

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Určení N-glykomu klíštěte *Ixodes ricinus*
a *Dermacentor marginatus*;
analýza N-glykanů v tkáních klíštěte a jejich porovnání.**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Šimonová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., PřF JU

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba, PřF JU

České Budějovice 2011

Šimonová, Z, 2011: Určení *N*-glykomu klíštěte *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*; analýza *N*-glykanů v tkáních klíštěte a jejich porovnání. [Determination of *N*-glycome of the tick *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus*; Analysis of *N*-glycans in tick tissues and their comparison] – 60 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Glycosylation in vertebrates has a main role in many important processes such as cell transport, protein folding, secretion of proteins etc. What function has glycosylation in arthropods, for example in ticks, is rarely studied. This work was focused on analysis of *N*-glycans in tick tissues, namely in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus*. High-mannose glycans as well as complex glycans with or without core-fucosylation were identified in this study. Furthermore several sialylated glycans were present in the studied samples. Sialic acid is found in arthropods rarely and this is the first study which directly proves its presence in ticks using mass spectrometry.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 15.12.2011

.....
Bc. Zuzana Šimonová

Na tomto místě bych projevila obrovskou vděčnost. Vděčnost za to, že kolem stáli lidé, kteří mě podporovali a pomáhali při studiu takovým způsobem, že tato práce nakonec opravdu vznikla.

Děkuji svým školitelům Prof. RNDr. Libor Grubhofferovi, CSc. a Mgr. Jánovi Štěrbovi, že mi umožnili pracovat na velmi zajímavém a kvalitním tématu. Jsem jim vděčná za to, že mi vyšli vstříc a mohla jsem pracovat způsobem, který mi časově vyhovoval. Moje velké díky patří Jankovi za veškerý čas, který mi věnoval, za obdivuhodnou trpělivost a ochotu při konzultacích, za příjemnou atmosféru v laboratoři, která mi bude moc chybět.

Jsem moc vděčná za dcerku a manžela a děkuji jim za to, že mě vždy dokáží povzbudit, dát pocit jistoty a ukázat, na čem v životě nejvíc záleží.

Moje velké děkuji patří všem, kteří si udělali čas a byli ochotní hlídat moji dcerku. Bez nich by tato práce vůbec nevznikla.

Nakonec moc děkuji svým rodičům, že tady pro mě vždycky byli a měli mě rádi a tím mi dali ten nejlepší základ do života.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD..... | 1 |
| 2 CÍLE PRÁCE..... | 2 |
| 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED..... | 3 |
| 3.1 Klíšťata..... | 3 |
| 3.1.1 Systematický přehled..... | 3 |
| 3.1.2 Životní cyklus zástupců čeledi Ixodidae..... | 4 |
| 3.1.3 Onemocnění přenášená klíšťaty..... | 5 |
| 3.2 Glykosylace..... | 7 |
| 3.2.1 N-glykosylace a klasifikace N-glykanů..... | 8 |
| 3.2.1.1 N-glykosylace členovců..... | 9 |
| 3.2.1.2 N-glykosylace u klíšťat..... | 10 |
| 3.2.1.3 Fukosylace N-glykanů..... | 11 |
| 3.2.1.4 Syntéza N-glykanů..... | 12 |
| 3.2.1.5 Význam N-glykosylace..... | 13 |
| 3.2.2 O-glykosylace..... | 14 |
| 3.2.2.1 Syntéza O-glykanů..... | 14 |
| 3.2.2.2 Význam a výskyt O-glykosylace..... | 14 |
| 3.2.2.3 O-glykany členovců..... | 15 |
| 3.2.3 C-glykosylace..... | 15 |
| 3.2.4 Fosfoglykosylace..... | 16 |
| 3.2.5 S-glykosylace..... | 16 |
| 3.2.6 Lektiny..... | 16 |
| 3.2.6.1 Lektiny členovců..... | 16 |
| 3.3 Hmotnostní spektrometrie ve výzkumu glykanů..... | 18 |
| 3.3.1 MS/MS analýza..... | 19 |
| 3.3.2 Permetylace..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 4. MATERIÁL A METODY..... | 22 |
| 4.1 Materiál..... | 22 |
| 4.1.1 Klíšťata..... | 22 |
| 4.1.1.1 Klíštěcí vzorky..... | 22 |
| 4.2 Metody | 23 |
| 4.2.1 Příprava homogenátů a tryptické štěpení..... | 23 |
| 4.2.2 Purifikace peptidů..... | 24 |
| 4.2.3 Uvolnění glykanů pomocí endoglykosidáz | 24 |
| 4.2.4 Purifikace glykanů..... | 24 |
| 4.2.5 Permetylace..... | 25 |
| 4.2.6 Hmotnostní spektrometrie..... | 25 |
| 5 VÝSLEDKY..... | 27 |
| 6. DISKUZE..... | 39 |
| 7 ZÁVĚR..... | 43 |
| 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 44 |
| 9 LITERATURA..... | 45 |

1 ÚVOD

Glykosylace proteinů hraje u vyšších živočichů nezastupitelnou roli v mnoha důležitých procesech. N-glykosylace má vliv na skládání a sekreci proteinu, mezibuněčný transport, komunikaci mezi buňkami a aktivitu enzymů atd. U nižších živočichů jako jsou členovci nebyla glykosylace dosud dostatečně prostudována. Oproti vyšším živočichům, zejména savcům, se u členovců vyskytuje mnohem méně komplexních a hybridních glykanů. Například u octomilky *Drosophila melanogaster* tvoří komplexní glykany jen přibližně desetinu všech N-glykanů. Sialované glykany se vyskytují u členovců ještě vzácněji, octomilka je produkuje pouze v embryonálním stádiu. Co se týče klíšťat, přítomnost kyseliny sialové byla prokázána pouze elektronovou mikroskopií s lektinovým značením na povrchu slinných ductů klíštěte *Ixodes ricinus* (Vancová et al., 2006).

Tato práce je zaměřena na analýzu N-glykanů v tkáních klíšťat *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*.

2 CÍLE PRÁCE

Cíle mé práce byly:

- izolace a purifikace N-glykanů z klíštěte *Dermacentor marginatus* a z orgánů klíštěte *Ixodes ricinus*,
- modifikace N-glykanů pro hmotnostně spektrometrickou analýzu (permetylace),
- analýza permetylovaných N-glykanů pomocí hmotnostní spektrometrie metodou MALDI-TOF,
- strukturní charakterizace komplexních glykanů MS/MS analýzou (MALDI-TOF/TOF).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Klíšťata

3.1.1 Systematický přehled

Klíště obecné neboli *Ixodes ricinus* je členovec (Arthropoda) patřící do podkmenu klepítkatců (Chelicerata). Klepítkatci zahrnují tři třídy: téměř vymřelou třídu hrotnatců (Merostomata), malou třídu nohatek (Pycnogonida) a početnou třídu pavoukoců (Arachnida). Hrotnatci jsou dnes již téměř vymřelou skupinou mořských členovců, kteří svůj název dostali podle výběžku ve tvaru hrotu, jenž jim vyrůstá ze zadní části těla. Dělí se na dva řády kyjonožci (Gigantostraca) a ostrorepi (Xiphosura).

Na rozdíl od třídy nohatek, jež je jen malou skupinou mořských členovců, pavoukocvi patří k nejpočetnější skupině podkmene klepítkatců. Žijí na pevnině i ve vodním prostředí. Až na malé výjimky mají pavoukocvi šest párů končetin (klepítka, makadla a čtyři páry kráčivých nohou). Zahrnují několik řádů: štíři, bičnatci, krátkochvosti, bičovci, pavouci, štířenky, štírci, solifugy, rotočovci, sekáči a roztoči. Roztoči (Acari) jsou obecně velmi malí (80 μm – 1 mm), některé druhy však dosahují délky až 2 cm. Mezi pavoukocvi vynikají také způsobem obživy, protože na rozdíl od ostatních řádů se živí nejen dravě, ale i saprofyticky a paraziticky. Mezi podřády roztočů se řadí čmelíkovci, sametkovci, zákožkovci a klíšťata (Ixodida) (Molyneux et al., 1993).

Klíšťata se dělí do čeledí Argasidae (klíšťáci; anglicky „soft ticks“), Ixodidae (klíšťata; anglicky „hard ticks“) a Nuttalliellidae. Až na výjimky všechna vývojová stadia sají krev. Mají čtyři páry končetin, za čtvrtým párem vyúsťují dýchací otvory neboli stigmata. Tělo klíšťate se skládá z hlavové části (gnathosoma) a vlastního těla (idiosoma). Klíšťata se živí paraziticky a jejich ústní ústrojí je tomu přizpůsobeno – skládá se z hypostomu, pedipalp a chelicer. Hypostom je dlátovitý útvar pokrytý zpětně otočenými zoubky. Po stranách hypostomu se nacházejí chelicery (první pár příústních končetin) (Klompen et al., 1993)

Zástupci čeledi Argasidae neboli klíšťáci postrádají skutum neboli chitinizovaný tvrdý štítek na hřbetní straně. Gnathosoma (část klíšťete zahrnující jeho ústní a sací ústrojí) je na spodní straně těla a je kryta idiosomou. Sají krátkou dobu a opakovaně. Čeleď zahrnuje 186 druhů v různých rodech, z nichž nejznámější jsou *Antricola*, *Argas*, *Nothaspis*, *Ornithodoros* anebo *Otobius* (Bowman a Nuttall, 2008).

Na rozdíl od klíšťáků kryje hřbetní stranu zástupců čeledi Ixodidae skutum. Existuje dohromady asi 720 druhů ve 14 různých rodech (např. *Amblyoma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes* a další) (Barker a Murrell, 2004).

Skutum je u samic a samců různě veliké. Zatímco u samce pokrývá celé tělo, u nenasáté samice dosahuje jen do jeho poloviny či dokonce třetiny. Zbytek těla samice je tvořen měkkým, varhánkovitě složeným, kožovitým útvarem zvaným alloscutulum. Ten může po nasátí krve zvětšit svůj objem až 300x. Dospělci i nymfy mají vpředu dobře viditelnou gnathosomu (Dusbábek et al., 1976).

Na chodidlech předních nohou se nachází tzv. Hallerův orgán, který u klíšťat umožňuje detekci CO₂ – klíšťe díky němu dokáže vysлідit svou oběť (Klompen et al., 2000).

3.1.2 Životní cyklus zástupců čeledi Ixodidae

Životní cyklus klíšťete zahrnuje tři stadia: larva, nymfa a dospělec. Samice naklade na jaře kolem 5000 vajíček, z nichž se dožívá jen 1–3 % stadia dospělého. Z vajíček se za 6 až 36 týdnů líhnou larvy, které mají jako jediné stadium pouze tři páry nohou. Larva měří přibližně 0,8 mm a většinou parazituje na drobných hlodavcích. Po nasátí odpadne a dostává se do stadia tzv. metamorfózy (přeměny) a stává se z ní nymfa.

Nymfa bývá větší (asi 1,3 mm) a podobá se dospělému klíšťeti. Kromě větších zvířat se přisává i na člověka. Na hostitele vydrží čekat 1 až 2 roky. Po přisátí saje kolem šesti dní, poté odpadne a mění se konečnou metamorfózou na dospělého jedince (imágo) (Daniel et al., 1976).

Dospělá klíšťata atakují hostitele zejména na podzim a dokáží na něj čekat podobně jako nymfy i déle než rok. Parazítují na menších i větších zvířatech, jakož i na

člověku. Po nalezení vhodného místa pro sání roztáhne klíště pedipalpy, zachytí se na kůži pomocí zoubků na chelicerách a natrhne ji. Poté chelicery vytahuje zpět a vsune skrz poškozenou kůži hypostom. Klíště začne do rány vylučovat sliny obsahující proteiny, které mají několik funkcí. Brání vyjmutí klíštěte (vytvářejí tzv. cement), znecitlivují ranku, brání srážení krve a inhibují imunitní odpověď hostitele. Sání trvá obvykle jeden až dva týdny (Klompen et al., 1993, 2007).

Většina klíšťat čeledi Ixodidae je tříhostitelská, každé stádium má jiného hostitele. Některé druhy rodů *Hyalomma* a *Rhipicephalus* mají cyklus dvouhostitelský, kdy larva po nasání krve metamorfuje v nymfu, která pak saje na tom samém hostiteli a po odpadnutí se mění v dospělce a hledá si konečného hostitele. Některé druhy rodu *Rhipicephalus* mají dokonce pouze jednohostitelský cyklus, kdy všechny tři vývojová stádia sají na tom samém hostiteli (Volf a Horák, 2007).

3.1.3 Onemocnění přenášená klíšťaty

Klíšťata přenáší řadu infekčních onemocnění, která jsou způsobena různými patogeny – viry, bakteriemi i prvoky. Jelikož klíště může být přenašečem současně více patogenů, hostitel se může zároveň nakazit více nemocemi (Jongejan et al., 2004)

Jedno z nejznámějších a nejnebezpečnějších virových onemocnění přenášených klíštětem je klíšťová encefalitida, kterou způsobuje virus klíšťové encefalitidy. Inkubační doba viru je přibližně 14 dní. Po této době se objevuje první fáze onemocnění projevující se příznaky lehké chřipky. U části postižených jedinců pokročí infekce zhruba po týdnu do druhé fáze nemoci, kdy virus proniká do mozkových blan a mozku. Druhá fáze se projevuje silnými bolestmi hlavy, horečkami, popř. nevolností. U 10% pacientů následně dochází k tzv. postencefalickému syndromu trvajícím několik týdnů nebo i doživotně. Vyznačuje se bolestmi hlavy, poruchou spánku a koncentrace, depresi a někdy až obrnou horních končetin. Pokud virus zasáhne spodní centra mozku zodpovědného za základní životní funkce může dojít i k úmrtí pacienta. Spolu s lymfskou boreliózou je klíšťová encefalitida nejobávanější onemocnění přenášené klíšťaty v Evropě a výskyt obou těchto onemocnění v ČR i Evropě stále stoupá (Eisen, 2008). Proti viru klíšťové encefalitidy již existuje účinná humánní vakcína.

Mezi bakteriální onemocnění se řadí ehrlichioza (anaplazmóza), bartonelloza, rickettsioza, tularémie, návratné horečky nebo lymfská borelióza, která je jedním z nejčastěji se vyskytujících onemocnění. Lymfská borelióza je způsobena spirochetou z druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) a patří k polysystémovým onemocněním, napadajíc více orgánů, zejména kůži, nervovou soustavu, klouby a srdce. Nemoc má tři stádia. V prvním stádiu vzniká na kůži charakteristická červená oválná skvrna, tzv. erythema chronicum migrans, případně se objevují příznaky podobné chřipce. Ve druhém stádiu se již může onemocnění projevit poruchami nervového systému a to zejména nehnisavým zánětem mozkových blan, zánětem nervových kořenů, případně i obrnou lícního nervu (tzv. neuroborelióza). Po měsících i letech může nemoc pokročit do třetího stadia, charakterizovaného jak přítomností bakterie tak i přemrštěnou imunitní reakcí. Postižení je znatelné hlavně na kůži a kloubech. Kůže se stává velmi tenkou s prosvítajícími cévami a postižení kloubů se projevuje jejich bolestmi a otoky (McQuiston et al., 2000).

Rezervoárem tohoto patogena jsou nejčastěji drobní obratlovci, ale mohou to být i domácí zvířata. Proti lymfské borelióze zatím nebyla vyvinuta žádná účinná humánní vakcína, léčba spočívá v podávání antibiotik. Další onemocnění způsobené spirochetami rodu *Borrelia* je nemoc zvaná návratná horečka (relapsing fever). Původce, *B. recurrentis*, je přenášen klíšťaty čeledi Argasidae. Neléčená forma se projevuje několika opakujícími se cykly vysokých horeček. Léčí se antibiotiky (McQuiston et al., 2000).

Ehrlichioza je způsobena průnikem velmi malé bakterie z rodů *Anaplasma* a *Ehrlichia*, jež napadá granulocyty pacienta a projevuje se příznaky podobnými lymfské borelióze. Bartonelloza je vzácněji diagnostikované onemocnění, jež vyvolává intracelulární bakterie *Bartonella*, a je přenášeno z klíštěte na psy a kočky a z nich teprve na člověka. Běžně se po infekci objevuje zduření uzlin, horečka, bolesti kloubů a svalů. Pod pojmem rickettsioza se skrývá řada onemocnění, která jsou způsobena opět bakteriemi a to intracelulárním patogenem rodu *Rickettsia*. Mezi rickettsiozy patří např. purpurová horečka, Q horečka anebo horečka Skalických hor. Bývají provázené lokální obstrukcí cév, kašlem, horečkami, zánětem plic, někdy až deliriem a šokem. Další nemocí přenášenou klíšťaty je tularémie způsobená intracelulárním patogenem *Francisella tularensis*. Jako u předchozích onemocnění, tularémie má za následek horečky, zimnici, bolesti hlavy a malátnost. Proti žádnému z výše zmíněných

bakteriálních onemocnění není zatím k dispozici účinné očkování a jedinou léčbou jsou velké dávky antibiotik (McQuiston et al., 2000).

Onemocnění způsobené prvokem rodu *Babesia* se nazývá babezióza a je přenášena hlavně klíšťaty rodů *Rhipicephalus* a *Dermacentor*. Postihuje červené krvinky zejména oslabených pacientů, velmi často již trpících lymfskou boreliózou. Projevuje se únavou, nechutenstvím, bolestmi svalů a kloubů. Taktéž se léčí antibiotiky (McQuiston et al., 2000).

Zvláštní kategorií onemocnění je toxická paralýza, kterou nezpůsobuje žádný infekční patogen, ale neurotoxin produkovaný v klíštěcích slinných žlázách. Neurotoxin brání presynaptickému uvolnění acetylcholinu z neuromuskulárních plotének a způsobuje tak neuromuskulární blokádu, která může vést až k ascendentní paralýze se zástavou dechu. První projevy se objevují přibližně týden po přisátí, gradují velmi rychle v průběhu 1-2 dní a patří mezi ně ztráta hlasu, dušnost, zvracení, špatná koordinace až ochrnutí končetin. Tyto stavy jsou popsány zejména v souvislosti se sáním klíšťat *D. andersoni* a *D. variabilis* popřípadě také australského klíštěte *I. holocyclus*. Hostitele ochromí samotným sáním, nicméně již pouhým odstraněním sajících klíšťat dochází ke zlepšení stavu. V těžkých případech se podává klíštěcí antisérum (Muth et al., 1945, Stone et al., 1989).

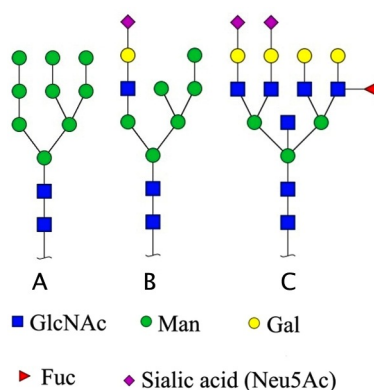
3.2 Glykosylace

Sacharidy jako takové se v organismu a buňkách vyskytují buď samostatně anebo vázané na proteiny či lipidy. Proces, při němž se naváže cukerná složka na protein, se nazývá glykosylace a je pro organismus přirozený. Více než polovina všech přirozeně se vyskytujících proteinů eukaryotních buněk je glykosylována (Apweiler et al., 1999). V závislosti na velikosti a typu cukerné složky dělíme glykosylované proteiny na glykoproteiny a proteoglykany. U proteoglykanů je sacharidová část, tzv. glykosaminoglykan, relativně velká a opakují se v ní podjednotky disacharidů. Glykoproteiny naproti tomu obsahují převážně rozvětvené oligochosacharidy s limitovaným počtem monosacharidů a strukturních motivů (Wyss et al., 1996).

Glykoproteiny dělíme podle typu vazby, kterou jsou oligosacharidové řetězce kovaletně vázány na proteiny, na N-glykoproteiny, O-proteiny, C-glykoproteiny a fosfoglykoproteiny.

3.2.1 N-glykosylace a klasifikace N-glykanů

N-glykosylace je obecně nejrozšířenějším typem glykosylací. Až tři čtvrtiny všech glykosylovaných struktur obsahuje N-vázané sacharidy (Apweiler et al., 1999). Procesem N-glykosylace se sacharidy kovaletně váží na asparagin v sekvenci Asn-Xxx-Thr/Ser, kde Xxx je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu. U N-glykoproteinů se redukující konec N-acetylglukosaminu (GlcNAc) váže k amidové skupině asparaginu (Mononen et al., 1984.). Všechny N-glykany obsahují základní strukturu nazývanou jádro, které je tvořené sekvencí (Man α 1-6(Man1-3)Man1-4GlcNAc1-4GlcNAc-Asn), kde Man je manóza (Silberstein a Gilmore, 1996). Na toto trimanosylové jádro se váží další sacharidové jednotky a podle jejich složení rozdělujeme N-glykany do tří typů (Obrázek 3.1) : vysoce manosylový typ, hybridní typ a komplexní typ (Wittmann et al., 2008).



Obrázek 3.1: Tři typy N-glykanů: a) hybridní typ, b) vysoce manosylovaný typ, c) komplexní typ.

Vysoce manosylovaný typ N-glykanů je poměrně jednoduchý. K manozám základní struktury jsou navázány další manózy, maximálně však šest dalších jednotek (Obr. 3.1A). Pokud se na jednu z manóz jádra připojí ještě jiné sacharidové zbytky, vzniká hybridní typ N-glykanů (Obr. 3.1B). Nejsložitějším typem N-glykanů je komplexní typ. Na manózy jádra se může vázat N-acetyllaktosamin (Gal β 1-4GlcNAc), kyselina sialová (NeuAc) či jiné sacharidy. O co víc, na proximální GlcNAc jádra se

mohou vázat další sacharidy (např. fukóza) (Obr. 3.1C). Díky velkému množství variant vazeb, kterými jsou další sacharidy vázány na manózy základní struktury, jsou N-glykany komplexního typu velmi rozmanité (Kornfeld a Kornfeld, 1985). Jako terminální jednotky se rovněž mohou objevovat různé sacharidy jako například kyselina sialová nebo fukóza.

Další možností modifikací je vazba dlouhých postranních řetězců skládajících se z poly-N-acetylaktosaminů nebo polysialových řetězců. Tato rozmanitost bočních řetězců jak v počtu i typu přispívá k velké diverzitě komplexních N-glykanů (Fukuda, 2000).

Rozmanitost glykoproteinů dále umocňuje přítomnost různých typů N-glykanů na jednom glykosylačním místě proteinu, čímž vznikají glykoformy proteinů, z nichž každá může mít svoji vlastní funkci (Rudd et al., 1994, 1997). Běžné je, že jeden glykoprotein obsahuje více N-glykosylačních míst, které mohou být modifikovány různými strukturami glykanů (Varki et al., 2009).

U členovců a hmyzu nacházíme obvykle jednodušší typy N-glykanů. Nejčastějším druhem jsou N-glykany tvořeny trimanosylovaným jádrem, kterému mohou ještě chybět jedna až dvě manózy (tzv. „truncated“ struktury) (Tomiya et al., 2004).

3.2.1.1 N-glykosylace členovců

Octomilka (*Drosophila melanogaster*) je jakožto modelový organismus nejhojněji probádaným organismem členovců. N-glykanů se vyskytuje u octomilky v porovnání se savci výrazně méně. Nejčastějšími strukturami, které byly popsány, jsou vysoce manosylované glykany – oligomanózový typ glykanu a paucimanózový typ glykanu $\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}_{0-1}\text{Man}_{2-4}$, který zatím u savců nebyl nalezen (Donald et al., 1995). Struktury se čtyřmi nebo pěti anténami nebyly u octomilky nalezeny vůbec. Hybridní a komplexní struktury byly v tkáních pozorovány také, ale celkově představují jen asi 12% glykomu octomilky, jelikož se gen pro N-acetylglukosaminyltransferázu II exprimuje oproti savcím buňkám ve výrazně menší míře (Aoki et al., 2007). Enzymy zodpovědné za přenos kyseliny sialové a galaktózy jsou u členovců také méně exprimovány, proto nejsou sialované proteiny či proteiny s navázanou galaktózou u členovců časté (Aoki et al., 2007). Zároveň má silnou expresi gen pro N-acetylglukosaminádazu odštěpující terminální N-acetylglukosamin. Z toho důvodu je hlavním N-glykanem produkovaným členovci vysoce manosylovaná struktura $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Varki et al., 2009).

3.2.1.2 N-glykosylace u klíšťat

Glykosylace byla dosud u klíšťat studována zejména nepřímými metodami pomocí lektinů, proteinů specificky vázajících sacharidy a glykany. V homogenátu celé larvy klíštěte *I. ricinus* byly pomocí lektinů prokázány komplexní glykany, stejně tak v případě homogenátu nymfy *I. ricinus*. U nymfy *I. ricinus* byly identifikovány také fukosylované glykany (Grubhoffer a Dusbábek, 1990, Uhlíř et al., 1994).

Při analýze orgánů částečně nasáté samice *I. ricinus*, byly pomocí lektinového barvení nalezeny všechny typy N-glykanů včetně fukosylovaných glykanů. Zkoumanými orgány v tomto případě byly kutikula, slinné žlázy, střeva a vaječníky (Uhlíř et al., 1994).

V jiné studii byly zkoumány slinné žlázy klíštěte *I. ricinus* s využitím elektronové mikroskopie a značenými lektiny a to včetně lektinů MAA II a SNA, které specificky rozeznávají kyselinu sialovou. V slinných žlázách nenasáté samice byla potvrzena přítomnost N-acetylgalaktosamin (GalNAc), N-acetylglukosamin (GlcNAc), i sialová kyselina (NeuAc). Ve slinných žlázách částečně nasáté samice byla nalezena zejména manóza (Man), ale také GalNAc, GlcNAc i NeuAc. Ještě víc glykosylovaných struktur bylo nalezeno ve slinných dukttech. Do té doby nebyla NeuAc u klíšťat prokázána, o to větší bylo překvapení, že se vyskytuje jak v buňkách slinných žláz, tak i ve slinných dukttech (Vancová et al., 2006).

V nedávné studii byla ve slinných žlázách nasáté nymfy klíštěte *I. scapularis* přímou metodou pomocí hmotnostní spektrometrie prokázána přítomnost vysoce manosylovaných glykanů, ale také vysoce manosylovaných glykanů s fukózou vázanou na proximální GlcNAc (proximální fukóza) a dvou proximálně fukosylovaných komplexních glykanů (Pedra et al., 2010).

Současně lze v genomu klíštěte *I. scapularis* (klíště příbuzné námi studovanému *I. ricinus*) najít vícero genů kódujících potenciální sialyltransferázy (www.ncbi.nlm.nih.gov) – enzymy, které katalyzují navázání kyseliny sialové na glykany. Exprese jednoho z těchto genů byla prokázána v buněčných liniích odvozených od klíštěte *I. ricinus* (J. Štěrba – nepublikované výsledky).

Ve slinných žlázách nenasáté samice ale také u samce klíštěte *I. ricinus* byly detekovány N-glykany včetně komplexních glykanů (J. Štěrba – nepublikované

výsledky). Komplexní glykany byly také potvrzeny u nenasátých nymf *I. ricinus*; ty v průběhu svého života sály jenom jednou (J. Dupejová – nepublikované výsledky). Přítomnost komplexních glykanů byla prokázána i v práci Dupejové et al. (2011) zaměřené na analýzu hemlipoglykoproteinu z hemolymfy klíštěte *D. marginatus*. Tento protein obsahuje čtyři různé glykanové struktury – dva vysoce manosylované a dva komplexní glykany. Z těchto informací lze jasně vyvodit, že klíště je schopno tvořit komplexní glykany (Dupejová et al., 2011).

3.2.1.3 Fukosylace N-glykanů

Fukosylace N-glykanů je běžným jevem jak u savců a vyšších organismů, tak i u členovců včetně klíšťat. N-glykany mohou být fukosylovány třemi různými způsoby: α 1-6 fukosylace proximálního N-acetylglukosaminu vyskytující se hlavně u savců a vyšších organismů; α 1-3 fukosylace proximálního N-acetylglukosaminu, která je velmi častá u hmyzu, parazitů nebo rostlin, ale u se savců vyskytuje jen výjimečně (oba typy budu dále společně označovat jako proximálně fukosylované glykany); dalším typem je fukóza vázaná α 1-2, α 1-3 anebo α 1-4 vazbou na terminální galaktózu nebo N-acetylglukosamin, popř. více terminálně vázaných zbytků fukózy (dále budu tento typ označovat jako terminálně fukosylované glykany) (Tretter et al., 1993).

Fukosylace je významná při organogenezi, zánětu, buněčné adhezi a svou roli hraje i při vzniku rakoviny anebo mikrobiální infekci. N-glykoproteiny hmyzu mají fukózu vázanou k proximálnímu N-acetylglukosaminu vazbou α 1-3 nebo α 1-6 a u octomilky se nachází glykany mono nebo difukosylované. Je zajímavé, že některé glykoproteiny vyskytující se v buňkách hmyzu mohou způsobovat alergickou reakci. Tu má za následek právě α 1-3 fukosylace proximálního N-acetylglukosaminu (Altman, 2007).

Jakou hraje fukosylace roli u klíšťat dosud není známo. Pedra et al. (2010) se zabývali kolonizací klíštěte patogenní bakterií *Anaplasma phagocytophilum*, a při tomto výzkumu prokázali význam fukosylace klíštěcích glykoproteinů pro tuto kolonizaci. Bakterie *A. phagocytophilum* je přenášena klíšťaty, např. rodu *Ixodes*, a u člověka způsobuje granulární anaplasmózu – v USA druhé nejčastější onemocnění přenášené klíšťaty. Pro úspěšnou kolonizaci savčích buněk potřebuje bakterie fukosylované a sialované glykoproteiny na povrchu těchto buněk (Reneer et al., 2006; Sarkar et al., 2007). U klíšťat rodu *Ixodes* Pedra et al. (2010) identifikovali α 1-3 proximálně

fukosylované N-glykoproteiny ve slinných žlázách a střevech. Takto fukosylované proteiny jsou pak nezbytné pro kolonizaci klišťecích buněk bakterií *A. phagocytophilum*. Zároveň je *Anaplasma* schopna indukovat produkci α 1-3 fukosylovaných glykoproteinů u klišťat, čímž si vytváří vhodné podmínky pro kolonizaci (Pedra et al., 2010).

3.2.1.4 Syntéza N-glykanů

Syntéza všech glykanů je katalyzována enzymy, které se obecně nazývají glykosyltransferázy, a probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER) a Golgiho aparátu. Syntéza N-glykanů savčích buněk začíná v ER tvorbou perkurzorového oligosacharidu skládajícího se ze tří jednotek glukózy, devíti jednotek manózy a dvou zbytků N-acetylglukosaminu ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Důležitou roli zde hraje dolichol pyrofosfát, polyisoprenoid zakotvený v membráně ER, který je orientován směrem do jeho lumen, a slouží jako přenašeč tohoto prekurzoru při syntéze (Burda et al., 1999, Silberstein et al., 1996; Imperiali et al., 1997). Z dolicholu je hotový prekurzor přenesen na asparagin v sekvenci Asn-Xxx-Thr/Ser za vzniku vysoce manosylovaného prekurzoru, ze kterého jsou syntetizovány všechny typy N-glykanů. V membráně ER jsou ukotveny glykosidázy, které tomuto prekurzoru odštěpí tři glukózy. Dále dochází v ER a cis-váčku Golgiho aparátu k dalším sestřihům celkově čtyř manóz. Výsledkem této úpravy je N-glykan vysoce manosylovaného typu. Aby došlo ke vzniku hybridního a komplexního typu, je potřeba ještě dalších zásahů. V první řadě odštěpení dalších dvou manóz. Enzymem N-acetylglukosaminyltransferáza I následně dochází k připojení N-acetylglukosaminu. V mediálních a trans váčcích Golgiho aparátu se mohou odehrávat další reakce, zejména kaskáda kroků, které vedou ke vzniku komplexních N-glykanů (Fukuda, 2000).

Všeobecně nejvíce studovanými organismy jsou savci a jiné modelové organismy. Výše popsaný postup glykosylace probíhá u savců. Až na vysoce konzervované dráhy N-glykosylace, existuje mnoho odlišností, co se týče glykanových struktur u obratlovců, bezobratlých a prokaryot. U prokaryot byla glykosylace proteinů zaznamenána zejména u patogenních bakterií (např. *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*) a u některých archebakterií (Abu-Qarn et al., 2008). U prokaryot dochází k syntéze N-glykanů na vnější straně cytoplazmatické membrány, v bakteriální periplasmě, na rozdíl od eukaryot, kde probíhá vždy v lumen ER. Nevíme, zda-li

bakteriální glykosylace probíhá také pouze kotranslačně nebo i posttranslačně. Jako glykosylační donor zde nefiguruje dolichol, ale jiný pyrofosfát – undekaprenylpyrofosfát. Sekvence, k níž jsou N-glykany připojovány, je u bakterií rozšířená o dvě aminokyseliny. Je popsána v podobě Asp-Xxx-Asn-Xxx-Ser/Thr, kde Xxx je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu. Vzniklý glykan už není u prokaryot dále sestřihován ani jinak upravován. Glykany prokaryot jsou tvořeny mnohem širším spektrem monosacharidů, např. N-glykosidické vazby se u prokaryot kromě N-acetylglukosaminu účastní také glukóza, N-acetylgalaktosamin, či rhamnóza (Weerapana a Imperiali, 2006).

Pro všechna eukaryota jsou počáteční kroky tvorby N-glykanů v ER stejné. Glykany členovců mají podobnou strukturu jako savčí glykany, avšak v pozdější fázi biosyntézy se úprava N-glykanů liší (Tomoya et al., 2004).

Je přitom zajímavé, že členovci by pravděpodobně mohli syntetizovat N-glykany stejně jako savci, poněvadž jsou geneticky vybaveni většinou odpovídajících enzymů, ty jsou ale produkovány pouze v určitých fázích vývoje. Aoki et al. (2007) se zabývali výzkumem embryí octomilky *D. melanogaster* a zjistili, že ty jsou kromě glykanů s vysokým obsahem manózy schopné vytvářet i hybridní a komplexní N-glykany. Dále identifikovali přítomnost kyseliny sialové u hybridních i komplexních N-glykanů. To poukazuje na to, že embryo octomilky je schopné biosyntetizovat komplexní dvouanténové struktury, jejichž rozmanitost je přirovnatelná k analogům vyskytujícím se u obratlovců (Aoki et al., 2007, North et al., 2006).

3.2.1.5 Význam N-glykosylace

Glykany navázané v N-pozici jsou nejběžnější a komplexně ovlivňují proteinů, které modifikují. Mají vliv na skládání proteinů v ER a Golgiho aparátu, sekreci proteinu (Spiro, 2004), mezibuněčný transport (Helenius et al., 2001) a komunikaci mezi buňkami (Dwek et al., 1996). Glykosylace je velmi důležitá pro správné sbalení proteinů i jejich funkci. N-glykany poskytují proteinům vyšší stabilitu, výhodné prostorové uspořádání, které chrání před proteázami a nescifickými interakcemi (Rudd et al., 2001), ale také prodlužují jejich životnost v plasmě (Sinclair et al., 2005). N-glykosylace má rovněž vliv na aktivitu enzymů, protože je často nezbytná pro dosažení správné aktivní konformace enzymu. Řízená deglykosylace vede ve většině případů ke znatelné redukci funkce proteinu, katalytické a vazebné aktivity právě z

důvodu destabilizace aktivní konformace enzymu (Skropeta, 2009). Na druhou stranu, existuje mnoho studií, kde odstranění N-glykanu vede ke zvýšení enzymatické aktivity, vazebné afinity a substrátové specifity. V několika případech se N-glykany vyskytují v doméně enzymu obsahující aktivní místo a jsou tedy nezbytné pro jeho enzymatickou aktivitu (Baboval et al., 2000). V některých případech N-glykosylace blokuje aktivní místo enzymu a tím zamezuje přístupu specifickému substrátu. Přítomnost kyseliny sialové je nezbytná např. pro vazbu parvoviru na povrchový receptor, který využívají k infekci (Scropeta, 2009).

3.2.2 O-glykosylace

O-glykosidická vazba je ta vazba, kterou se váže sacharid na hydroxylovou skupinu aminokyseliny. Může se uplatnit každá aminokyselina s hydroxylovou skupinou (Ser, Thr, Tyr) (Spiro, 1973). Známé jsou tři nejčastější typy. Mucinový typ je v živočišné říši nejrozšířenější. Je nazvaný podle glykoproteinu mucin, ve kterém byl tento typ O-glykosylace poprvé nalezen. Obsahuje vazbu tvořenou N-acetylgalaktosaminem navázaným na serin nebo threonin. V dalším typu O-glykanů jsou modifikovanými aminokyselinami také serin nebo threonin, ale váže se na ně N-acetylglukosamin. Tento typ glykanu byl první O-glykan, který byl nalezen u octomilky (Kelly a Hart, 1989). Třetí typ nalézáme u proteoglykanů, kde je na Ser a Thr vázána xylóza (Lidholt et al., 1988).

3.2.2.1 Syntéza O-glykanů

Syntéza O-glykanů probíhá z valné části v Golgiho aparátu za účasti glykosyltransferáz. Při putování příslušného proteinu nebo glykoproteinu Golgiho aparátem jsou jednotlivé monosacharidy připojovány k vhodným O-glykosylačním místům proteinu (Piller a Piller, 1993).

3.2.2.2 Význam a výskyt O-glykosylace

O-glykoproteiny se ve velké míře vyskytují na povrchu sliznic, tedy v gastrointestinálním a dýchacím traktu, kde vytváří souvislou hlenovou vrstvu poskytující hydrataci a ochranu a zabraňující průniku patogenů přes epitel. Hlen obsahuje O-glykoproteiny, které jsou schopny vázat lektiny na povrchu bakterií a tím zabraňují infekci organismu (Moran et al., 2011). Heterogenita glykoproteinů na sliznicích je značná. Čím větší je různorodost glykoproteinů ve vrstvě hlenu, tím větší je

šance, že se většina bakterií zachytí hlenem a nepronikne do epitelu (Fukuda et al., 2000). Tato diverzita je dána tím, že sliznice je tvořena různými typy buněk, které jsou schopny produkovat glykoproteiny. K heterogenitě přispívá jak různorodost proteinů, na které se O-glykan váže, tak i samotná rozmanitost oligosacharidového řetězce. Navíc jsou O-glykany vázané na proteiny v klastrech, díky tomu jsou přítomné ve vysoké koncentraci (Moran et al., 2011).

3.2.2.3 O-glykany členovců

Ve srovnání se savčími buňkami, mají buňky hmyzu a členovců O-glykany kratší a jednodušší. Například u octomilky je hlavním typem O-glykanu mucinu podobný disacharid (Gal1-3GalNAc) (Aoki et al., 2008). Pokud se připojí k této struktuře GlcNAc, vzniká další typ glykanu (Gal1-3(GlcNAc1-6)GalNAc). Druhým nejrozšířenějším typem O-glykanů u octomilky jsou různé formy disacharidů s glukoronylovým jádrem. Dále se v octomilce nacházejí O-glykany, které jsou připojené přes fukózu a mají terminálně vázanou kyselinu hexuronovou anebo hexózy, dále glykany vázané přes glukózu (Aoki et al., 2008).

Některé O-glykany se specificky distribují do různých tkání embrya. Např. nově popsaný glukuronový trisacharid GlcNAc1-3(GlcA1-4)fucitol byl detekován pouze v dorzální části křídel (Aoki et al., 2008, Yano et al. 2009).

Obecně u členovců nejčastěji nacházíme O-glykany tvořené pouze samotným N-acetylgalaktosaminem (tzv. Tn antigen), popřípadě může být k tomuto N-acetylgalaktosaminu β 1-3 vazbou navázána galaktóza (tzv. T antigen) (Mejia et al., 2006). U octomilky i u vosiček *Vespula germanica* byly nalezeny oba antigeny, Tn i T-antigen (Garenaux et al., 2011).

3.2.3 C-glykosylace

C-glykoproteiny vznikají navázáním manózy C-glykosidovou vazbou na C-2 uhlík tryptofanu, který je ve specifické sekvenci Trp-Xxx-Xxx-Trp. Glykosylace probíhá v ER a podobně jako u N-glykosylace se jí účastní dolichol, konkrétně dolicholfosfátmanóza (Doucey et al., 1998). Tento typ glykosylace byl nalezen u člověka i některých dalších savců (Krieg et al., 1997, 1998). U prokaryot nebo rostlinných buněk nebyla C-glykosylace nalezena a až v roce 2008 byla popsána u hmyzu (Munte et al., 2008).

3.2.4 Fosfoglykosylace

U fosfoglykoproteinů je cukerná složka navázána na proteinu fosfodiesterovou vazbou. Vyvolávají silnou imunitní odpověď (Haynes, 1998). Tento typ glykoproteinů dosud nebyl u savců zaznamenán, mezi fosfoglykoproteiny dosud patří pouze jedna z proteináz améby hlenky *Dictyostelium discoideum* (Gustafson et al., 1980) a fosfatáza parazitického prvoka rodu *Leishmania* (Ilg et al., 1994).

3.2.5 S-glykosylace

S-glykoproteiny byly objeveny teprve nedávno. Byly izolovány z bakterií *Lactobacillus plantarum* (Stepper et al., 2011) a *Bacillus subtilis* (Oman et al., 2011), konkrétně z jejich bakteriocinů. Bakteriociny jsou proteiny, které díky svým antimikrobiálním a baktericidním účinkům mohou být využívány jako konzervanty. Tyto vlastnosti proteinům poskytuje právě S-glykosylace. S-glykoproteiny vznikají vazbou monosacharidu na síru v thiolové skupině cysteinu. U bakterie *Bacillus* je tímto monosacharidem glukóza a u bakterie *Lactobacillus* N-acetylglukosamin (Venugopal et al., 2011).

3.2.6 Lektiny

3.2.6.1 Lektiny členovců

Lektiny jsou proteiny, které dokáží specificky rozpoznávat a vázat cukry. Nejsou imunitního původu a nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu. Obsahují alespoň jedno vazebné místo, na které se může reverzibilně navázat sacharid. Účastní se mnoha dějů závislých na specifickém rozpoznávání, jako například interakce patogena s hostitelem anebo kontakt buněk ve tkáních (Pneumans et al., 1995). U bezobratlých i obratlovců jsou lektiny součástí vrozené imunity, kde se podílejí na opsonizaci a aktivaci komplementu (Fujita et al., 2004). U členovců, kteří nemají specifickou imunitu, slouží lektiny jako funkční analogy imunoglobulinů a to díky jejich specifickému vázání se k sacharidovým strukturám v povrchových molekulách patogenů (Grubhoffer et al., 2004). Lektiny mohou také sloužit k přenosu patogenů vektorem. Např. galektin vyskytující se v mušce z rodu *Phlebotomus papatasi* je využíván parazitickým prvokem *L. major* jako receptor, jímž se naváže na stěnu střeva mušky (Kamhawi et al., 2004). Lektiny byly popsány již u mnoha druhů členovců (Grubhoffer et al., 1991, 1994, 1995

a 1997). Lektiny, které mají specifitu k sialové kyselině byly prokázány v hemolymfě, v hemocytech, v buňkách střeva a nefrocytech klíštěte *I. ricinus* (Kuhn et al., 1996). Mimo afinitu k sialové kyselině, byla prokázána afinita lektinů členovců také k N-acetylglukosaminu a galaktóze (Grubhoffer et al., 1991, 1994). Je možné, že lektiny hrají důležitou roli v přenosu viru klíšťové encefalitidy a spirochety *Borrelia burgorferi* způsobující lymfskou boreliózu (Kuhn et al., 1996).

Lektiny tvoří několik velkých rodin, které se liší strukturou a vazebnou specifitou k sacharidům. Jednou z těchto rodin jsou lektiny, jejichž vazba je závislá na ionech vápníku, tzv. C-lektiny. Tyto zahrnují celou řadu významných skupin, jako jsou kolektiny, selektiny, anebo lektiny na povrchu lymfocytů. Kolektiny jsou například důležité v obraně proti virům a bakteriím a to zejména díky jejich schopnosti rozpoznávat specifické struktury patogena (PAMP, z anglického Pathogen Associated Molecular Pattern), kterými jsou lipopolysacharidy nebo peptidoglykany. Vazba na tyto struktury má za následek aktivaci dějů, které omezují šíření infekce (neutralizace, opsonizace, aktivace komplementu, fagocytóza) (Vasta et al., 1999). Jinou skupinou C-lektinů jsou fibrinogenu podobné proteiny (FREPs – Fibrinogen RElated Proteins), které byly nalezeny také v klíšťatech (Kovář et al., 2000). FREPs obsahují fibrinogenu podobné domény, z nichž některé jsou schopny vázat sacharidy a u členovců jsou považovány za molekuly, které se podílejí na rozeznávání PAMP struktur patogenů a tím se podílejí na imunitní obraně (Natori, 2001).

Lektiny, včetně FREPs byly dosud potvrzeny u několika druhů klíšťat (Huang et al. 2007, 2010, Štěrba et al., 2009, 2011, shrnuto v Grubhoffer et al.). FREPs byly popsány u klíštěte *I. ricinus* – Ixoderin A, Ixoderin B a Ixoderin A-like, další u klíšťáka *O. moubata* – Dorin M (Kovář et al., 2000) a OMFREP (Grubhoffer et al., 2009).

Dorin M se vyskytuje především v hemocytech a hemolymfě klíšťat *O. moubata*. Tento protein o velikosti 640 kDa se skládá z podjednotek o velikosti 37 kDa, vykazuje silnou hemaglutinační aktivitu a má vazebnou afinitu ke kyselině sialové a N-acetylhexosaminům. Lektinové barvení Dorinu M naznačilo, že Dorin M obsahuje vysoce manosylovaný a komplexní typ glykanů (Kovář et al., 2000), což bylo dále potvrzeno hmotnostně spektrometrickou analýzou tohoto purifikovaného proteinu (Man et al., 2008). Geny pro ixoderiny mají vysokou homologii (75%) s genem pro Dorin M a OMFREP. Bylo potvrzeno, že Ixoderin A je přítomný ve střevě, slinných žlázách a

hemocytech klíštěte, a Ixoderin B je zastoupen pouze ve tkáni slinných žláz (Grubhoffer et al., 2009).

3.3 Hmotnostní spektrometrie ve výzkumu glykanů

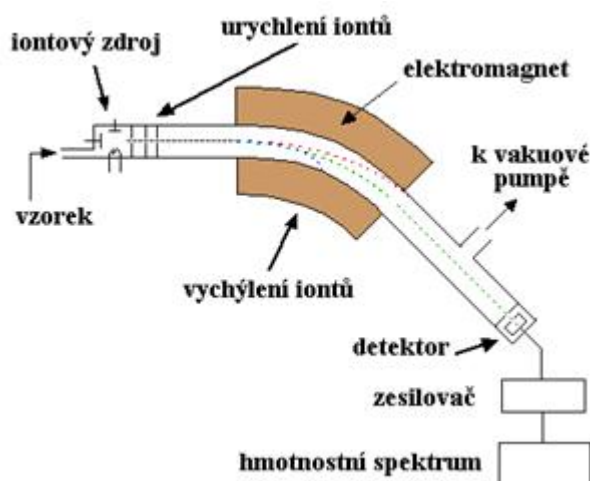
Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) se využívá již déle než sto let a první glykoprotein byl pomocí MS úspěšně analyzován před 30ti lety (Fenn et al., 1989).

MS je analytická metoda, která je využívána ke zjišťování složení mnoha chemických a biologických vzorků. Je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností a náboje v elektrickém nebo magnetickém poli, tedy měřením poměru m/z (angl. mass-to-charge neboli poměr hmotnosti a náboje) nabitých částic ve vakuu (Zaia, 2004).

Aby se molekulová hmotnost mohla změřit, musí se molekula nejprve převést do plynné fáze, čímž dostává náboj a stává se z ní iont. Iont se pohybuje elektrickým polem ve vakuu, díky elektrickému poli je urychlen a podle jeho pohybu lze vypočítat poměr hmotnosti a náboje. Dlouhou dobu bylo možné kvůli omezeným způsobům ionizace detekovat pouze látky s nízkou molekulovou hmotností. Později se přišlo na to, jak důležitý je kontrolovaný přenos energie na vzorek bez jeho tepelného rozkladu (Morris, 1980). K ionizaci vzorku se používá metoda ESI (ElektroSpray Ionization čili ionizace elektrosprejem) (Fenn et al., 1989), nebo metoda MALDI (Matrix Assisted Laser-Desorption/Ionization neboli desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice; Obr. 3.2) (Hillenkamp a Karas, 1988), která je v glykobiologii preferovanou metodou. Vzorek se smíchá s tzv. maticí (obvykle nízkomolekulární aromatickou kyselinou) a nechá se vykrytalizovat na vhodném nosiči, např. na nerezové destičce (MALDI destička). Matrice je schopna absorbovat elektromagnetické záření, rozpadá se a tím přenáší ionizační energii laseru na molekuly vzorku. Na molekulu vzorku se tak naváže kationt či aniont, vzniká radikál odštěpením elektronu a ionty analyzovaného vzorku se vypařují do vakuu analyzátoru. V případě glykanů dochází obvykle k vazbě jednoho ionu sodíku (popř. draslíku) na molekulu glykanu a díky tomu každé molekule glykanu odpovídá jenom jeden pík ve spektru, což výsledné spektrum výrazně zjednodušuje.

Tyto ionty jsou následně urychleny vysokým stejnosměrným elektrickým napětím. Ionty se stejným nábojem získají průchodem elektrickým polem stejnou energii ($E_{pot} = zU$, kde z je náboj a U elektrický potenciál). Následně letí vakuem určitou rychlostí od místa ionizace až k detektoru v závislosti na jejich hmotnosti a náboji. Rychlost závisí na jejich hmotnosti podle rovnice $E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$. Pomocí hodnoty doby letu v TOF analyzátoch (time-of-flight neboli doba letu) se potom vypočte poměr m/z . Další metody určování hmotnosti využívají jiné typy analyzátorů (quadrupól, iontová past, apod.) (Hillenkamp a Karas, 1988).

Používání matrice zabraňuje fragmentaci molekul již při ionizaci, proto lze s využitím MALDI ionizace sledovat i velké molekuly bílkovin, sacharidů a DNA. Díky ní lze také měřit více látek v témže vzorku najednou (Dass, 2001).



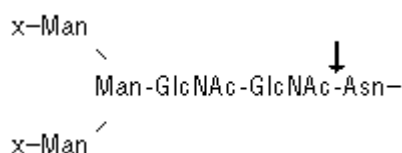
Obrázek 3.2: Schéma MALDI/TOF hmotnostního spektrometru (http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm).

3.3.1 MS/MS analýza

MS/MS analýza spočívá v navazující MS již analyzovaného vzorku. Slouží k určení přesné struktury a kompozice analyzovaných molekul. Nejprve je vyselektována jedna konkrétní molekula z celého spektra molekul ve vzorku. Tato je následně fragmentována (obvykle kolizí s molekulami plynu) a tyto fragmenty jsou analyzovány

obdobným způsobem, jako je tomu u MS experimentů a je určena jejich m/z hodnota. Ve srovnání se sekvenováním proteinů a nukleových kyselin je analýza glykanů vázaných na glykoproteiny mnohem náročnější a to kvůli jejich veliké heterogenitě (Garg et al., 2008).

Pro analýzu glykanů je vhodné tyto nejdříve oddělit od polypeptidu enzymovým štěpením. Enzymy, které jsou obvykle používány ke štěpení a uvolnění N-glykanů z glykoproteinu jsou endoglykosidázy PNGáza A a PNGáza F (N-glykosidáza, peptid-N-acetyl- β -glykosaminyl-asparagin amidáza, Obr. 3.3). PNGáza F štěpí vazbu mezi proximálním GlcNAc a asparagem. Uvolněné oligosacharidy jsou neporušené, ale asparagin je při štěpení deaminován na aspartovou kyselinu. PNGáza F ale nedokáže odštěpit oligosacharidy obsahující fukózu α 1-3-vázanou na proximální GlcNAc, které jsou časté u glykoproteinů rostlin a hmyzu. Pro uvolnění i těchto glykanů se používá PNGáza A (Maley et al., 1989).



Obrázek 3.3: PNGáza F hydrolyzuje téměř všechny typy N-glykanů z proteinů a glykoproteinů; x = H nebo sacharid (Garg et al., 2008).

MS umožňuje měřit molekulovou hmotnost glykanů. Složení jednotlivých sacharidů uvolněných z glykoproteinů mohou být určeny na základě přesné molekulární hmotnosti, již známých O- nebo N-glykanů nebo monosacharidů. Navazující MS potvrdí předpokládané složení a upřesní další detaily struktury (Viseux et al., 2001). Jeho podstatou je fragmentace molekuly glykanu a to buď v glykosidické vazbě mezi jednotlivými sacharidovými jednotkami anebo napříč kruhem sacharidů. Pro popsání vzniklých fragmentů se používá nomenklatura zavedena Domonem a Castellem (1988). Podle místa štěpení pak dělíme vzniklé ionty na ty s redukcujícím koncem (X, Y, Z) a na ty s neredukujícím koncem (A, B, C). Ionty A a X vznikají štěpením napříč kruhem sacharidů, ionty B, C, Y, Z vznikají štěpením v glykosidové vazbě.

V případě MALDI-TOF analýzy je potřebné při vyhodnocování hmotnostních spekter brát do úvahy i zdroj náboje – zatímco u ionizace pomocí ESI je náboj na

analyzované makromolekuly dodán obvykle protonem (H^+), u MALDI je to obvykle sodík (Na^+) (Domon a Castello, 1988).

Použití MALDI jako ionizační metody k určení molekulární hmotnosti oligosacharidů má mnohé výhody, obzvláště když je třeba analyzovat jednotlivé sacharidy v heterogenní směsi glykanů.

3.3.2 Permetylace

Pokud analyzujeme směs glykanů, ve které se mohou kromě neutrálních vyskytovat také negativně nabitě molekuly (obsahující karboxylovou skupinu), je výhodné odstranit náboj z těchto kyselých glykanů – díky tomu je pak možné analyzovat všechny glykany v hmotnostním spektrometru v jednom módu (v případě glykanů a MALDI-TOF je to v pozitivním módu). Jednou z možností je permetylace čili navázání metylové skupiny na hydroxylové skupiny glykanů. Permetylace tedy umožňuje analýzu různě nabitých sacharidů zároveň a také ulehčuje vyhodnocení následné fragmentační analýzy molekul. K výsledné molekulární hmotnosti glykanů je pak potřeba přičíst velikost metylové skupiny CH_3 bez jednoho vodíku ($M_r = 14,026$) pro každou hydroxylovou skupinu v glykanu (včetně $-OH$ karboxylových skupin) (Morelle et al., 2004).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Klíšťata

Klíšťata *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus* byla získaná z laboratorních chovů Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd, v.v.i. v Českých Budějovicích. Klíšťata byla chována při 26°C, ve vlhkém prostředí. Klíšťata sála na laboratorních morčatech a podle míry nasátí byla následně v pokusu rozdělena na nasátá (sála po dobu 6 dnů), částečně nasátá (3 dny) a nenasátá.

4.1.1.1 Klíšťecí vzorky

Částečně nasáté a nasáté samice, nenasáté nymfy a samci *I. ricinus* byli pitváni a z jednotlivých orgánů byly připraveny homogenáty (Tabulka 4.1). Dále byla zhomogenizovaná nasátá samice *D. marginatus*.

Tabulka 4.1. Orgány částečně nasatých a nasatých samic, nenasatých nymf a samců *I. ricinus*, ze kterých byly připraveny homogenáty.

| Klíště: | Orgány: |
|------------------------|-----------------|
| Částečně nasátá samice | kutikula |
| Nasátá samice | kutikula |
| Částečně nasátá samice | střeva |
| Nasátá samice | střeva |
| Částečně nasátá samice | slinné žlázy |
| Nasátá samice | slinné žlázy |
| Částečně nasátá samice | vaječníky |
| Nasátá samice | vaječníky |
| Částečně nasátá samice | ostatní orgány |
| Nasátá samice | ostatní orgány |
| Nenasátá nymfa | slinné žlázy |
| Nenasátý samec | slinné žlázy |
| Samec | celý + kutikula |

| | |
|----------------|---|
| Samec | celý + kutikula + střevo + ostatní orgány |
| Nenasátá nymfa | celá + kutikula |

4.2 Metody

Při přípravě klíštěcích orgánů jsem používala ultračistá rozpouštědla (HPLC grade).

4.2.1 Příprava homogenátů a tryptické štěpení

Klíštěcí orgány byly homogenizovány na přístroji TissueLyser II (Qiagen) po dobu 2 minut při 30Hz v 0,5 ml PBS (0,15 M NaCl, 0,01 M fosfátový pufr, pH 7,4) s inhibitory proteáz (Pierce). Homogenizované vzorky byly poté klarifikovány centrifugací 10 min při 10 000xg.

Dalším krokem přípravy vzorku bylo odstranění nízkomolekulárních sloučenin včetně volných glykanů (ty by pak při MS analýze nebylo možné odlišit od N-vázaných glykanů). 30 μ l supernatantu bylo smícháno s 30 μ l PBS (pH 7,4) a vzniklá směs byla centrifugována na ultrafiltrační centrifugační kolonce (mezní molekulová hmotnost 10 000, Millipore) při 4°C a 5 000xg do zahuštění na poloviční objem. Celý proces byl znovu opakován. Mezní molekulová hmotnost 10 000 byla zvolena s ohledem na možné velikosti volných glykanů.

K 30 μ l výsledného roztoku bylo přidáno 30 μ l 6M guanidinium hydrochloridu. Dále byly přidány 2 μ l 200mM dithiotreitolu (DTT), který redukuje cysteinové můstky. Tato směs byla zahřívána 30 min při 60°C. Následně bylo přidáno 8 μ l 200mM iodoacetoamidu a roztok byl ponechán 30 min ve tmě při pokojové teplotě. Po přidání 2 μ l DTT byl roztok opět inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 min. Nakonec bylo k roztoku přidáno 30 μ l PBS a 1 μ l roztoku trypsinu (10 mg/ml). Roztok byl inkubován za stálého třepání v 37°C nejméně 18 hodin. Takto jsem připravila trypsinem naštěpené peptidy a glykopeptidy, které lze použít pro další MS analýzy i pro izolaci glykanů.

4.2.2 Purifikace peptidů

Vzniklé peptidy byly z reakční směsi purifikovány extrakcí na pevné fázi pomocí centrifugační kolonky (náplň C18). Kolonka byla nejprve třikrát promyta 400 μ l 85% acetonitrilu (ACN) s 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TFA) a centrifugovaná při 1500xg 1 min. Všechny další centrifugace byly prováděny za stejných podmínek. Kolonka byla dále třikrát promyta 400 μ l 5% ACN s 0,1% TFA, poté bylo aplikováno 80-100 μ l vzorku a kolonka byla centrifugována. Nezadržená frakce byla ještě dvakrát znovu centrifugovaná přes tutéž kolonku. Nespecificky zachycené molekuly byly odmyty dvojnásobným promytím 100 μ l 5% ACN s 0,1% TFA. Peptidy zadržené na C18 náplni byly eluovány 300 μ l 60% ACN s 0,1% TFA. Nakonec byl eluát vysušen ve vakuu.

4.2.3 Uvolnění glykanů pomocí endoglykosidáz

Vysušený vzorek purifikovaných peptidů byl rozpuštěn v 15 μ l vody, k nimž bylo přidáno 0,1 μ l 10% SDS (dodecylsírán sodný), 0,4 μ l 200mM DTT a 4,5 μ l vody a vzniklý roztok byl inkubován 10 min při 100°C. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 3 μ l 500 mM fosfátového pufru (pH 7,5), 3 μ l 10% detergentu NP-40, 0,2 μ l PNGázy F (New England Biolabs) a 0,2 μ l PNGázy A (ProGlycAn) a 3,6 μ l vody. Reakce byla inkubována při 37 °C přes noc.

4.2.4 Purifikace glykanů

V dalším kroku byly purifikovány uvolněné glykany extrakcí na pevné fázi pomocí centrifugačních kolonek s náplní aktivního uhlí (Harvard Apparatus). Nejprve byl vzorek přečistěn na C18 koloně. C18 kolona byla připravena obdobně jako v kapitole 4.2.2 a podobným postupem byly připraveny i kolonky s náplní aktivního uhlí. Reakční směs po deglykosylaci byla aplikována na promytou C18 kolonu, centrifugovaná a kolonka byla poté ještě dvakrát promyta 100 μ l 5% ACN s 0,1% TFA. Všechny tři nezachycené frakce obsahující glykany byly poté aplikovány na promytou kolonku s náplní aktivního uhlí. Nezachycená frakce byla ještě dvakrát aplikována na kolonku pro maximální záchyt glykanů. Kolona byla následně dvakrát promyta 200 μ l 5% ACN s 0,1% TFA. Glykany byly z kolonky eluovány 200 μ l 65% ACN s 0,1% TFA a eluát byl vysušen ve vakuu.

4.2.5 Permetylace

Permetylace na pevné fázi probíhala na kuličkách NaOH (Sigma-Aldrich), které byly před použitím uchovávány v acetonitrilu. Kuličky byly aplikovány na prázdnou centrifugační kolonku (Harvard Apparatus) a následně centrifugovány při 1000xg 1 min.

Vysušené glykany byly rozpuštěny v 5 μ l vody a k roztoku bylo přidáno 70 μ l dimetylsulfoxidu a 25 μ l metyljodidu. Směs byla nanesena na kolonku obsahující kuličky NaOH, kolonka byla inkubována po dobu 15 min při pokojové teplotě a poté centrifugována 30 vteřin při 1000xg. K roztoku, který protekl kolonou, bylo přidáno dalších 25 μ l metyljodidu, celá směs byla opět aplikovaná na kuličky NaOH, inkubovaná 15 min a centrifugovaná 30 vteřin při 1000xg. Zbytky glykanů z kuliček byly uvolněny dvojnásobným promytím 100 μ l acetonitrilu, přičemž všechny tři frakce byly spojeny.

Permetylované glykany byly poté extrahovány pomocí chloroformu. K vzorku bylo přidáno 300 μ l chloroformu a 1 ml 0,5 M NaCl. Třepáním se glykany extrahovaly do chloroformu. Směs byla centrifugována 30 vteřin při 1000xg a horní vodní vrstva s metyljodidem byla odebrána. K organické fázi byl opět přidán 1 ml 0,5 M NaCl, následovalo protřepávání, centrifugace a odebrání vrchní vrstvy. Nakonec byl k roztoku přidán 1 ml vody a celý předchozí postup byl opakován. Organická fáze obsahující pročištěné permetylované glykany byla vysušena a glykany byly rozpuštěny v 1 μ l vody a uchovávány při -20°C (Alley et al., 2010).

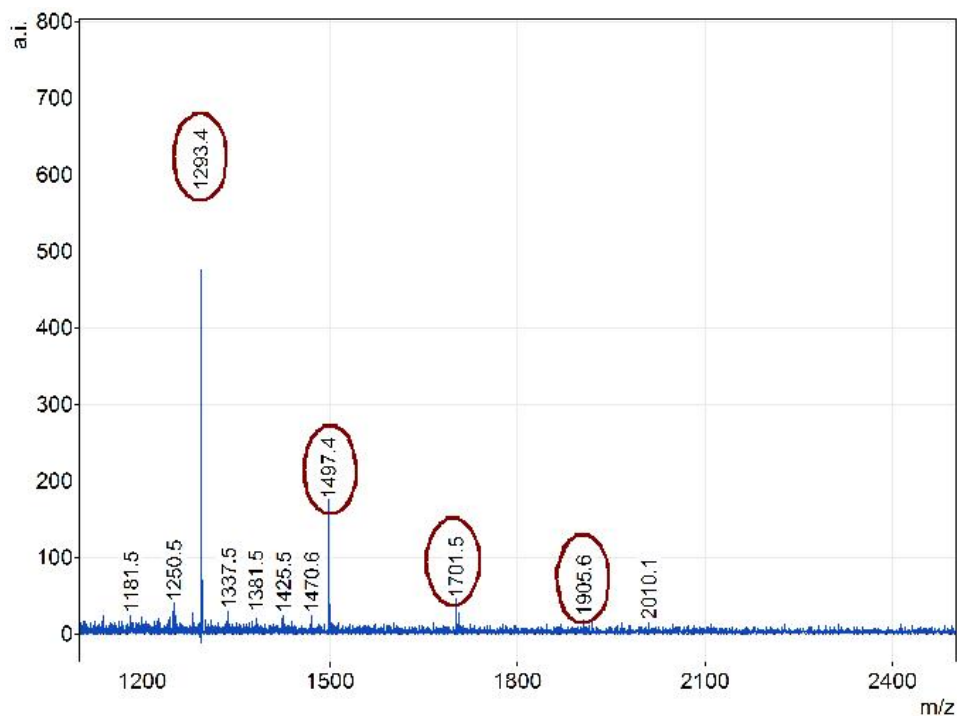
4.2.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostně spektrometrické analýzy byly provedeny v National Center for Glycomics and Glycoproteomics (Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN, USA) vedeném Prof. Milošem V. Novotným. 0,5 μ l roztoku permetylovaných glykanů bylo v duplikátech nakapáno na kovovou MALDI destičku a vysušeno ve vakuu. Na každý vzorek (spot) bylo přikapáno 0,5 μ l roztoku 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (10 mg/ml v 1 mM roztoku octanu sodného) a roztok byl znovu vysušen ve vakuu. Vzorky byly poté analyzovány přístrojem 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) v pozitivním módu. Data byla konvertována do

formátu mzXML (softverem ConvertPeakList, <https://www.proteomecommons.org>) a zpracována pomocí programů mMass (Strohalm et al., 2008) a GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008).

5 VÝSLEDKY

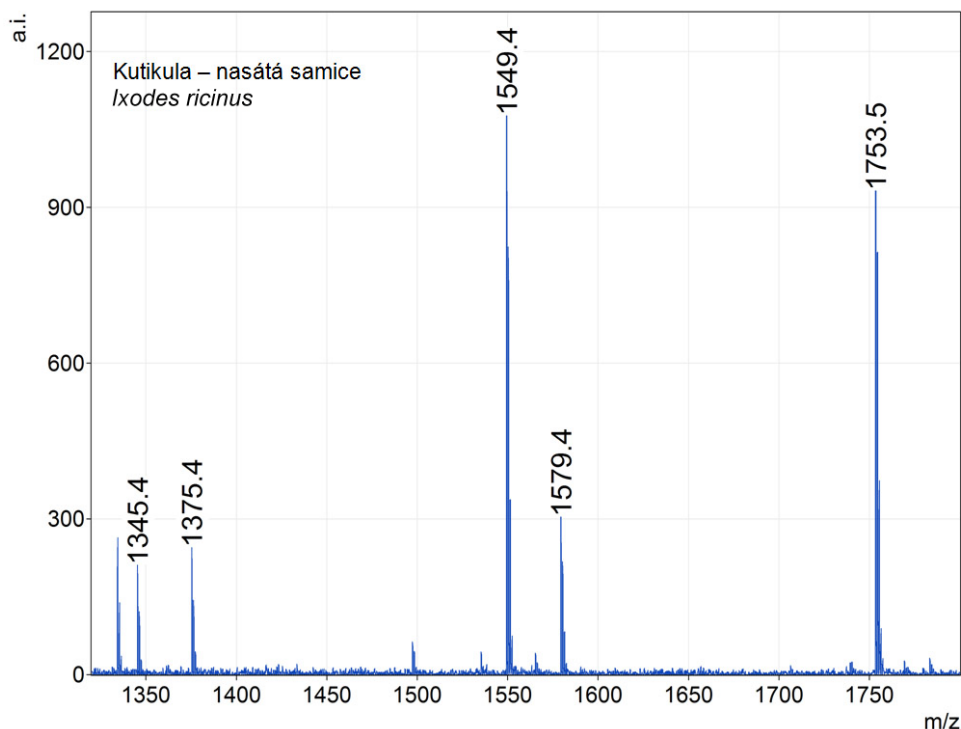
Jak ukazuje Tabulka 4.1, zpracovávala jsem celou řadu homogenizovaných orgánů klíštěte *I. ricinus* a jeden homogenát celé nasáté samice klíštěte *D. marginatus*. Bohužel některé vzorky byly kontaminovány neznámými polymery a dále sérií hexóz neznámého původu, které se ze vzorků nedaly odstranit a jejichž signál převládal ve spektrech těchto vzorků jak ukazuje Obrázek 5.1. Proto jsem dále zkoumala z orgánů pouze kutikulu a střeva částečně i zcela nasáté samice *I. ricinus*, dále slinné žlázy částečně nasáté samice *I. ricinus* a nakonec homogenát celého jedince – samice klíštěte *D. marginatus*., celkem tedy 6 vzorků.



Obrázek 5.1: MALDI-TOF spektrum N-glykanů z vaječníků nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus*. Zakroužkované glykany patří k sérii polyhexóz neznámého původu, které kontaminovaly vzorek.

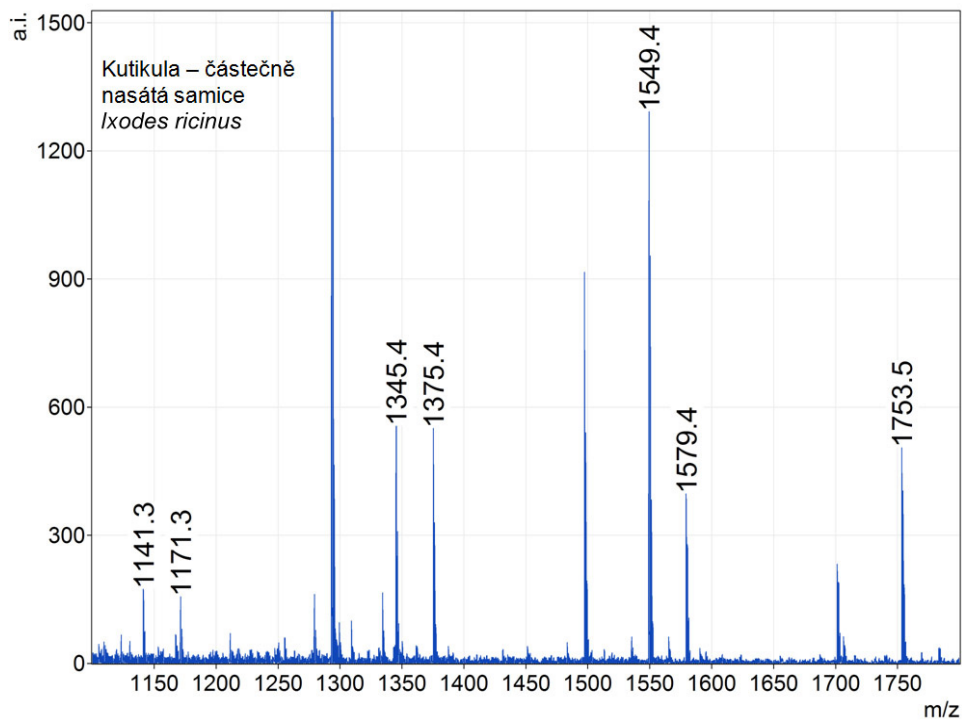
MALDI-TOF analýza umožnila identifikovat v jednotlivých vzorcích glykany a informovala o jejich hmotnosti (m/z, kdy z je vždy rovné 1). Díky programu Glycoworkbench byly navrženy potenciální struktury glykanů. Program Glycoworkbench má ve své databázi širokou škálu reálných glykanových struktur. Po zadání určité hodnoty m/z je program schopen poskytnout příslušné glykanové struktury

odpovídající dané hmotnosti m/z . Výsledné struktury byly potvrzeny MALDI-TOF/TOF analýzou.

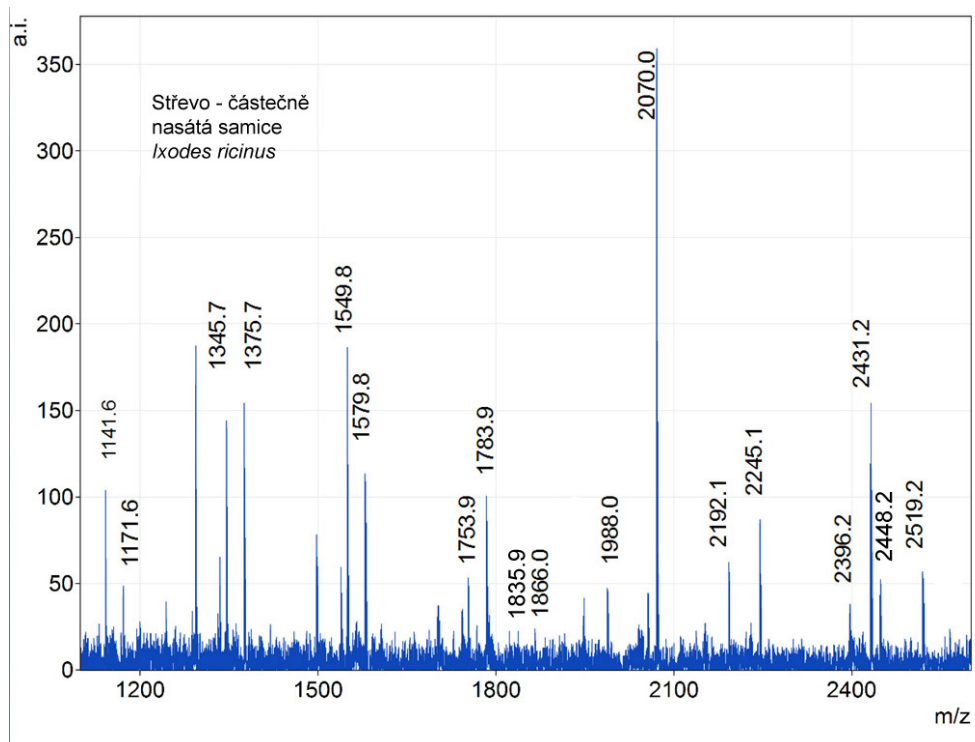


Obrázek 5.2: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných z kutikuly nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus*.

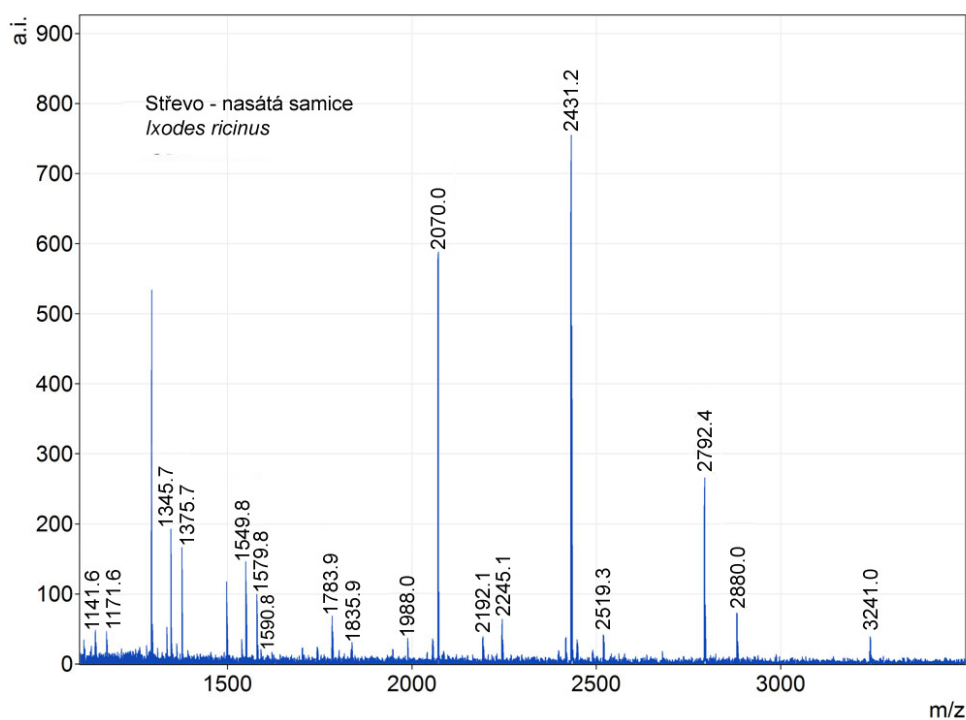
V kutikule nasáté samice klíštěte *I. ricinus* (Obr. 5.2) bylo nalezeno pět glykanových struktur: HexNAc₂Hex₃dHex (m/z 1345,7), HexNAc₂Hex₄ (m/z 1375,7), HexNAc₂Hex₄dHex (m/z 1549,8), HexNAc₂Hex₅ (m/z 1579,8) a HexNAc₃Hex₄ (m/z 1753,9). Ve spektru jsou dále viditelné adukty glykanů s iony draslíku (m/z hodnoty glykanů jsou pak zvýšené o 16,1) a kontaminace sérií polyhexóz (1293,6; 1497,7; 1707,8). V kutikule částečně nasáté samice klíštěte *I. ricinus* (Obr. 5.3) se navíc vyskytovaly ještě dva nejjednodušší N-glykany: HexNAc₂Hex₂ (m/z 1141,6), HexNAc₂Hex₃ (m/z 1171,6).



Obrázek 5.3: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných z kutikuly částečně nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus*.

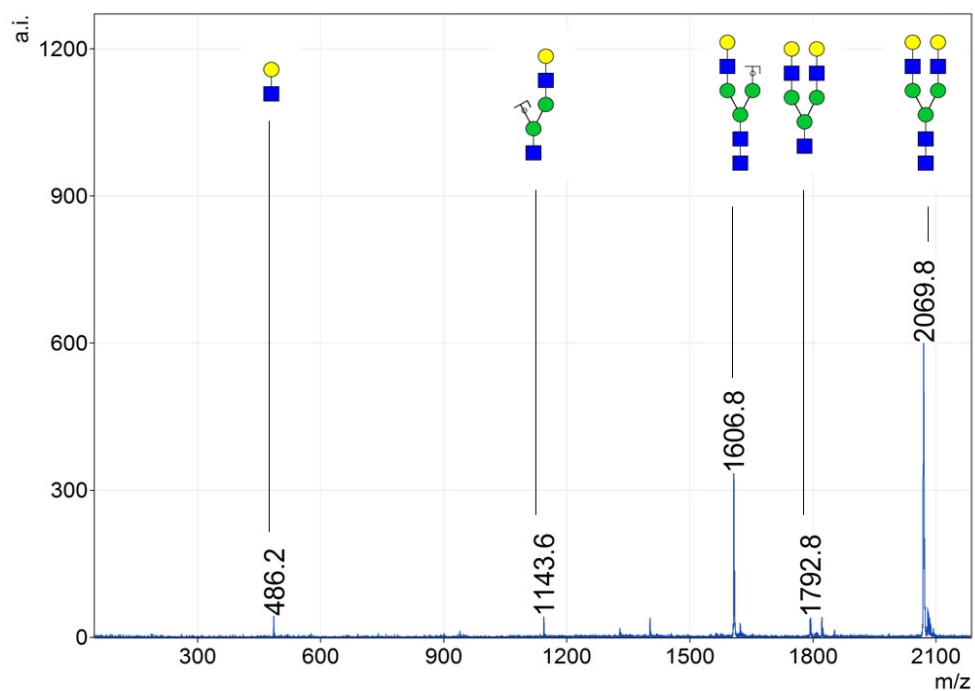


Obrázek 5.4: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných ze střeva částečně nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus*.

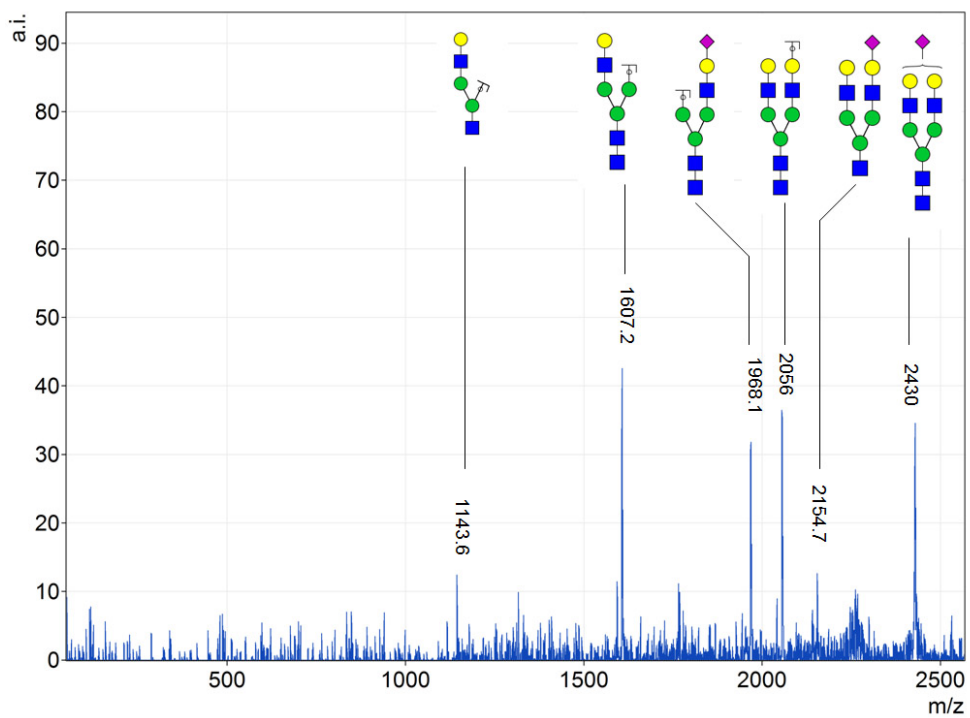


Obrázek 5.5: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných ze střeva nasáté samice klišťete *Ixodes ricinus*.

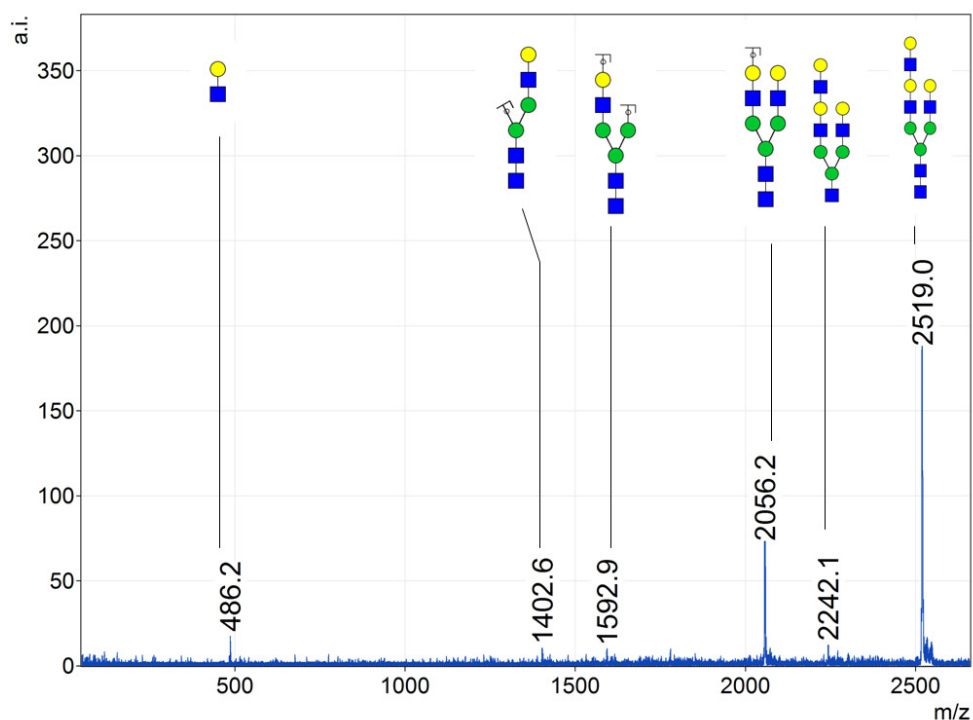
Ve střevě částečně nasáté samice *I. ricinus* (Obr. 5.4) byly nalezeny stejné glykanové struktury jako v kutikule částečně nasáté samice *I. ricinus*, a navíc také celá řada dalších, složitějších glykanů: HexNAc₂Hex₆ (m/z 1783,9), HexNAc₄Hex₃dHex (m/z 1835,9), HexNAc₄Hex₄ (m/z 1865,9), HexNAc₂Hex₇ (m/z 1988,0), HexNAc₄Hex₅ (m/z 2070,0), HexNAc₂Hex₈ (m/z 2192,1), HexNAc₂Hex₉ (m/z 2396,2), HexNAc₄Hex₄NeuAc (m/z 2431,2), HexNAc₄Hex₆Fuc (m/z 2448,2), HexNAc₅Man₆ (m/z 2519,3). N-glykany s m/z hodnotou 2070,0; 2431,2 a 2519,3 byly dále podrobně studovány MS/MS analýzou, díky níž bylo upřesněno jejich strukturální uspořádání (viz Obr. 5.6, 5.7 a 5.8).



Obrázek 5.6: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2070,0.

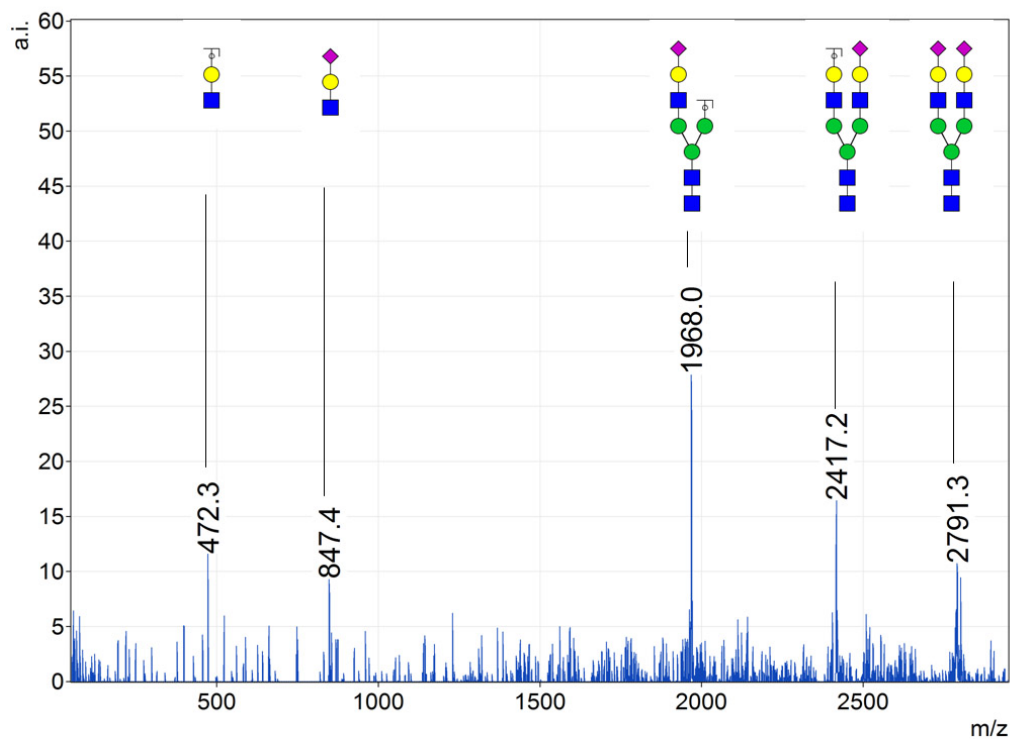


Obrázek 5.7: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2431,2.

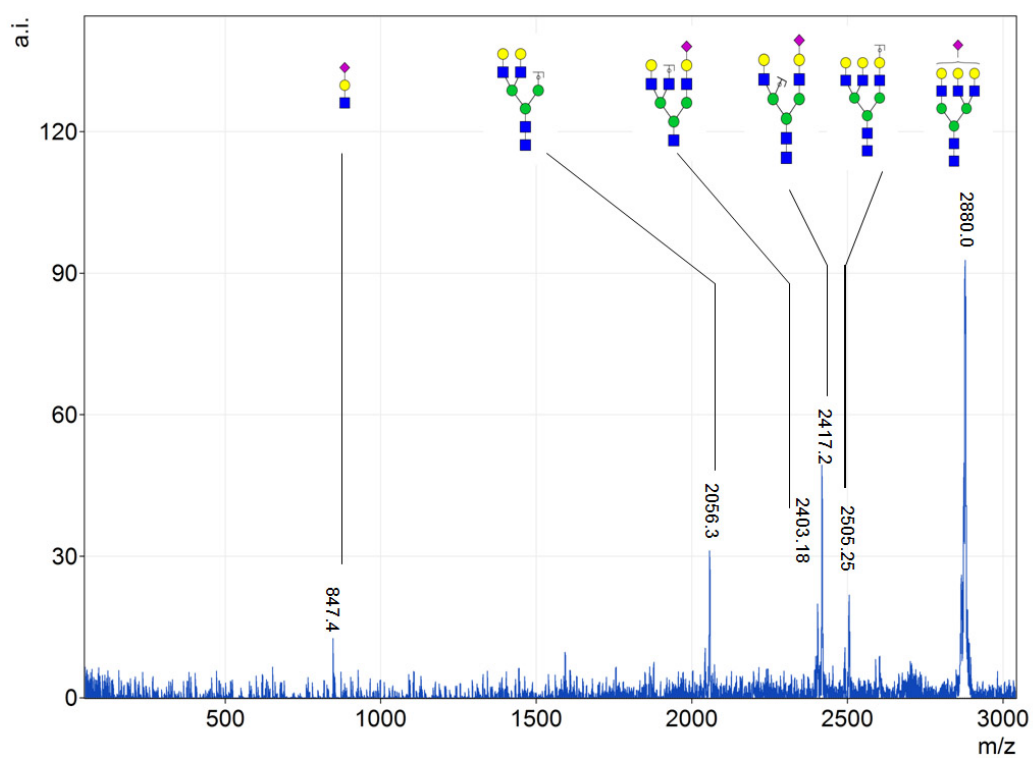


Obrázek 5.8: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2519,3.

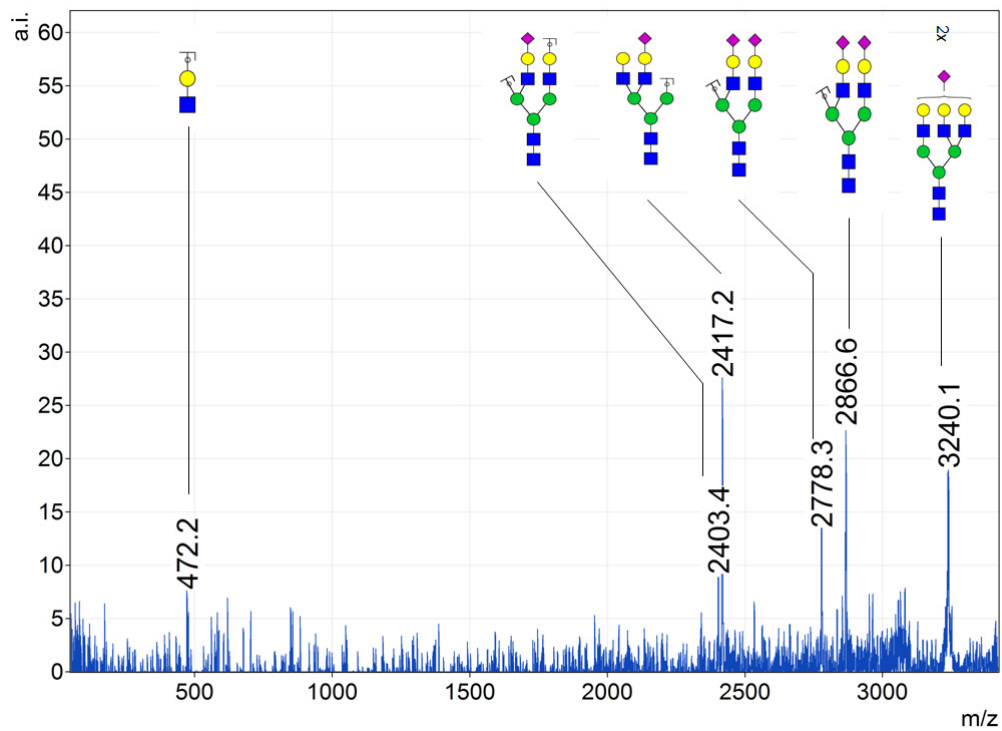
Sřevo nasáté samice *I. ricinus* (Obr. 5.5) obsahuje oproti střevu částečně nasáté samice *I. ricinus* čtyři glykany navíc, jeden komplexní glykan HexNAc₃Hex₃dHex a tři glykany obsahující kyselinu sialovou, které se vyskytovaly ze všech vzorků pouze ve vzorku střeva nasáté samice *I. ricinus* HexNAc₄Hex₅NeuAc₂ (m/z 2792,4), HexNAc₆Hex₅NeuAc (m/z 2880,4) a HexNAc₆Hex₅NeuAc₂ (m/z 3241,0). Tyto komplexní glykany byly dále zkoumány MS/MS analýzou (Obr. 5.9, 5.10 a 5.11), pomocí které byly upřesněny jejich struktury. Glykanové struktury s hodnotami m/z 2448,2; 2396,2; 1865,9 a 1753,9 naopak ve vzorku střev nasátých samic *I. ricinus* nebyly pozorovány.



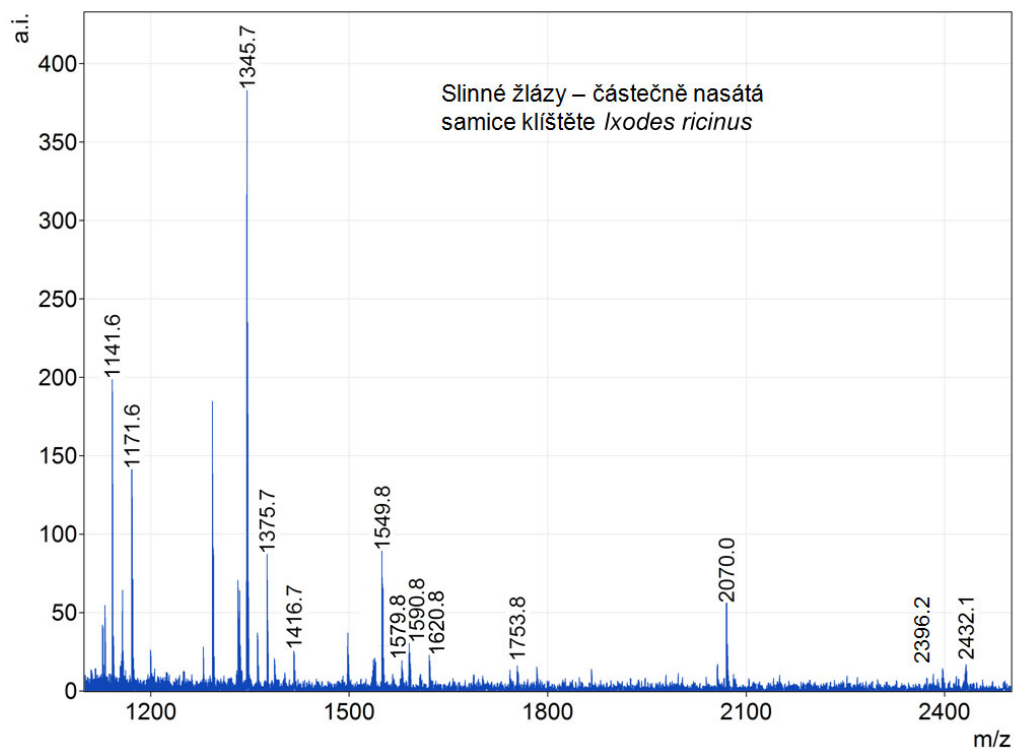
Obrázek 5.9: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2791,4.



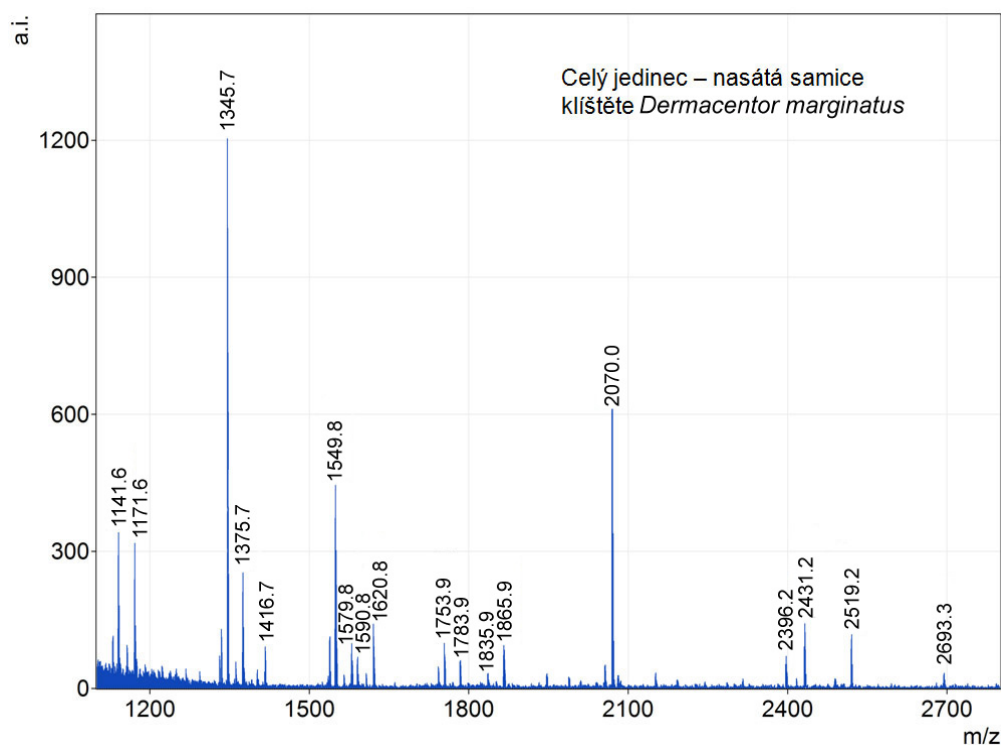
Obrázek 5.10: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2880,4.



Obrázek 5.11: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 3241,0.



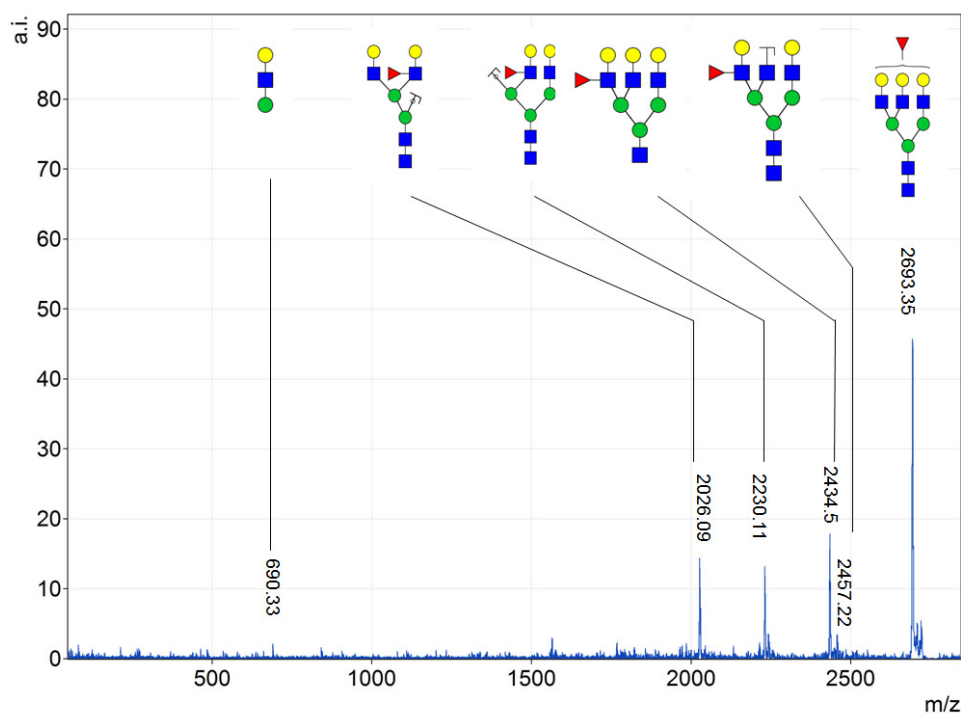
Obrázek 5.12: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných ze slinných žláz částečně nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus*.



Obrázek 5.13: MALDI-TOF spektrum N-glykanů purifikovaných z homogenátu samice klíštěte *Dermacentor marginatus*.

Slinné žlázy nasáté samice *I. ricinus* obsahují v porovnání se vzorky střev méně komplexních glykanů (Obr. 5.12). Pozorovány byly glykany s hodnotami m/z 1141,6; 1171,6; 1345,7; 1375,7; 1549,8; 1579,8; 1590,8 a m/z 2070,0 podobně, jako u N-glykanů ve vzorku střeva nasáté samice *I. ricinus*. Oba vzorky také obsahují sialovaný glykan HexNAc₄Hex₄NeuAc s m/z hodnotou 2432,1. Navíc jsou naopak přítomné glykany s jinými strukturami – HexNAc₃Hex₃ (m/z 1416,7), HexNAc₃Hex₄ (m/z 1753,9), vysoce manosylovanou strukturu HexNAc₂Hex₉ (m/z 2396,2) a glykan obsahující fukózu vázanou na proximální GlcNAc HexNAc₃Hex₄dHex (m/z 1620,8).

Vzorkem s největším počtem glykanů je homogenát celé nasáté samice klíštěte *D. marginatus* (Obr. 5.13). Glykany pozorované v tomto homogenátu odpovídají glykanům identifikovaným ve vzorcích homogenátů z klíšťat *I. ricinus* (Tab. 5.8). Jediným glykanem, který je unikátní pro tento vzorek je komplexní glykan obsahující fukózu (HexNAc₅Hex₆dHex, m/z 2693,4). Tento glykan se od ostatních fukosylovaných struktur pozorovaných v klíštěcích vzorcích liší terminálně vázanou fukózou (viz dále, Obr. 5.14).



Obrázek 5.14: MALDI-TOF/TOF spektrum iontů vzniklých fragmentací glykanu s hodnotou m/z 2693,6.

Celkově jsme v homogenátech orgánů z částečně nasáté a z nasáté samice *I. ricinus* a v homogenátu nasáté samice *D. marginatus* identifikovala dvacet pět glykanových struktur, které jsou shrnuty v Tabulce 5.7. Přítomnost jednotlivých glykanů v konkrétním vzorku je pak dále shrnuta v Tabulce 5.8. Z těchto struktur bylo sedm vysoce manosylovaných glykanů ($\text{HexNAc}_2\text{Hex}_{2-9}$), čtyři vysoce manosylované obsahující fukózu navázanou na proximální GlcNAc ($\text{HexNAc}_2\text{Hex}_{2-5}\text{dHex}$), čtyři hybridní glykany, všechny obsahující fukózu vázanou na proximální GlcNAc ($\text{HexNAc}_3\text{Hex}_{2-4}\text{dHex}$ a $\text{HexNAc}_3\text{Hex}_3\text{dHex}$) a deset komplexních glykanů ($\text{HexNAc}_4\text{Hex}_3\text{dHex}$, $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_4$, $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_5$, $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_6\text{dHex}$, $\text{HexNAc}_5\text{Hex}_6$, $\text{HexNAc}_5\text{Hex}_6\text{dHex}$), přičemž čtyři obsahovaly terminálně vázanou kyselinu sialovou ($\text{HexNAc}_4\text{Hex}_5\text{NeuAc}$, $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_5\text{NeuAc}_2$, $\text{HexNAc}_5\text{Hex}_6\text{NeuAc}$, $\text{HexNAc}_5\text{Hex}_6\text{NeuAc}_2$).

Tabulka 5.15: Souhrn všech glykanů vyskytujících se ve zkoumaných tkáních klíšťat *I. ricinus* a *D. marginatus*; u struktur, které jsou označeny hvězdičkou, jsou níže uvedeny i MS/MS spektra, podle kterých byly struktury potvrzeny.

| m/z | Hex | HexNAc | dHex | NeuAc | |
|------------|-----|--------|------|-------|--|
| 1141,6 | 2 | 2 | 1 | 0 | |
| 1171,6 | 3 | 2 | 0 | 0 | |
| 1345,67 | 3 | 2 | 1 | 0 | |
| 1375,7 | 4 | 2 | 0 | 0 | |
| 1386,7 | 2 | 3 | 1 | 0 | |
| 1416,71 | 3 | 3 | 0 | 0 | |
| 1549,77 | 4 | 2 | 1 | 0 | |
| 1579,78 | 5 | 2 | 0 | 0 | |
| 1590,8 | 3 | 3 | 1 | 0 | |
| 1620,81 | 5 | 2 | 1 | 0 | |
| 1753,87 | 4 | 3 | 0 | 0 | |
| 1783,88 | 6 | 2 | 0 | 0 | |
| 1835,93 | 3 | 4 | 1 | 0 | |
| 1865,94 | 4 | 4 | 0 | 0 | |
| 1987,99 | 7 | 2 | 0 | 0 | |
| 2070,035 * | 5 | 4 | 0 | 0 | |
| 2192,08 | 8 | 2 | 0 | 0 | |
| 2396,18 | 9 | 2 | 0 | 0 | |
| 2431,21* | 4 | 4 | 0 | 1 | |
| 2448,22 | 6 | 4 | 1 | 0 | |
| 2519,26* | 6 | 5 | 0 | 0 | |
| 2693,35* | 6 | 5 | 1 | 0 | |
| 2792,38* | 5 | 4 | 0 | 2 | |
| 2880,44* | 5 | 6 | 0 | 1 | |
| 3241* | 5 | 6 | 0 | 2 | |

Tabulka 5.16: Přehled glykanových struktur přítomných v jednotlivých homogenátech orgánů ze samic *I. ricinus* a v homogenátu samice *D. marginatus*.

| m/z | kutikula, částečně nasátá samice <i>I. ricinus</i> | kutikula, nasátá samice <i>I. ricinus</i> | střeva, částečně nasátá samice <i>I. ricinus</i> | střeva, nasátá samice <i>I. ricinus</i> | slinné žlázy, nasátá samice <i>I. ricinus</i> | celé klíště <i>D. marginatus</i> |
|---------|--|---|--|---|---|-------------------------------------|
| 1141,6 | X | | X | X | X | X |
| 1171,6 | X | | X | X | X | X |
| 1345,7 | X | X | X | X | X | X |
| 1375,7 | X | X | X | X | X | X |
| 1416,71 | | | | | X | X |
| 1549,77 | X | X | X | X | X | X |
| 1579,78 | X | X | X | X | X | X |
| 1590,8 | | | | X | X | X |
| 1620,81 | | | | | X | X |
| 1753,87 | X | X | X | | X | X |
| 1783,88 | | | X | X | | X |
| 1835,93 | | | X | X | | X |
| 1865,94 | | | X | | | X |
| 1988 | | | X | X | | |
| 2070,04 | | | X | X | X | X |
| 2192,08 | | | X | X | | |
| 2245,1 | | | X | X | | |
| 2396,18 | | | X | | X | X |
| 2431,21 | | | X | X | X | X |
| 2448,22 | | | X | | | |
| 2519,26 | | | X | X | | X |
| 2693,35 | | | | | | X |
| 2792,38 | | | | X | | |

6. DISKUZE

Moje práce byla zaměřena na určení N-glykomu klíšťat *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*, dále na analýzu jejich N-glykanů v tkáních klíštěte a jejich porovnání. Prokázala jsem celou řadu N-glykanů, mezi nimi vysoce manosylované, hybridní i komplexní glykany, z nichž některé byly modifikovány vazbou fukózy na proximální GlcNAc. V klíštěcích vzorcích jsem dále identifikovala čtyři sialované glykany.

Podobné N-glykany byly identifikovány i u jiných členovců, jako např. u octomilky *D. melanogaster*, kde se nejčastěji vyskytují vysoce manosylované a paucimanosylované N-glykany (GlcNAc₂Fuc₀₋₁Man₂₋₄), které mohou být modifikované vazbou fukózy na proximální GlcNAc (Natsuka et al., 2006, Hoffmann-Sommergruber et al., 2011). V mnohem menší míře se u nich našly komplexní N-glykany (přibližně 12% z celého glykomu u *D. melanogaster*). Je zajímavé, že množství komplexních N-glykanů se v průběhu vývoje *D. melanogaster* zvyšuje. Naopak, sialované glykany byly prokázány pouze u embryonálního stádia octomilky a tyto nebyly fukosylované. Jak se prokázalo, sialované glykany mají vliv na vývoj nervového systému u octomilky a tím i na celý vývoj jedince (Aoki et al., 2007).

V případě mnou studovaných klíštěcích vzorků byla velmi zajímavá přítomnost komplexních N-glykanů ve větším poměru k celkově nalezenému počtu N-glykanů než je tomu u *D. melanogaster*. Komplexní glykany a glykany obsahující kyselinu sialovou jsou u nižších organismů nalézány v nižší míře (Wilson et al., 2009) a obdobně lze tedy i u klíšťat očekávat spíše přítomnost vysoce manosylovaných struktur. Jedno z možných vysvětlení přítomnosti těchto N-glykanů v klíštěti je jejich původ z krve hostitele.

Spíše klíštěcí původ pozorovaných komplexních glykanů lze vyvodit ze známých informací o strukturách glykanů, pozorovaných u klíšťat. V práci Dupejové et al. (2011) zaměřené na analýzu hemlipoglykoproteinu z hemolymfy klíštěte *D. marginatus* byly mimo jiné analyzovány i N-glykany tohoto proteinu. Tento protein obsahuje čtyři různé glykanové struktury – dva vysoce manosylované a dva komplexní glykany. Jelikož se jedná o klíštěcí protein, je to potvrzením schopnosti klíšťat produkovat komplexní

glykany. Komplexní glykany byly dále pozorovány i při analýze homogenátů slinných žláz nenasáté samice i samce klíštěte *I. ricinus* (Šterba et al., 2010). U obou je sice možnost přetrvání hostitelských struktur v klíštěti i po metamorfóze z nymfy na dospělce, velké množství komplexních struktur ale poukazuje spíše na jejich klíštěcí původ. Podobně byly komplexní struktury pozorovány i u nenasátých nymf *I. ricinus* (Dupejová et al., 2011), které v průběhu svého života sály jenom jednou. Z těchto informací lze vyvodit, že klíšťata jsou schopné tvořit komplexní glykany.

Možnost přetrvání komplexních glykanových struktur v parazitovi po delší dobu lze ověřit porovnáním výsledků získaných z klíšťat s glykany pozorovanými u jiných krev sajících parazitů. Na spíše klíštěcí než hostitelský původ komplexních glykanů pak poukazuje porovnání s výsledky získanými při analýze N-glykanů z plošnice rodu *Triatoma*. U nasáté *T. infestans* byly zaznamenány téměř výlučně vysoce manosylované glykany a dále slabé signály pro tři jednoduché proximálně fukosylované vysoce manosylované glykany (J. Šterba – nepublikované výsledky). To odpovídá výsledkům získaným lektinovým barvením proteinů ze slin *T. infestans* (Volf et al., 1993). Pokud by komplexní N-glykany z hostitelské krve přetrvaly v organismu parazita delší dobu, byly by přítomny jak v nasátém klíštěti tak v nasáté ploštici.

Dalším typem glykanů, které se ve velké míře vyskytují v mnou studovaných klíštěcích vzorcích jsou glykany s fukózou navázanou na proximální GlcNAc. Tyto byly pozorovány i v jiných studiích klíštěcích vzorků, konkrétně v homogenátech slinných žláz a v klíštěcích slinách klíšťat *I. ricinus* (Šterba et al., 2010), ale i u konkrétních proteinů získaných z homogenátů celých klíšťat *I. scapularis* (Pedra et al., 2010). Proximální fukosylace N-glykanů byla pozorovaná i u jiného klíštěcího proteinu, Dorinu M z hemolymfy klíštěte *O. moubata* (Man et al., 2008). Tři N-glykosylační místa tohoto proteinu jsou modifikována ve dvou případech vysoce manosylovanými glykany a na třetí místo je vázán právě proximálně fukosylovaný glykan.

Přítomnost sialovaných struktur u hmyzu je v poslední době široce diskutována (Kuhn et al. 1996, Vancová et al., 2006, Aoki et al., 2007). V hemolymfě, hemocytech, buňkách střeva a nefrocytech klíštěte *I. ricinus* byla analýzou pomocí lektinů prokázána přítomnost kyseliny sialové (Kuhn et al. 1996). Ve slinných žlázách klíšťat *I. ricinus* byly sialované glykany dosud prokázány pouze elektronovou mikroskopií s využitím lektinů MAA II a SNA (Vancová et al., 2006). Současně lze v genomu klíštěte *I.*

scapularis (klíště příbuzné námi studovanému *I. ricinus*) najít vícero genů kódujících potenciální sialyltransferázy, tedy enzymů, které katalyzují připojení kyseliny sialové na komplexní glykany. Exprese jednoho z těchto enzymů byla prokázána v buněčných liniích odvozených od klíštěte *I. ricinus* (J. Štěrba – nepublikované výsledky). Sialyltransferázy jsou přítomné a exprimované i u jiných členovců, jako např. u *D. melanogaster* a výskyt sialovaných glykanů byl u octomilky potvrzen, společně s jejich významnou funkcí při vývoji nervové soustavy octomilky (Aoki et al. 2007).

Co se týče sialovaných glykanů, čtyři glykany obsahující kyselinu sialovou byly identifikovány ve střevě nasáté samice *I. ricinus*, jeden sialovaný glykan ve střevě částečně nasáté samice a ve slinných žlázách částečně nasáté samice *I. ricinus* a jeden sialovaný glykan v homogenátu celého klíštěte *D. marginatus*. Tyto glykany s navázanou kyselinou sialovanou neobsahovaly fukózu vázanou na proximální GlcNAc. Proximální fukosylace se zdá být charakteristická pro klíšťata (Štěrba et al., 2010), je tedy možné, že sialované glykany jsou spíše hostitelského původu.

Jakou hraje kyselina sialová roli v klíšťecím organismu, zatím není jasné. Je možné, že je významná při vývoji klíšťecího organismu stejně jako to bylo pozorováno u embryonálního stádia octomilky.

Sialová kyselina je u savců rozpoznávána sialoadhesiny (anglicky Siglecs – sialic acid binding Ig-like lectins), což jsou povrchové buněčné receptory a patří do superrodiny IgSF imunoglobulinů. Rozpoznání kyseliny sialové sialoadhesiny hraje roli v regulaci vrozené i získané imunity u savců tím, že ji potlačují (Crocker et al., 2001). Ve slinách a slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* byla identifikována kyselina sialová (Vancová et al., 2006) i sialoadhesin (Vancová et al., 2008, 2011). Je proto možné, že klíště je schopno využívat kyselinu sialovou a sialoadhesin z hostitelské krve a tím potlačovat imunitní odpověď hostitele, kterou se hostitel brání proti klíšťecímu sání.

Pokud porovnáваме výskyt glykanů v jednotlivých orgánech, je zřejmé, že největší počet různých struktur N-glykanů, převážně komplexních a hybridních, se vyskytuje ve střevech. Slinné žlázy nasáté samice *I. ricinus* obsahují spíše vysoce manosylované a hybridní glykany a méně komplexních. Ve slinných žlázách jsou přítomny tři typy komplexních N-glykanů, z nichž jeden obsahuje dokonce kyselinu sialovou. Zdrojem komplexních glykanů ve všech klíšťecích vzorcích mohou být

hostitelské glykoproteiny, čemuž by odpovídalo menší zastoupení komplexních a sialovaných glykanů ve slinných žlázách. Přesto intenzita značení sialovaných struktur lektiny MAA II a SNA ve slinných žlázách (Vancová et al., 2006) a velmi malé množství hostitelských proteinů v extraktech slinných žláz a slinách (Wang et al., 1994, 1995) naznačují, že mnou pozorované komplexní glykany mohou být i klíštěcího původu.

Přítomnost sialovaných glykoproteinů byla potvrzena i izolací hostitelského sialoadhesinu (Siglec) z homogenátu slinných žláz nasátých samic *I. ricinus* (Vancová et al., 2008). Izolace byla provedena lektinovou afinitní chromatografií s využitím lektinu MAA II pravděpodobně díky sialované molekule, na kterou byl sialoadhesin navázaný. V této práci ale tato sialovaná molekula nebyla identifikovaná, podobně také nebyl určen její původ.

Největší počet různých struktur N-glykanů byl identifikován v homogenátu celého klíštěte *Dermacentor marginatus*. Kromě celé řady N-glykanů, které byly nalezeny i ve střevech samic *I. ricinus*, se u tohoto vzorku jako u jediného ze všech vyskytoval i glykan s hodnotou m/z 2693,4, který se od ostatních liší v tom, že je terminálně fukosylovaný. Tento způsob fukosylace je charakteristický pro vyšší živočichy a byl nalezen například u CD45 receptoru lidských leukocytů (Sato et al., 1993) ale také u lidského α 1-kyselého glykoproteinu (Fournet et al., 1978). Výskyt terminálně fukosylovaného proteinu s podobným složením byl pozorován také u buněk lidského karcinomu dělohy (Stroop et al., 2000). Obdobné struktury ale dosud nebyly zaznamenány u členovců. Jelikož v mé práci byl tento glykan identifikován v homogenátu celé nasáté samice, které organismus mohl obsahovat i velké množství původních hostitelských glykoproteinů v různém stadiu natrávení, je vysoce pravděpodobné, že tento glykan byl hostitelského původu a příslušný glykoprotein ještě nebyl stráven a nacházel se v krvi (obsahu střev) nebo ve vezikulách střevních buněk klíštěte. Z celkového počtu všech glykanů vyskytujících se v tomto vzorku vyskytoval terminálně fukosylovaný pouze jeden glykan, z čehož můžeme soudit, že velká většina hostitelských proteinů byla strávena a v našich vzorcích se tedy hostitelské glykany vyskytovaly jen ve velmi malé míře.

7 ZÁVĚR

Cílem mé práce byla analýza N-glykanů v tkáních klíštěte *Ixodes ricinus* a celého homogenátu klíštěte *Dermacentor marginatus*. Úspěšně byly připraveny a analyzovány vzorky z několika orgánů klíštěte *I. ricinus* a homogenátu nasáté samice *D. marginatus*. Při svém výzkumu jsem identifikovala vysoce manosylované, hybridní i komplexní glykany, z nichž některé obsahovali fukózu vázanou na proximální GlcNAc. Dále jsme identifikovala čtyři N-glykany obsahující kyselinu sialovou. Vysoce manosylované glykany a proximálně fukosylované glykany se vyskytovaly v klíštěcích vzorcích ve velké míře a z výsledků dřívějších studií s jistotou můžeme tvrdit, že jsou klíštěcího původu.

Na rozdíl od ostatních členovců se v mých vzorcích vyskytovalo velké množství komplexních glykanů. Identifikovala jsem je ve slinných žlázách a především ve střevech klíštěte *I. ricinus* a dále v celém homogenátu *D. marginatus*. V celém homogenátu klíštěte *D. marginatus* byla potvrzena přítomnost terminálně fukosylovaného komplexního glykanu. Tento typ fukosylace je charakteristický pro vyšší živočichy a je tedy vysoce pravděpodobné, že tento glykan pocházel z hostitele. Ve čtyřech komplexních glykanech byla zaznamenána přítomnost kyseliny sialové, která se mezi členovci vyskytuje pouze vzácně. Její původ nemůžeme s jistotou určit. Je však pravděpodobné, že tyto sialované glykany jsou klíštěti vlastní a je možné, že jsou významné při vývoji klíštěcího organismu stejně jako to bylo pozorováno u octomilky.

Přesný původ sialovaných glykanů je možné určit s využitím bioortogonálních derivátů cukrů v kombinaci s in vitro feedingem popř. klíštěcích buněčných linií. Potvrzení přítomnosti sialovaných glykanů a molekulární podstata využití těchto struktur klíštětem při sání nám umožní lépe pochopit proces sání a v budoucnu také vyvinutí nových prostředků boje proti klíšťatům a popř. jiným členovcům a tím také zamezením šíření klíšťaty (členovci přenášených nemocí).

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

dHex – deoxyhexóza

ER – endoplasmatické retikulum

FReP - fibrinogen-related protein, fibrinogenu podobné proteiny

Fuc – fukóza

Gal – galaktózae

GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin

Glc – glukóza

GlcNAc – N-acetyl-D-glukosaminu

Hex – hexóza

HexNAc – N-acetylhexosaminem

MAA (MAA II) – *Maackia amurensis* (II) agglutinin, lektin

MALDI TOF/TOF – Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight/
Time-of-Flight

Man – manóza

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

NeuAc – neuraminová kyselina neboli kyselina sialová

SNA – *Sambucus nigra* agglutinin, lektin

9 LITERATURA

- Abu-Qarn M., Eichler J., Sharon N. (2008). Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 544-550.
- Alley W.R., Madera M., Mechref Y., Novotny M.V. (2010). Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated *N*-linked glycans: A potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Anal Chem* 2010, 82, 5095-5106.
- Altmann F. (2007). The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 142, 99-115.
- Aoki K., Perlman M., Lim J.M., Cantu R., Wells L., Tiemeyer M. (2007). Dynamic developmental elaboration of *N*-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J Biol Chem*, 282, 9127-9142.
- Aoki K., Porterfield M., Lee S.S., Dong B., Nguyen K., McGlamry K.H., Tiemeyer M. (2008). The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. *J Biol Chem*, 283, 30385-30400.
- Apweiler R., Hermjakob H., Sharon N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473, 4-8.
- Baboval T., Koul O., Smith F.I. (2000). N-glycosylation site occupancy of rat alpha-1. *Biochim Biophys Acta*, 475, 383-389.
- Barker S.C., Murrell A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129,15-36.
- Bowman A.S., Nuttall P.A. (2008) Ticks: biology, disease and control. *Cambridge University Press*, New York, pp 506, 344-376.
- Burda P., Aebi M. (1999). The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 239-257.

- Ceroni A., Maass K., Geyer H., Geyer R., Dell A. and Haslam S.M. (2008). GlycoWorkbench: A Tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Prot Res*, 7, 1650-1659.
- Daniel M., Černý V., Dusbábek F., Honzáková E., Olejníček J. (1976). Influence of microclimate on the life cycle of the common tick *Ixodes ricinus* (L.) in thermophilic oak forest. *Folia Parasitol*, 23, 327-342.
- Dass C. (2001). Principles and practise of biological mass spectrometry. New York: John Wiley a Sons, Inc, pp 448.
- Domon B., Costello C.E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J*, 5, 397-409.
- Donald L.J., Eric E.F. (1995). Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells, *Virology* 212, 500-511.
- Doucey M.-A., Hess D., Cacan R., Hofsteenge J. (1998). Protein C-mannosylation is enzymecatalysed and uses dolichol-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell*, 9, 291-300.
- Dupejova J., Sterba J., Vancova M., Grubhoffer L. (2011). Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. *Parasit Vectors*, 4, 4.
- Dupejová J., Vancová M., Novotný M., Alley W.R., Jr., Mann B.F. (2011). Core-fucosylation in *Ixodes ricinus* ticks: Life-stage- and structure-specific detection. Sborník, XV. Meeting of Biochemists and Molecular Biologists, Brno, Czech Republic .
- Dusbábek F., Rosický B. (1976). Argasid ticks (Argasidae, Ixodoidea) of Czechoslovakia. *Acta Sc Nat Brno*, 10, 1-43.
- Dwek R.A. (1996). Glycobiology: toward understanding the function of sugar. *Chem Rev*, 96, 683-720.
- Eisen L. (2008). Climate change and tick-borne diseases: A research field in need of long-term empirical field studies. *Int J Med Microbiol*, 298,12-18.

- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. *Science*, 246, 64-71.
- Fournet B., Montreuil J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart F.G., Binette J.P., Schmid K. (1978). Determination of the primary structures of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma alpha 1-acid glycoprotein by 360-MHZ ¹H NMR spectroscopy and permethylation analysis. *Biochemistry*, 17, 5206-5214.
- Fujita, M.M., Endo Y. (2004). The lectin-complement pathway-its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*, 198, 185-202.
- Fukuda M. (2000). Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. In: Fukuda M, Hindsgaul O. (Eds.). Molecular and cellular glycobiology. *Oxford University Press Inc.*, New York, USA. 1-61.
- Garenaux E., Maes E., Levêque S., Brassart C., Guerardel Y. (2011). Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material. *Carboh Res*, 346, 1093-1104.
- Garg H.G., Cowman M.K., Hales C.A. (2008). Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications. Oxford: *Elsevier*, pp 414, 45-53.
- Grubhoffer L., Dusbábek F. (1991). Lectin binding analysis of *Argas polonicus* tissue glycoproteins. *Vet Parasitol*, 38, 235-247.
- Grubhoffer L., Muška M., Volf P. (1994). Midgut haemagglutinins in five species of tsetse flies (*Glossina* spp.): Two different lectin systems in the midgut of *Glossina tachinoides*. *Folia Parasitol*, 41, 229-232.
- Grubhoffer L., Noriega F. (1995). Midgut lectins of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Cell Biochem*, 21, 207.
- Grubhoffer L., Hypša V.A, Volf P. (1997). Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vector. *PARASITE*, 4, 203–16.
- Grubhoffer L., Kovář V., Rudenko N. (2004). Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology*, 129, 113-125.

- Grubhoffer L., Rego R.O.M., Hajdušek O., Hypša V., Kovář V., Rudenko N., Oliver J. H. (2008). Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Nuttal, P.A., Bownam, A.S., editors. Ticks: Biology, disease and control. Cambridge University Press, Cambridge, pp 506, 406-458.
- Grubhoffer L., Hajdušek O., Vancová M., Štěrba J., Rudenko N. (2009). Glycobiology of ticks, vectors of infectious diseases: carbohydrate binding proteins and glycans. *FEBS J*, 276, 141.
- Gustafson G.L., Milner L.A. (1980). Occurrence of N-acetylglucosamine-1-phosphate in Proteinase I from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 255, 7208-7210
- Haynes P.A. (1998). Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, 8, 1-5.
- Helenius A., Aebi M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-9.
- Hoffmann-Sommergruber K., Paschinger K., Wilson I.B.H. (2011). Glycomarkers in parasitic infections and allergy. *Biochem Soc T*, 2011, 39, 360-364.
- Ilg T., Overath P., Ferguson M.A.J., Rutherford T., Campbell D.G., McConville M.J. (1994). O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem*, 269, 24073-24081.
- Imperiali B. (1997). Protein glycosylation: the clash of the titans. *Acc Chem Res*, 30, 452-459.
- Jongejan F., Uilenberg G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129, 3-14.
- Kamhawi S., Ramalho-Ortigao M., Pham V.M., Kumar S., Lawyer P.G., Turco S.J., Barillas-Mury C., Sacks D.L.A, Valenzuela J.G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119, 329-341.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988). Laser desorption-Ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal Chem*, 2, 151-153.

- Kelly W.G., Hart G.W. (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: Localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell*, 57, 243-251.
- Klompen J.S.H., Black IV W.C., Keirans J.E., Norris D.E. (2000). Systematics and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. *Cladistics*, 16, 79–102.
- Klompen J.S.H., Oliver J.H. (1993). Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae), *Systematic Entomology*, 4, 313–331.
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem*, 54, 631-664.
- 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.
- Krieg J., Gläsner W., Vicentini A., Doucey M.-A., Löffler A., Hess D., Hofsteenge J. (1997). C-mannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. *J Biol Chem*, 272, 26687-26692.
- Krieg J., Hartmann S., Vicentini A., Gläsner W., Hess D., Hofsteenge J. (1998). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-Xxx-Xxx-Trp. *Mol Biol Cell*, 9, 301-309.
- Kuhn K.H., Uhlíř J., Grubhoffer L. (1996). Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). *Parasitol Res*, 82, 215–221.
- Lidholt K., Riesenfeld J., Jacobsson K.G., Feingold D.S., Lindahl U. (1988). Biosynthesis of heparin. Modulation of polysaccharide chain length in a cell-free system. *Biochem J*, 254, 571-578.
- Maley F., Trimble R.B., Tarentoni A.L., Plummer T.H. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, 180, 195-204.
- Man P., Kovář V., Štěrba 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.

- McQuiston J.H., Childs J.E., Chamberland M.E., Tabor E. (2000). Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion*, 40, 274–284.
- Mejia J.S., Bishop J.V., Titus R.G. (2006). Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? *Trends Parasitol*, 22, 367-370.
- Molyneux D.H. (1993). Vectors In: Francis E. G. Cox. Modern parasitology: a textbook of parasitology (2nd ed.). *Wiley – Blackwell.*, pp 277, 53–74.
- Mononen I., Karjalainen E. (1984). Structural comparisons of prootein sequences around potential N-glycosylation sites, *Biochim Biophys Acta*, pp788, 364-367.
- Moran A.P., Gupta A., Joshi L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut*, 60, 1412-1425.
- Morelle W, Slomianny M.-C., Diemer H., Schaeffer C., Dorsselear A., Michalski J.-C. (2004). Fragmentation characteristics of permethylated oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight (TOF/TOF) tandem mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22, 2637–2649.
- Morris HR. (1980). Biomolecular structure determination by mass spectrometry. *Nature*, 286, 447-452.
- Munte C.E., Gäde G., Domogalla B., Kremer W., Kellner R., Kalbitzer H.R. (2008). C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect *Carausius morosus*. *FEBS J*, 275, 1163-1173.
- Muth O.H. (1945) Tick paralysis in beef cattle due to *Dermacentor andersoni*. *North Am Vet*, 26, 668
- Natori S. (2001). Insect lectins and innate immunity. *Adv Exp Med Biol*, 484, 223-228.
- Natsuka S., Ishida M., Ichikawa A., Ikura K., Hase S. (2006). Comparative biochemical study of N-linked glycans from skin of a squid, *Todarodes pacificus*. *J Biochem*, 140, 87-93.
- North S.J., Koles K., Hembd C., Morris H.R., Dell A., Panin V.M., Haslam S.M. (2006) Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconjugate J*, 23, 345-354.

- Oman T.J., Boettcher J.M., Wang H., Okalibe X.N., van der Donk W.A. (2011). Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chem Biol*, 7, 78-80.
- Pedra J.H., Narasimhan S., Rendic D., DePonte K., Bell-Sakyi L., Wilson I.B., Fikrig E. (2010). Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol*, 12, 1222-1234.
- Piller F., Piller V. (1993). Structural characterization of mucin-type O-linked oligosaccharides. In: Fukuda M., Kobata A. (Eds.). *Glycobiology: A practical approach*. Oxford University Press Inc., New York, USA. pp 401, 291-328.
- Pneumans, W.J., van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 109, 347-52.
- Reneer D.V., Kearns S.A., Yago T., Sims J., Cummings R.D., McEver R.P., Carlyon J.A. (2006). Characterization of a sialic acid and P-selectin glycoprotein ligand-1-independent adhesin activity in the granulocytotropic bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol*, 8, 1972-1984.
- Rudd P.M., Joao H.C., Coghill E., Fiten P., Saunders M.R., Opdenakker G., Dwek R.A. (1994). Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochemistry*, 33, 17-22.
- Rudd P.M., Dwek R.A. (1997) Glycosylation, heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 32, 1-100.
- Rudd P.M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I.A., Dwek R.A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science*, 291, 2370- 2376.
- Sarkar M., Reneer D. V., Carlyon J. A. (2007). Sialyl-Lewis x-independent infection of human myeloid cells by *Anaplasma phagocytophilum* strains HZ and HGE1. *Infect Immun*, 75, 5720–5725.
- Sato T., Furukawa K., Autero M., Gahmberg C.G., Kobata A. (1993). Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45. *Biochemistry*, 32, 12694-12703.

- Skropeta D. (2009) Effect of N-glycans on enzyme activity. *Bioorg Med Chem*, 17, 2645-2653.
- Silberstein S., Gilmore R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J*, 10, 849-858.
- Sinclair A.M., Elliott S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties. *J Pharm Sci*, 94, 1626–1635.
- Spiro R.G. (1973) Glycoproteins. *Adv Protein Chem*, 27, 349-467.
- Spiro R.G. (2004). Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell Mol Life Sci*, 61, 1025-1041.
- Stepper J., Shastri S., Loo T.S., Preston J.C., Novak P., Man P., Moore C.H., Havlíček V., Patchett M.L., Norris G.E. (2011). Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett*, 585, 645-650.
- Stone B.F., Binnington K.C., Gauci M., Aylward J.H. (1989) Tick/host interactions for *Ixodes holocyclus*: role, effects, biosynthesis and nature of its toxic and allergenic oral secretions. *Exp Appl Acarol*, 7, 59-69.
- Strohalm M., Hassman M., Košata B., Kodíček M. (2008). mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spec*, 22, 905-908.
- Stroop C.J., Weber W., Gerwig G.J., Nimtz M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F. (2000). Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology*, 10, 901-17.
- Sterba J., Dupejova J., Fiser M., Vancova M. and Grubhoffer L. (2011). Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. *Parasit Vect*, 4,127.
- Štěrbá J., Dupejová J., Fišer M., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. (2009). Identification and characterisation of lectins in several tick species, *FEBS J*, 276, 88.

- Štěrbá J., Vancová M., Alley W.R., Jr., Mann B.F., Bučinská L., Dupejová J., Grubhoffer L. (2010). Analysis of minute volumes of tick saliva samples using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. Sborník, MicroScale Bioseparations 2010, Prague, Czech Republic.
- Tomiya N., Narang S., Lee Y.C., Betenbaugh M. (2004). Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycocon J*, 21, 343-360.
- Tretter V., Altmann F., Kubelka V., März L. and 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, *Int Arch Allergy Immunol*, 102, 259-266.
- Uhlíř J., Grubhoffer L., Borský I., Dusbábek F. (1994) Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. *Med Vet Entomol*, 8, 141-150.
- Vancová M., Zacharovová K., Grubhoffer L., Nebesářová J. (2006). Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *J Parasitol*, 92, 431-440.
- Vancová M., Bučinská L., Štěrbá J., Nebesářová J., Grubhoffer L. (2008). The presence of sialic acid in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. Sborník, INTERLEC23, Edinburgh/Stirling, Scotland, UK.
- Vancová M., Štěrbá J., Dupejová J., Šimonová Z., Nebesářová J., Novotný M.V., Grubhoffer L. (2011). Uptake and incorporation of sialic acid by the tick *Ixodes ricinus*. Odesláno, *Parasitol Res*.
- Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (2009). Essentials of Glycobiology, 2nd edition. *Cold Springs Harbor Laboratory Press*, New York, pp784, 199-218.
- Vasta G.R., Quesenberry M., Ahmed H., O'Leary N. (1999). C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol*. 23, 401-420.

- Venugopal H., Edwards P.J.B., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M. (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, 50, 2748-2755.
- Viseux N., Hronowski X., Delaney J., Domon B. (2001). Qualitative and quantitative analysis of the glycosylation pattern of recombinant proteins. *Anal Chem*, 73:4755-4762.
- Volf P., Grubhoffer L., Hošek P., 1993: Characterisation of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. *Veterinary Parasitology* 47, 327–337.
- Volf P., Horák P. (2007) Paraziti a jejich biologie. *Triton*, Praha, pp318.
- Wang H., Nuttall P.A. (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, 109, 525-530.
- Wang H., Nuttall P.A. (1995). Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunol*, 17, 517-524 .
- Weerapana E.A, Imperiali B. (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems, *Glycobiology*, 6,91-101.
- Wilson I.B.H., Paschinger K., Rendic D. (2009). Glycosylation of model and 'lower' organisms. In: Gabius HJ editor: *The sugar code, Fundamentals of glycosciences*. Weinheim, Willey – Vch, 139-154.
- Wittmann V. (2008). In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*. 2nd edn , Fraser-Reid B.O., Tatsuta K., Thiem J. editors, *Springer*, Berlin, pp1736.
- Wyss D.F., Wagner G. (1996). The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr Opin Biotechnol*, 7, 409-416.
- Yano H., Yamamoto-Hino M., Goto S. (2009). Spatial and temporal regulation of glycosylation during *Drosophila* eye development. *Cell Tissue Res*, 336, 137-147.

Zaia J. (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, 23, 161-227.

internetové odkazy:

www.ncbi.nlm.nih.gov

http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm