčkách 5 minut a odebrala jsem horní vrstvu, tak abych neporušila mezivrstvu s vysráženými proteiny. K organické fázi jsem přidala 450 µl methanolu, zvortexovala a opět centrifugovala. Supernatant jsem odsála a pelet jsem stejným způsobem promyla ještě dvakrát methanolem. Nakonec jsem odsála všechen supernatant a pelet jsem nechala vysušit ve vakuu. Takto připravený vzorek jsem použila pro detekci přítomnosti fukosylovaných glykanů v klíštěcích buňkách pomocí SDS-PAGE (kapitola 4.2.3.2) a Western blotingu (kapitola 4.2.3.3) a izolaci těchto glykoproteinů afinitní chromatografií.

4.2.3.1 Afinitní chromatografie

Magnetické kuličky se Streptavidinem jsem nejdříve promíchala a odebrala 10 µl (odpovídá 650-900 mol Streptavidinu) do mikrozkumavky. Kuličky jsem 3x promyla v 500 µl PBS. Poté jsem k magnetickým kuličkám přidala 6 µl 100x inhibitorů proteáz, 10 µl vzorku, 7,68 µl NP-40 a PBS do celkového objemu 600 µl. Celou směs jsem dala na 1 hodinu otáčet do rotátoru při pokojové teplotě.

Poté jsem dala mikrozkumavku do magnetického stojánku, odebrala jsem roztok a označila jej jako FT (Flow-through). Magnetické kuličky jsem 3x promyla ve 200 µl PBS a odebraný roztok jsem označila W (Wash). Promyté magnetické kuličky jsem smíchala s 5x neredukujícím vzorkovým pufrem a dH_2O, zvortexovala a inkubovala 10 minut při 70°C.

Vzorek FT a W jsem poté vysrážela methanolem způsobem uvedeným výše (kapitola 4.2.4). Po vysušení vzorků ve vakuu jsem vzorky rozpustila v 5x neredukujícím vzorkovém pufru a dH_2O, zvortexovala a nechala je inkubovat 10 minut při 70°C. Takto připravené vzorky jsem použila pro detekci izolovaných fukosylovaných glykanů z klíštěcích buněk pomocí SDS-PAGE a Western blottingu. V případě pozitivního barvení proužků na PVDF membráně jsem odpovídající proužky vyřezala z gelu a zaslala je k analýze hmotnostní spektrometrií.

4.2.3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro separaci proteinů podle molekulové velikosti jsem použila polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (Laemmli 1970). Pro elektroforetickou separaci jsem používala 10%

polyakrylamidové gely. Směsi pro přípravu 10% separačního gelu a 5% zaostřovacího gelu jsou uvedené v Tab. II.

Tabulka II: Objemy roztoků pro přípravu dvou 10% separačních gelů a dvou 5% zaostřovacích gelů.

	Separační gel (ml)	**Zaostřovací gel (ml)**
30% Akrylamid	3,3	0,33
Separační pufr	2,5	-
Zaostřovací pufr	-	0,5
dH_2O	4,1	1,15
10% APS	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002

Sestavila jsem elektroforetickou aparaturu, nalila do ní 1x elektroforézový pufr a nanesla vzorky do jamek. Do první jamky jsem nanesla barvený proteinový marker, do následujících jamek jsem nanesla moje vzorky. Takto jsem si připravila dva gely.

Elektroforézu jsem nejdříve pustila na 100 V a po vstupu vzorků do separačního gelu na 120 V. Elektroforéza probíhala cca 1,5 hodiny. Po skončení SDS-PAGE jsem jeden gel použila k přenesení proteinů na PVDF membránu pomocí Western Blottingu druhý gel jsem obarvila v PageBlue Protein Staining Solution. Poté jsem gel vyfotila.

4.2.3.3 Western Blotting

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE jsem nechala přenést na PVDF membránu metodou podle Towbina a spol. (1979).

PVDF membránu jsem inkubovala 5 minut v methanolu, poté stejně jako gel po SDS-PAGE v 1x blotovacím pufru. Poté jsem připravila do blotovací aparatury blotovací sendvič: blotovací papír, membrána, gel, blotovací papír, vše jsem zalila blotovacím pufrem a bublinky jsem odstranila skleněnou tyčinkou. Blotting probíhal 1 hodinu při 20 V.

Membránu jsem krátce promyla v PBS, blokovala 1 hodinu v 5% mléku v PBS a následně v 5% mléku s přidaným Streptavidinem konjugovaným s alkalickou fosfatázou (1:500) 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C.

Poté jsem membránu promyla 3x 10 minut v pufru PBS Tween 20 a dala do vyvíjejícího roztoku, dokud se na membráně neobjevily proužky. Nakonec jsem membránu krátce promyla v dH_2O a nechala vysušit.

4.2.4 Elektronová mikroskopie

Buňky značené alkyn-fukózou (viz kapitola 4.2.1) jsem centrifugovala v kultivační zkumavce při 1000 rpm 10 minut při 4°C, odsála jsem supernatant, přidala PBS a rozfoukala pelet. Suspenzi jsem přenesla do mikrozkumavky a znovu centrifugovala stejným způsobem. Opět jsem odsála supernatant, přidala PBS a rozfoukala pelet. Promývání PBS jsem opakovala ještě 2x.

Promytý buněčný pelet jsem fixovala 4% PA v 0,1 M fosfátovém pufru 1 hodinu. Poté jsem buňky promyla 3x promývacím roztokem a zalila do 10% želatiny při 37°C, která se promísí s buňkami. Takto připravené buňky v želatině jsem dala do sacharózy a nechala promíchávat při 4°C přes noc.

Pod binolupou jsem odkrájela želatinu okolo buněk tak, aby jí tam bylo co nejméně, a buňky jsem přemístila na speciální piny. Poté jsem piny prudce zmrazila v tekutém dusíku.

Takto připravené vzorky jsem krájela na mikrotomu s kryokomorou na ultratenké řezy o tloušťce 90 nm. Nakrájené řezy jsem sebrala pomocí očka namočeného v methylcelulóze se sacharózou (poměr 1:1) a přemístila na síťky potažené formvarovu blánou.

Pro imunoznačení jsem si připravila komůrku z Petriho misky, do které jsem umístila parafilm a kolem něj navlhčenou vatu. Na parafilm jsem nanesla kapky potřebných roztoků, na které jsem umisťovala síťky (řezy dolů). Síťky jsem nejdříve promývala 3x 10 minut v dH_2O, poté jsem je blokovala 30 minut v 3% BSA v PBS.

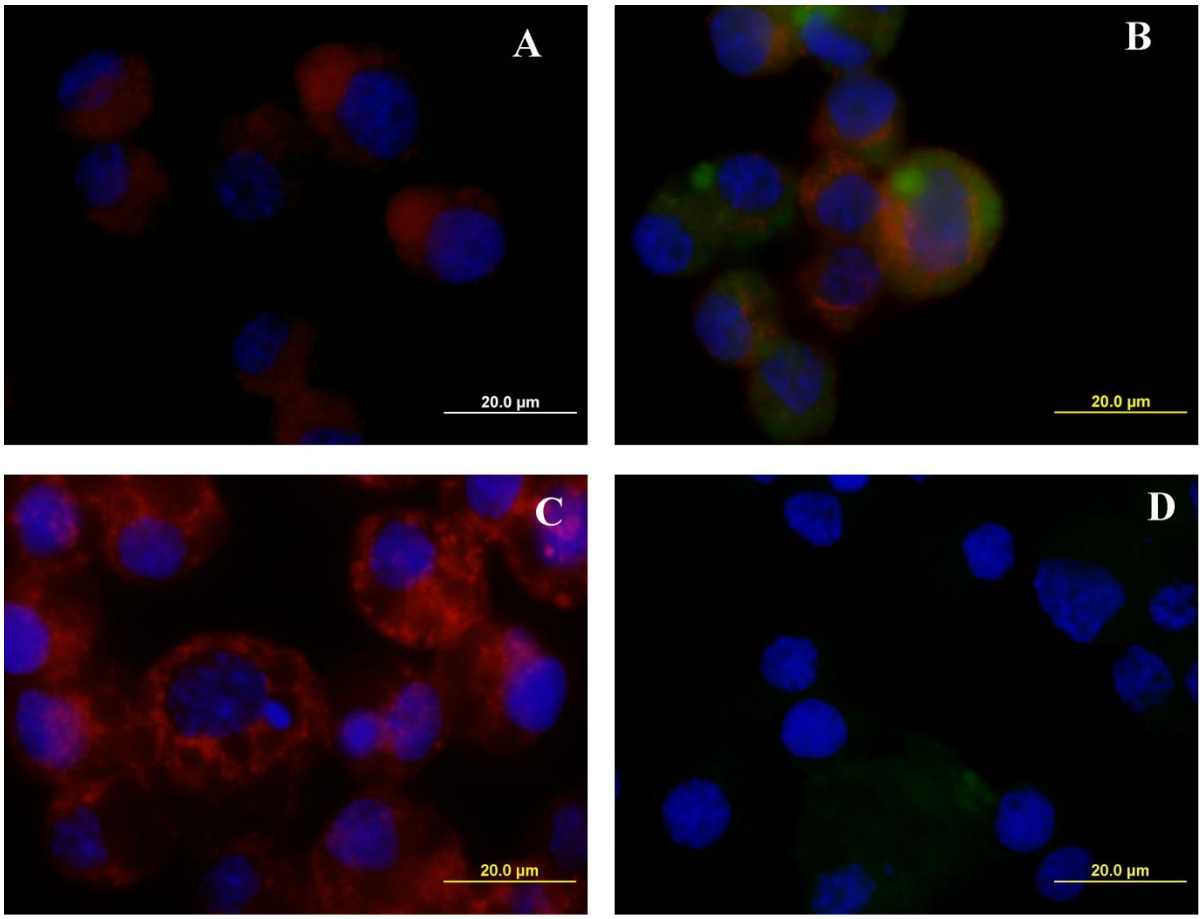
Poté jsem si připravila reakční směs pro Click reakci (na 5 sítěk): k 66 µl 1x Cell Buffer jsem přidala 1,5 µl $CuSO_4$, 7,5 µl Cell Buffer Additive a 0,2 µl biotin azidu. Click reakci jsem nechala probíhat 1,5 hodiny při RT. Po Click reakci jsem síťky promyla 6x v PBS Tween po 2 minuty, přidala jsem Streptavidin konjugovaný se zlatem 1:40 v 0,5% BSA v PBS a nechala inkubovat 1 hodinu. Síťky jsem opět 6x promyla v PBS-Tween po 2 minuty, poté 3x krátce v PBS a nakonec 3x krátce v dH_2O. Nakonec jsem si připravila roztok 900 µl methylcelulózy a 100 µl 3% uranylacetátu a nechala síťky inkubovat 1 minutu.

Síťky jsem osušila filtračním papírem. Takto připravené síťky jsem prohlížela v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM).

VÝSLEDKY

5.1 Fluorescenční mikroskopie

Při prvních pokusech se značením fukosylovaných glykoproteinů v buňkách inkubovaných s alkyn-fukózou po různou dobu jsem pozorovala silný signál již po inkubaci 1 minutu (Obr. 6A). Odpovídající značení bylo pozorovatelné i u negativní kontroly (buňky, u kterých nebyla provedena Click reakce, výsledek není ukázán).



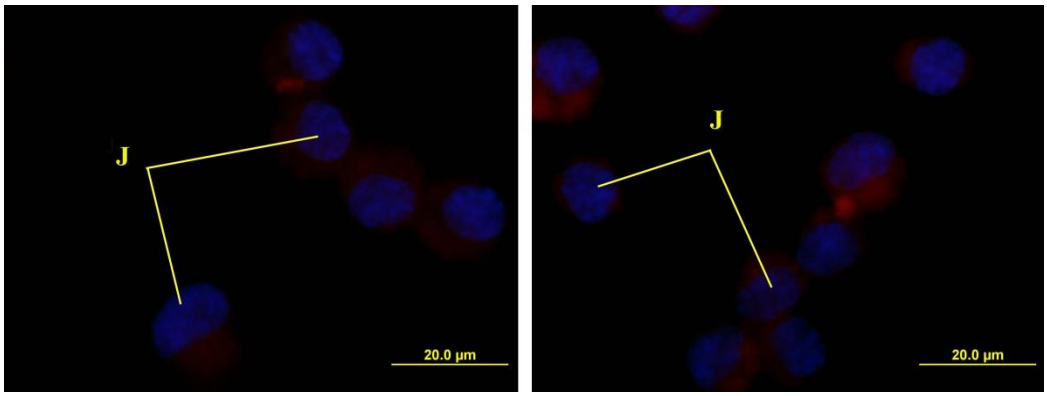
Obrázek 6: Click reakce. A – specificky značené fukosylované glykany po inkubaci 1 minuta (Streptavidin DyLight®549), B – Nespecifická vazba streptavidinu (zelená, Streptavidin DyLight®488) a specificky značené glykany (červená, Streptavidin DyLight®549), C – blokování autofluorescence pomocí NH_4Cl, specificky značené glykany (červená, Streptavidin DyLight®549), D – negativní kontrola.

Tento výsledek byl ale nereálný, proto jsem dále provedla pokus na ověření nespecifické vazby konjugátů streptavidinu. Při tomto značení jsem kromě blokování pomocí 3% BSA inkubovala vzorky se Streptavidinem DyLight®488 (před Click reakcí) a

Click reakci jsem značila Streptavidinem DyLight®549. Nespecifická vazba streptavidinu je na fotkách zobrazena zelenou barvou a značené glykany (specifická vazba) červenou barvou (Obr. 6B). Nespecifická vazba současně odpovídala autofluorescenci formaldehydu a proto jsem dále provedla blokování autofluorescence pomocí roztoku chloridu amonného. V tomto případě již autofluorescence ani nespecifické značení není viditelné (Obr 6C) a u negativní kontroly není viditelné žádné značení (Obr. 6D). Promývání vzorků roztokem NH_4Cl jsem proto používala ve všech dalších pokusech.

U klíštěcích buněk inkubovaných s alkyn-fukózou (1 minuta, 6 hodin, 12 hodin, 1 den, 2 dny, 3 dny) a následně značených Streptavidinem, se mi následně podařilo prokázat, že buňky dokáží využít alkynový derivát fukózy a zabudovat je do svých glykoproteinů.

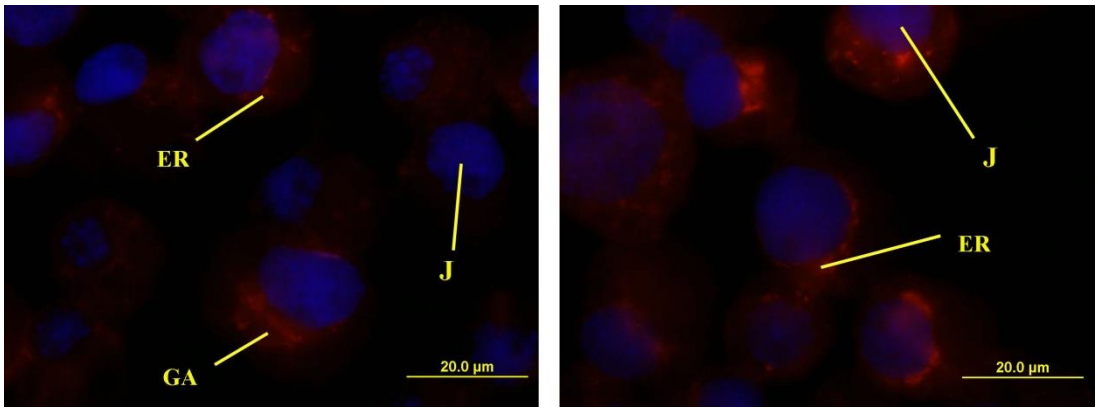
U kratších časových intervalů (1 minuta, 6 hodin, 12 hodin) jsem pozorovala mnohem méně fukosylovaných glykanů než v delších časových intervalech (1 den, 2 dny, 3 dny). Glykany v delších jsem lokalizovala zejména v ER a GA. U buněk, které byly inkubovány pouze 1 minutu, jsem nepozorovala téměř žádné nebo vůbec žádné fukosylované glykany, jak je vidět na Obr. 7. Čím déle byly buňky inkubovány, tím více fukosylovaných glykanů se vytvářelo.



Obrázek 7: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou po dobu 1 minuty a značené Streptavidinem DyLight®549. Modrá – DAPI, červená – fukosylované glykany (Streptavidin DyLight®549), J – jádra buněk.

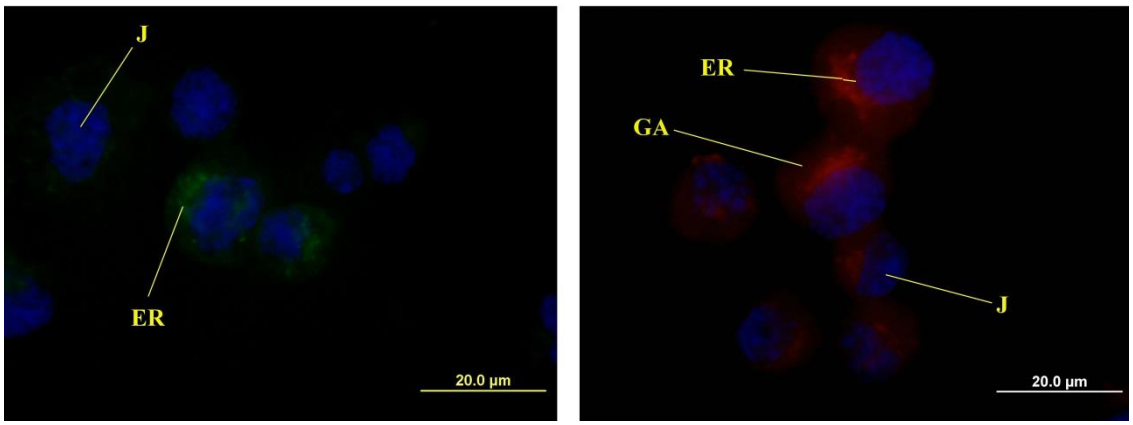
Na Obr. 8 jsou zobrazeny buňky po inkubaci s alkyn-fukózou 6 hodin. Zde lze vidět, že značení fukosylovaných glykanů je mnohem silnější. Některé buňky produkují fukosylované glykany rychleji a pozorovala jsem u nich silnější značení, některé pomaleji.

Obecně jsem značené fukosylované glykany pozorovala po 6 hodinách hlavně v ER a v některých případech i v GA (Obr. 8).



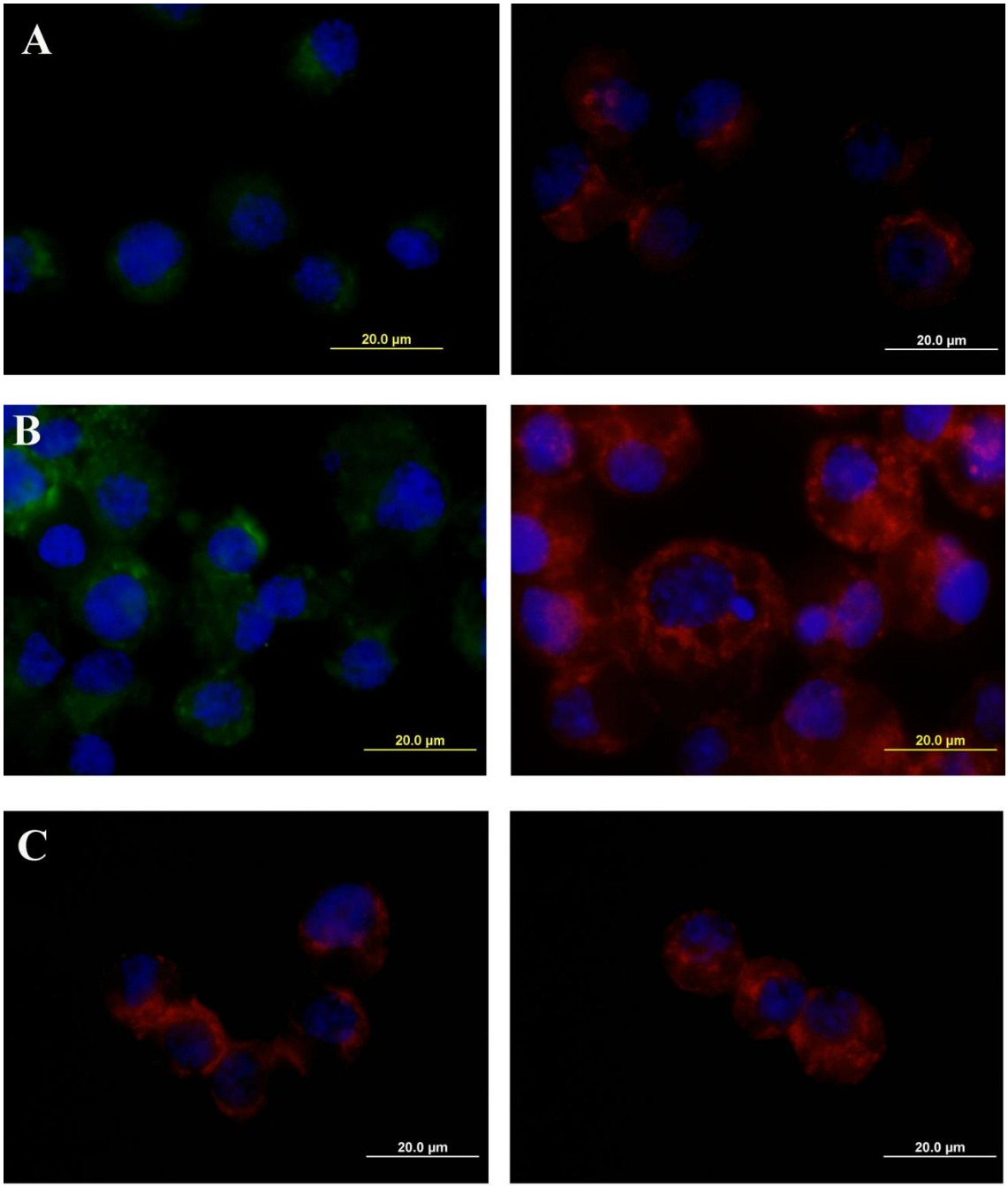
Obrázek 8: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou 6 hodin a značené Streptavidinem DyLight®549. Modrá – DAPI, červená – fukosylované glykany (Streptavidin DyLight®549), J – jádra buněk, ER – endoplasmatické retikulum, GA – Golgiho aparát.

V případě inkubace po dobu 12 hodin jsem fukosylované glykany pozorovala ve větší míře v GA (Obr. 9), ale jejich celkové množství je srovnatelné s časovým intervalem 6 hodin.



Obrázek 9: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou 12 hodin a značené Streptavidinem DyLight®488 (vlevo) a Streptavidinem DyLight®549 (vpravo). Modrá – DAPI, zelená (Streptavidin DyLight®488) a červená (Streptavidin DyLight®549) – fukosylované glykany, J – jádra buněk, ER – endoplasmatické retikulum, GA – Golgiho aparát.

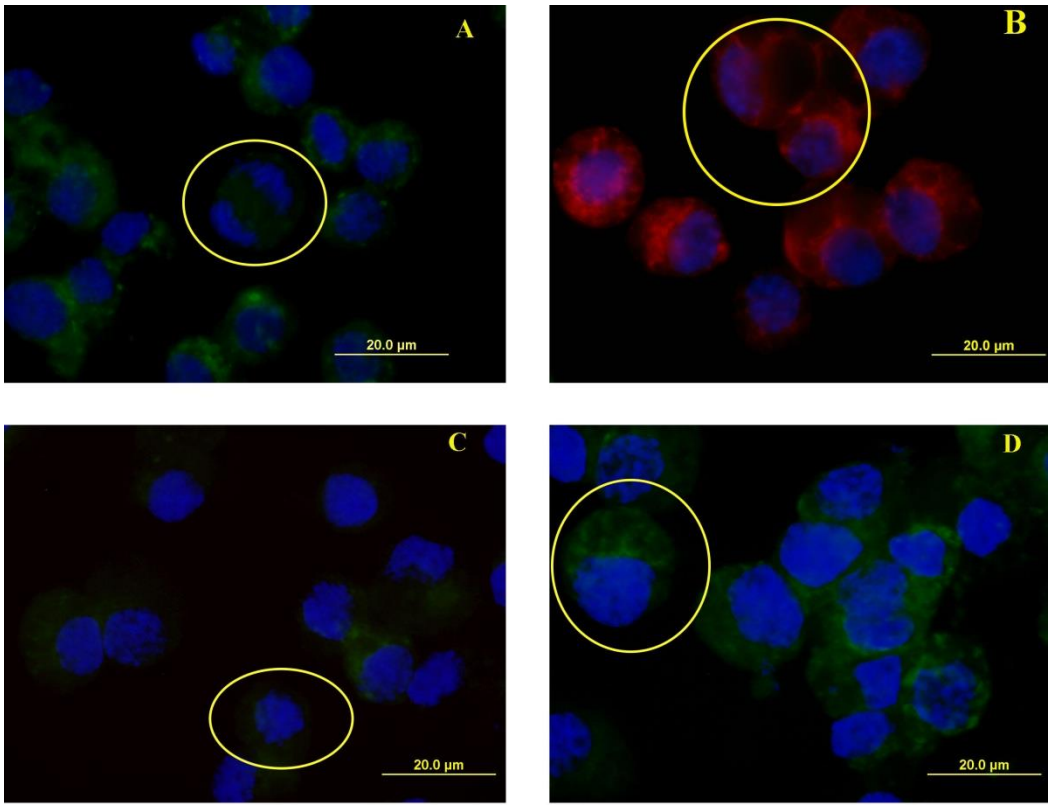
V časových intervalech 1 den, 2 dny a 3 dny jsem fukosylované glykany pozorovala již v celém objemu buňky, v cytoplasmě, různých granulích a organelách, jakož i na povrchu buňky (Obr. 10).



Obrázek 10: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou po dobu A -1 den, B – 2 dny, C – 3 dny a značené Streptavidinem DyLight®549 (A a B vpravo, C) nebo Streptavidinem DyLight®488 (A a B vlevo). Modrá – DAPI, zelená (Streptavidin DyLight®488) a červená (Streptavidin DyLight®549) – fukosylované glykany.

Podařilo se mi také zaznamenat dělící se buňky (Obr. 11A) u kterých je patrné, že fukosylované glykany nekolokalizují se strukturami podílejícími se na dělení buněk. U některých buněk, které byly v těsném kontaktu, jsem dále pozorovala intenzivní signál

v místě kontaktu buněk (Obr. 11B). Tento intenzivní signál jsem ale pozorovala pouze u buněk, které obsahovaly celkově více značených fukosylovaných glykanů.



Obrázek 11: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou. A – dělící se buňky, B – kontakt buněk lokalizován v blízkosti buněčné membrány, C – typ buňky s malým jádrem uprostřed, D – typ buňky s velkým jádrem na straně. Jednotlivé popisované buňky jsou zvýrazněné oválem. Modrá – DAPI, zelená (Streptavidin DyLight®488) a červená (Streptavidin DyLight®549) – fukosylované glykany.

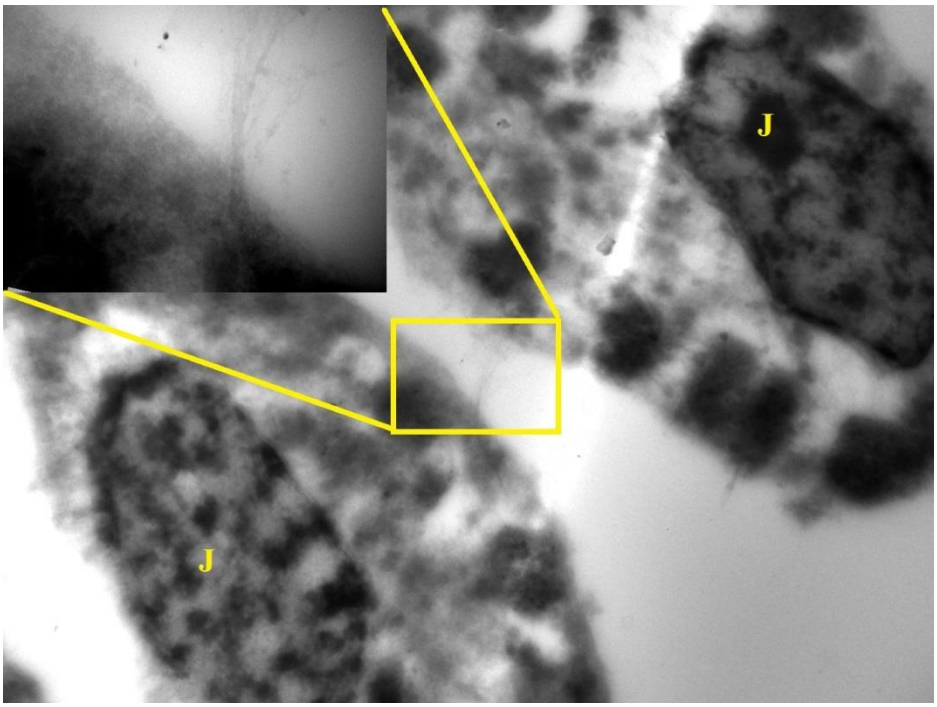
U buněčných kultur IRE 19, jsem zaznamenala přítomnost minimálně dvou typů buněk. Jeden typ buněk má velká jádra umístěná spíše na straně buňky (Obr. 11C) a druhý typ má naopak malá kulatější jádra umístěná uprostřed buňky. U druhého typu buněk lze často pozorovat organely plné fukosylovaných glykanů (Obr. 11D).

5.2 Elektronová mikroskopie

Vzorky připravené s využitím kryo metod jsem značila pomocí Streptavidinu konjugovaného s nanočásticemi zlata.

Jak je vidět na Obr. 12, intenzita značení je velmi nízká a neodpovídá značení pozorovanému ve fluorescenčním mikroskopu. Značení se objevovalo například v blízkosti membrán (Obr. 12, zvětšená část). Struktura buněk také nebyla dostatečně zachovalá.

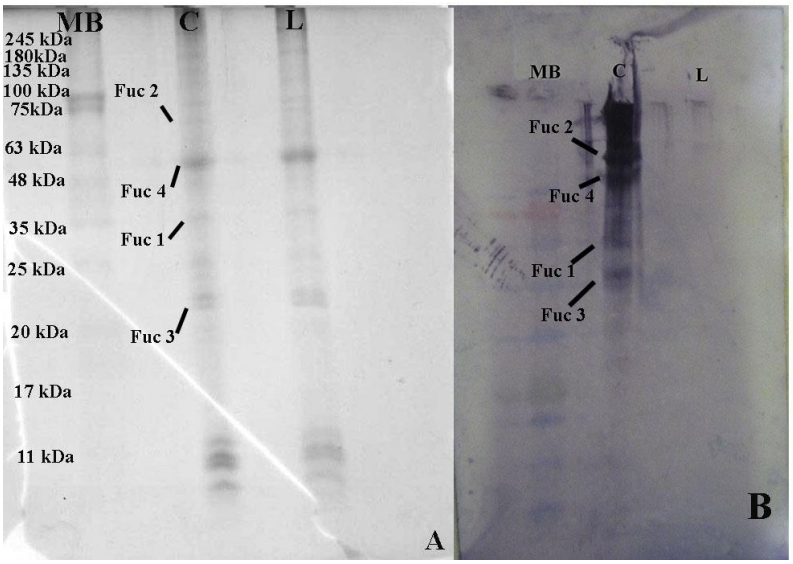
Důvodem pro tyto výsledky byly pravděpodobně nevhodně zvolené podmínky fixace a v současné době postup přípravy vzorků pro EM optimalizujeme.



Obrázek 12: Klíštěcí buňky inkubované s alkyn-fukózou. Fotografie z TEM. Značení streptavidinem konjugovaným s nanočásticemi zlata. J – jádro. Ve zvětšené oblasti je patrné značení fukosylovaných glykanů.

5.3 Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a afinoblotu

Proteiny buněčných lyzátů jsem elektroforeticky separovala pomocí SDS-PAGE a po elektroblotingu jsem přítomnost nově vytvořených fukosylovaných glykoproteinů detekovala pomocí afinoblotu. Pro detekci jsem používala vzorky buněčného lyzátu před Click-reakcí (L) a po Click reakci (C) (Obr. 13A). U těchto vzorků jsem detekovala přítomnost fukosylovaných glykoproteinů značených Click reakcí afinoblotem (Obr. 13B).



Obrázek 13: SDS-PAGE separace proteinů z lyzátu klíštěcích buněk inkubovaných s alkyn fukózou (A) a detekce fukosylovaných glykoproteinů afinoblotem pomocí streptavidinu konjugovaného s AP (B). MB – barvený proteinový marker, C – lyzát po Click reakci, L – lyzát před Click reakcí, Fuc 1, 2, 3, 4 – vzorky pro hmotnostní spektrometrii.

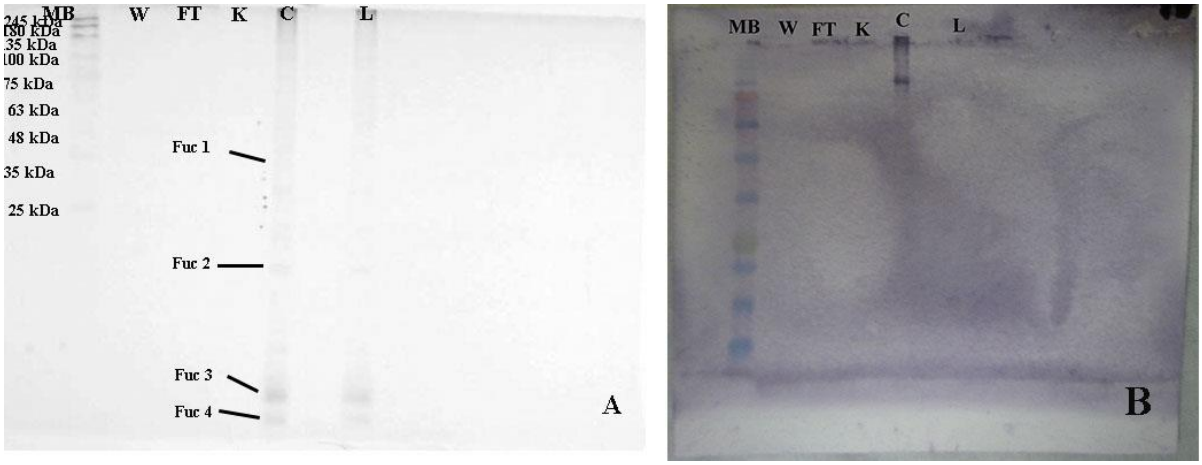
U vzorku L jsem na membráně nezaznamenala žádný signál, zatímco u vzorku C jsem pozorovala značené proteiny v celém rozsahu molekulových hmotností, přičemž nejintenzivnější značení jsem pozorovala v oblasti velikostí nad 80 kDa (Obr. 13 B). Tento výsledek potvrdil specificitu Click reakce a afinoblotu.

Čtyři z proteinů, které byly intenzivně značené afinoblotem o velikostech cca 28 kDa, 39 kDa, 55 kDa a 75 kDa (Fuc 3, Fuc 1, Fuc 4, Fuc 2, Obr. 13) jsem vyřezala z gelu po SDS-PAGE a připravila je pro identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Získané výsledky jsou znázorněny v Tab. III.

Tabulka III: Údaje získané pomocí hmotnostní spektrometrie. U každého vzorku je uveden název identifikovaného proteinu a jeho identifikační číslo (GenBank), jeho teoretická velikost, počet identifikovaných peptidů a pokrytí sekvence a výsledné PLGS skóre (určeno softwarem).

Vzorek	**Hmotnost (kDa)**	**Protein**	**PLGS score**	**Peptidy**	**Coverage**
Fuc 1	37,175	Putative RNA binding protein musashi EEC10609	454,9674	5	15,864
Fuc 2	72,549	Heat shock protein EEC05056	1032,353	10	18,541
Fuc 3	28,797	Putative RNA binding protein musashi EEC14609	102,4284	2	8,7273
Fuc 4	60,696	ATP synthase subunit beta EEC17118	438,8967	12	29,3073

Značené fukosylované proteiny (po Click reakci) jsem dále purifikovala chromatografií pomocí magnetických kuliček konjugovaných se streptavidinem. V tomto případe jsem elektroforeticky separovala vzorky FT (flow-through, nezachycená frakce), W (wash) a magnetické kuličky (K, purifikované proteiny) (Obr. 14). I v tomto případě je možné pozorovat specifické značení pouze u vzorků, u kterých proběhla Click reakce. Intenzivnější značení jsem pozorovala pouze u vzorku C. Fukosylované glykoproteiny se pomocí afinitní chromatografie nepodařilo purifikovat, resp. prokázat tuto purifikaci afinoblotem. Tento výsledek ale není úplně jednoznačný, jelikož i značení u vzorku C (Obr. 14B) je mnohem méně intenzivní než u předchozího výsledku (Obr. 13B).



Obrázek 14: SDS-PAGE separace vzorků z afinitní chromatografie (A) a detekce fukosylovaných glykoproteinů afinoblotem pomocí streptavidinu konjugovaného s AP (B). MB – barevný marker, W – wash, FT – flow through, K – kuličky, C – lyzát po Click reakci, L – lyzát před Click reakcí.

Afinitní purifikací se mi nepodařilo získat dostatečné množství fukosylovaných glykoproteinů, proto jsem pro identifikaci hmotnostní spektrometrií vyřezala proteinové proužky ze vzorku C, u kterých byla pozorovatelná dostatečně silná pozitivní reakce na membráně – Fuc 1 (cca 35 kDa), Fuc 2 (cca 20 kDa), Fuc 3 a Fuc 4 (oba cca 10 kDa) (Obr. 14). Výsledky z identifikace jsou zaznamenané v Tab. IV.

Tabulka IV: Údaje získané pomocí hmotnostní spektrometrie. U každého vzorku je uveden název identifikovaného proteinu a jeho identifikační číslo (GenBank), jeho teoretická velikost, počet identifikovaných peptidů a pokrytí sekvence a výsledné PLGS skóre (určeno softwarem).

Vzorek	**Hmotnost (kDa)**	**Typ proteinu**	**PLGS score**	**Peptidy**	**Coverage**
Fuc 1	37,175	Putative RNA binding protein musashi EEC10609	493,7759	5	17,2805
Fuc 2	24,841	Putative histone EEC17023	157,4036	2	13,0802
Fuc 3	13,810	Histon H2B AAY66901	324,8613	4	29,0323
Fuc 4	11,360	Histon H4 AAY66895	971,4762	9	60,1942

DISKUZE

Cílem mé práce bylo ověřit možnost použití bioortognálně značených cukrů pro značení glykoproteinů u klíšťat a lokalizovat tyto glykoproteiny pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie. Za tímto účelem jsem používala model klíštěcích buněčných linií, konkrétně linie IRE/CTVM 19 (Bell-Sakyi a spol., 2007). K práci s těmito buňkami jsem používala Click-iT reakci, která je vhodná pro značení glykoproteinů v buněčných lyzátech, ale nemůže se použít u živých organismů a to kvůli cytotoxicitě měďných iontů používaných jako katalyzátor (Laughlin a Bertozzi 2007).

Buňky jsem inkubovala s alkyn-fukózou, alkynem značené fukosylované glykoproteiny jsem nechala reagovat s biotin-azidem (Click reakce). Biotinylované molekuly jsem dále detekovala anebo purifikovala pomocí konjugátů streptavidinu. Moje výsledky potvrzují možnost použití alkyn-fukózy v klíštěcích buněčných kulturách a klíšťatech a produkci klíštěcích fukosylovaných glykoproteinů. Možnost využití bioortogonálně značených cukrů byla potvrzena i u jiných bezobratlých, jako např. u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Laughlin a Bertozzi, 2007) a alkyn-fukóza v kombinaci s biotin-azidem byla úspěšně využita u mnoha dalších případů, jako u rakovinotvorných buněk. V tomto případě se využívaly alkynyl deriváty fukózy a ManNAc v kombinaci s biotin azidem (Hsu et al. 2007).

Při porovnání lokalizace glykanů v různých časových intervalech, lze fukosylované glykany v kratších časových intervalech lokalizovat v ER a GA (značení identifikováno pomocí uvedeného postupu - Gillespie a spol., 2010) a později také v cytosolu, mnoha granulách a organelách a na buněčných membránách. Proces glykosylace probíhá zejména v ER a GA, odkud se glykoproteiny dostávají do dalších částí buňky (Varki a spol., 2009). Právě v ER a GA jsem lokalizovala nejvíce fukosylovaných glykanů.

Glykoproteiny se ve významné míře podílejí na mezibuněčné komunikaci a dalších fyziologických procesech a ve velkém množství se u eukaryotických buněk nacházejí na membránách (Neves a spol., 2011). Tomu odpovídá i moje pozorování značených fukosylovaných glykoproteinů na povrchu buněk, popř. v místě kontaktu buněk. Mnoho glykanů se nacházelo i na povrchu buněk, což napovídá, že glykany se podílí na buněčné interakci a migraci, tudíž i na mnoha fyziologických procesech. Membránová lokalizace fukosylovaných glykoproteinů značených alkyn-fukózou byla potvrzena např. u Dánio pruhovaného (Baskin a spol., 2010), savčích buněk nebo háďátka (Dehnert a spol., 2011). Je

nutno podotknout, že se přesně neví z jakých tkání pochází buňky v buněčných liniích a proto nelze přesněji dovozovat význam fukosylovaných glykanů u klíšťat a je potřeba provést další pokusy včetně pokusů na klíšťatech.

Při použití elektronové mikroskopie bylo značení glykanů velmi slabé a neodpovídalo značení, které jsem pozorovala pomocí fluorescenční mikroskopie. Ani struktura buněk nezůstala zachována. Nejpravděpodobnějším důvodem výsledné struktury buněk bylo použití nevhodného postupu pro fixaci. Při mé práci jsem buňky fixovala 1 hodinu v 4% PA s 0,1 M fosfátovým pufrem. Je možné, že doba fixace byla velmi krátká a bylo by dobré ji prodloužit alespoň na dvě hodiny, jako tomu bylo u značení slinných žláz klíštěte *I. ricinus* v práci Vancová a spol. (2012). Důvodem pro slabý signál po imunoznačení nanočásticemi zlata byla nejspíše krátká doba inkubace buněk s alkyn-fukózou (dva dny). Pokud bych měla vycházet ze zjištění z fluorescenční mikroskopie, kde jsem pozorovala nejsilnější signál po inkubaci 3 dny, tak by bylo vhodné zopakovat tyto pokusy s inkubací alkyn-fukózou delší dobu. Zároveň je důležité zmínit, že při (transmisní) elektronové mikroskopii je pozorován tenký řez buňkami, čemuž odpovídá i výrazně menší množství glykoproteinů v porovnání s fluorescenční mikroskopií

V další části mé práce jsem detekovala nově vytvořené fukosylované proteiny pomocí SDS-PAGE a afinoblotu. Některé z proteinů, které vykazovaly silný signál při afinoblotu jsem vyřezala z gelu a zaslala je k analýze na hmotnostní spektrometrii. Pomocí afinitní chromatografie se mi ale nepodařilo purifikovat Click reakcí značené fukosylované glykoproteiny.

Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo identifikováno několik proteinů. Patří mezi ne histony H2B a H4, RNA binding proteiny, heat shock proteiny a β-podjednotku ATP syntázy. Všechny tyto proteiny byly již dříve identifikovány u jiných organismů jako glykosylované (Burnham-Marusich a spol., 2012, Fujiki a spol., 2011, Kondethimmanahalli a spol., 2011, Soulard a spol., 1993, Suriano a spol., 2005, Zhang a spol., 2011) a/anebo fukosylované (Levy-Wilson, 1983, Muinelo-Romay a spol., 2011). Roli fukosylace u těchto proteinů budeme dále zkoumat.

U klíšťat použitými postupy bohužel nelze rozlišit *O*-glykosylované a *N*-glykosylované glykoproteiny. Nás nejvíce zajímají *N*-glykany, protože bylo prokázáno, že *N*-glykany α1,3-fukosylované na jádru jsou důležité pro přenos některých patogenů klíštětem

a alergie (Pedra a spol., 2010). Do budoucna mám v plánu vyzkoušet enzymatické uvolňování *N*-glykanů a tím rozlišit glykany na *O*-glykany a *N*-glykany.

ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo kultivovat klíštěcí buňky za přítomnosti alkynových derivátů fukózy a následně lokalizovat a detekovat nově vytvořené fukosylované glykany. Potvrdila jsem, že klíštěcí buňky dokážou využít alkyn-fukózu a produkují fukosylované glykany.

Fukosylované glykoproteiny jsem v buněčných lyzátech detekovala pomocí SDS-PAGE a afinoblotu. Některé ze značených glykoproteinů se podařilo identifikovat hmotnostní spektrometrií.

Fukosylované glykoproteiny jsem dále lokalizovala pomocí fluorescenční mikroskopie.

CITACE

Aebi M. (2013): *N*-linked protein glycosylation in the ER. Biochimica of Biophysica Acta 1833: 2430-2437.

Aoki K., Perlman M., Lim J., Cantu R., Wells L., Tiemeyer M. (2007): Dynamic developmental elaboration of *N*-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. The Journal of Biological Chemistry 282: 9127-9142.

Baskin M. J., Dehnert W. K., Laughlin T. S., Amacher L. S., Bertozzi R. C. (2010): Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 107: 10360-10365.

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996): Lékařská mikrobiologie. Praha, Česká republika: Triton: 558 s, ISBN 859-4-315-0528-0.

Bell-Sakyi L., Zweygarth E., Blouin F. E., Gould A. E., Jongejan F. (2007): Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends in Parasitology 23:450-457.

Bell-Sakyi L. (2002): Investigation of the immunogenic potential of heartwater (*Cowdria ruminantium*) grown in tick cell lines. Final Technical Report: 23 s.

Bencúrová M., Hemmer W., Focke-Tejkl M., Wilson I. B. H, Altmann F. (2004): Specifity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin. Glycobiology 14: 457-466.

Burnham-Marusich R. A., Sinodgrass J. C., Johnson M. A., Kiyoshi M. C., Buzby E. S., Gruner R. M., Berninsone M. P. (2012): Metabolic labeling of *Caenorhabditis elegans* primary embryonic cells with azido-sugars as a tool for glycoprotein discovery. PLOS ONE 7: e49020.

Burrascano J. J. (2008): Advanced topics in lyme disease. International Lyme and Associated Diseases Society. New York, USA: 37 s.

Comstock L. E., Kasper D. L. (2006): Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. Cell 126: 847-850.

Dehnert W. K., Beahm J. B., Huynh T. T., Baskin M., Laughlin T. S., Wang W., Wu P., Amacher L. S., Bertozzi R. C. (2011): Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing *Zebrafish*. ACS Chemical Biology 6: 547-552.

Dumpis U., Crook D., Oksi J. (1999): Tick-borne encephalitis. Clinical Infectious Diseases 28: 882-890.

Francischetti I. M. B., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I. M., Ribeiro J. M. C. (2009): The role of saliva in tick feeding. Frontiers in Bioscience 14: 2051-2088.

Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., Chikanishi T., Ito S., Imai Y., Kim J., He H. H., Igarashi K., Kanno J., Ohtake F., Kitagawa H., Roeder R. G., Brown M., Kato S. (2011): GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature 480: 557-560.

Gabius H. J. (2009): Glycans as functional markers in malignacy? In: The Sugar Code Fundamentals of Glycoscience. Gabius H. J., Weinheim, Německo, Wiley: 597 s, ISBN 978-3-527-32089-9.

Gagneux P., Varki A. (1999): Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. Glycobiology 9: 747-755.

Gerold S., Strle F. (2003): Lyme Borreliosis. The Lancet 362: 1639-1647.

Ghaffar A. (2010): Zoonoses. In: Microbiology and immunology On-line. Hunt R. C. Editor, University of South Carolina School of Medicine. http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses.htm

Gillespie K. L., Hoenen A., Morgan G., Mackenzie M. J. (2010): The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the Flavivirus replication complex. Journal of Virology 84: 10438-10447.

Gutternigg M., Bürgmayr S., Pöltl G., Rudolf J., Staudacher E. (2007): Neutral *N*-glycan patterns of the gastropods *Limax maximus, Capea hortensis, Planorbarius corneus, Arianta arbustorum* and *Achatina fulica*. Glycoconjugate Journal 24: 475-489.

Hanneman J. A., Rosa C. J., Ashline D. Reinhold N. V.(2006): Isomer and glycomer complexities of core GlcNAcs in *Caenorhabditis elegans*. Glycobiology 16: 874-890.

Haslam M. S., Coles C. G., Munn A. E., Smith S. T., Smith F. H., Morris R. H., Dell A. (1996): *Haemonchus contortus* glycoproteins contain *N*-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures. The Journal of Biological Chemistry 271: 30561-30570.

Haslam M. S., Houston M. K., Harnett W., Reason J. A., Morris R. H., Dell A. (1999): Structural studies of *N*-glycans of filarial parasites. The Journal of Biological Chemistry 274: 20953-20960.

Hausmann K., Hülsmann N. (2003): Protozoologie. Praha, Česká republika, Academia: 347s, ISBN 80-200-0978-7.

Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J., Persing D.H. (2000): Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews 13: 451-469.

Hoogstraal H. (1978): Biology of ticks. In: Tick-borne diseases and their vectors. Wilde J. K. H., Edinburgh, Velká Británie: 3-14.

Hsu L. T., Hanson R. S., Kishikawa K., Wang K. S., Sawa M., Wong H. Ch. (2007): Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 104: 2614-2619.

Kodíček M. (2004): Biochemické pojmy: výkladový slovník. Praha, Česká republika, VŠCHT Praha: 66 s, ISBN 80-7080-551-X.

Kondethimmanahalli H. Ch., Zhang Y., Wong Y. H., Qian P.-Y. (2011): Comparative glycoproteome analysis: Dynamics of protein glycosylation during metamorphic transition from pelagic to benthic life stages in three invertebrates. Journal of Proteome Research 11: 1330-1340.

Kovar V., Kopacek P., Grubhoffer L. (2000): Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochemistry Molecular Biology 30: 195-205.

Kundra R., Kornfeld S. (1999): Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. The Journal of Biological Chemistry 274: 31039-31046.

Laemmli K. U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lahann J. (2009): Click Chemistry: A universal ligation strategy for biotechnology and materials science. In: Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science. Weinheim, Německo, Wiley: 1-6, ISBN 978-0-470-69970-6.

Laughlin T. S., Bertozzi R. C. (2007): Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation. Nature Publishing Group 2: 2930-2944.

Levy-Wilson B. (1983): Glycosylation, ADP-ribosylation, and methylation of *Tetrahymena* histones. Biochemistry 22:484-489.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000): Protein glycosylation in the ER and Golgi complex. In: Molecular Cell Biology. New York: W. H. Freeman: 700-711.

Man P., Kovar V., Sterba J., Strohalm M., Kavan D., Kopacek P., Grubhoffer L., Havlicek V. (2008): Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. European Journal of Mass Spectrometry 14: 345-354.

Marchalonis J.J., Edelman G.M. (1968): Isolation and characterisation of a haemagglutinin from *Limulus polyphemus*. Journal of Molecular Biology 32: 453-465.

Muinelo-Romay L., Villar-Portela S., Cuevas E., Gil-Martín E., Fernandéz-Briera A. (2011): Identification of α(1,6)fucosylated proteins differentially expressed in human colorectal cancer. BMC Cancer 11:508.

Murrel A., Campbell N. J. H., Barker S. C. (2001): A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 244-258.

Neves A. A., Stöckmann H., Harmston R. R., Pryor J. H., Alam S. I., Ireland-Zecchini H., Lewis Y. D., Lyons K. S., Leeper J. F., Brindle M. K. (2011): Imaging sialylated tumor cell glycans *in vivo*. The FASEB Journal 25: 2528-2537.

Patsos G., Corfield A. (2009): Structural diversity and functions. In: The sugar code fundamentals of glycosciences. Gabius H. J., Weinheim, Německo, Wiley: 111-138, ISBN 978-3-527-32089-9.

Pavlicek J., Sopko B., Ettrich R., Kopecky V., Baumruk V., Man P., Havlicek V., Vrbacky M., Martinkova L., Kren V., Pospisil M., Bezouska K. (2003): Molecular characterization of binding of calcium and carbohydrates by an early activation antigen of lymphocyes CD69. Biochemistry 42: 9295-9306.

Pedra H. F. J., Narasimhan S., Rendic D., DePonte K., Bell-Sakyi L., Wilson B. H. I., Fikrig E. (2010): Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. Cellular Microbiology 12: 1222 – 1234.

Randolph S. E. (2008): Tick ekology and pathogen transmission dynamics. In: Ticks: biology, disease and control. Bowman A. S., Nuttall P. A., New York, USA, Cambridge University Press: 40-49, ISBN 052-18-676-14.

Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Silaghi C. (2011): Occurrence of *Babesia spp*., *Rickettsia spp*. and *Bartonella spp*. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasites and Vectors 4: 135.

Sletten M. E., Bertozzi R. C. (2009): Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. Angewandte Chemie International Edition 48: 6974-6998.

Soulard M., Della Valle V., Siomi M. C., Piñol-Roma S., Codongo P., Bauvy C., Bellini M., Lacroix J. C., Monod G., Dreyfuss G. (1993): hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. Nucleic Acids Research 21: 4210-4217.

Stibraniova I., Lahova M., Bartikova P. (2013): Immunomodulators in tick saliva and their benefits. Acta Virologica 57: 200-216.

Suriano R., Ghosh S. K., Ashok B. T., Mittelman A., Chen Y., Banerjee A., Tiwari R. K. (2005): Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: Implications for prostate cancer prevention. Cancer Research 65: 6466-75.

Tretter V., Altmann F., Kubelka V., März L., Becker W. M. (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.

Uhlir J., Grubhoffer L., Borsky I., Dusbalek F. (1994): Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. Medical and Veterinary Entomology 8: 141-150.

Varki A., Cummings D. R., Esko D. J., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi R. C., Hart W. G., Etzler E. M. (2009): *N*-glycans. In: Essentials of glycobiology. Cold spring Harbor laboratory press. On-line: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/.

Varki A., Cummings D. R., Esko D. J., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi R. C., Hart W. G., Etzler E. M. (2009): *C*-glycosylation. In: Essentials of glycobiology. Cold spring Harbor laboratory press. On-line: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20708/#A836.

Vancova M., Sterba J., Dupejova J., Simonova Z., Nebesarova J., Novotny V. M., Grubhoffer L. (2012): Uptake and incorporation of sialic acid by the tick *Ixodes ricinus*. Journal of Insect Physiology 58: 1277-1287.

Vancova M., Zacharova K., Grubhoffer L., Nebesarova J. (2006): Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. Journal of Parasitology 92: 431-440.

Voisin S., Houliston R. S., Kelly J., Brisson J. R., Watson D., Bardy S. L., Jarrell K. F., Logan S. M. (2005): Identification and characterization of the unique *N*-linked glycan common to the flagellins and S-layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*. The Journal of Biological Chemistry 17: 16586-16593.

Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J. (2007): Paraziti a jejich biologie. Praha, Česká republika: Triton: 262-264, ISBN 978-80-7387-008-9.

Weerapana E., Imperiali B. (2006): Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. Glycobiology 16: 91-101.

Wilson I. B. H., Paschinger K., Rendic D. (2009): Glycosylation of model and „model" organisms. In: The sugar code fundamentals of glycosciences. Gabius H. J., Weinheim, Německo, Wiley: 139-154, ISBN 978-3-527-32089-9.

Zhang S., Roche K., Nasheuer H. P., Lowndes N. F. (2011): Modification of histones by sugar β-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. The Journal of Biological Chemistry 286: 37483-37495.