

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Význam sialovaných glykoproteinů pro klíště**  
***Ixodes ricinus***

Diplomová práce

**Bc. Jaroslav Ondruš**

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

České Budějovice 2016

Ondrus J., 2016: Význam sialovaných glykoproteinů pro kličtě *Ixodes ricinus*. [The importance of the sialylated glycoproteins for the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 94 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** Sialic acid is a highly abundant and a common component of vertebrate glycans, where it can be found in the terminal positions of the cell surface glycoconjugates. The amount of sialylated glycoconjugates as well as their complexity vary between both different species and different tissue types within one individual. Considering the vertebrates, these well studied structures are known to be important for cell-cell interactions, cell adhesion and immunity.

In contrary, sialic acid in arthropod glycans has been identified only in a limited number of species. In obligatory blood feeding parasites such as ticks, distinguishing between sialylated glycoproteins of tick and host origin is challenging due to huge volumes of ingested blood containing heavily sialylated structures of host origin. In the tick *Ixodes ricinus*, the presence of minor amount of tick's sialylated structures has been shown previously in the ovaries and salivary glands, however, their role remains completely unknown.

In this thesis, we study the importance and role of both the tick-originating and the host sialylated glycoproteins for *I. ricinus*, the tick commonly found in Czech Republic. We show that the tick-originating sialylated glycoproteins are present in *I. ricinus* eggs, and that their amount changes over time after laying the eggs. Furthermore, these molecules were localized in cryosections of 14 days old eggs and in the larvae using confocal microscopy. In addition, we shed some further light on the role of sialic acid for ticks in the tick blood meal. According to our results, the glycan part of glycoproteins is the key in recognition of these molecules by tick cells.

**Key words:** sialic acid, ticks, *Ixodes ricinus*, IRE/CTVM 19, glycoproteins, glycoprotein recognition

Tato diplomová práce byla financována z projektů GAP302/12/2490, 15-03044S, Postdok BIOGLOBE (CZ. 1.07/2.3.00/30.0032) a Studentské grantové agentury Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Tato práce byla podpořena českou výzkumnou infrastrukturou pro systémovou biologii C4SYS (LM2015055).

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 28. 11. 2016

.....  
Bc. Jaroslav Ondruš

Na prvním místě chci poděkovat svému školiteli RNDr. Jánovi Štěrbovi, Ph.D. za možnost pracovat v jeho týmu a za vše, co jsem se v jeho laboratoři naučil. Děkuji za vedení práce a pomoc při řešení všech projektů. Dále bych chtěl vyjádřit díky kolektivu laboratoře a panu Erhartovi za pomoc při lovu a péči o klíš'ata.

Největší poděkování ale patří mým rodičům, kteří mě podporovali během studia na vysoké škole a tím pádem mi celé studium umožnili. Děkuji.

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Literární přehled .....	3
3.1	Klíšťatovití ( <i>Ixodida</i> ).....	3
3.1.1	Systematické zařazení.....	3
3.1.2	Charakteristika a výskyt .....	4
3.1.3	Rizika spojená s klíšťaty.....	6
3.1.4	Sání krve na hostiteli .....	7
3.1.5	Hemostáza hostitele.....	8
3.1.6	Potlačení obranných mechanismů hostitele.....	10
3.1.7	Trávicí trakt klíšťat, rezervoár mikroorganismů .....	11
3.2	<i>In vitro</i> feeding klíšťat .....	13
3.3	Glykosylace .....	14
3.3.1	Glykany obratlovců a bezobratlých .....	16
3.3.2	Kyselina sialová.....	18
3.3.3	Kyselina sialová v klíštěti a octomilce .....	22
3.4	Bioortogonální chemie a „Click“ reakce .....	23
4	Materiál a metody .....	26
4.1	Materiál.....	26
4.1.1	Biologický materiál .....	26
4.1.2	<i>In vitro</i> feeding .....	26
4.1.3	Roztoky pro přípravu vzorků na fluorescenční mikroskopii .....	27
4.1.4	Příprava kryořezů .....	27
4.1.5	Značení sérových glykoproteinů .....	28
4.1.6	Bioortogonální (Click) chemie .....	28

4.1.7 SDS-PAGE a blotování .....	28
4.2 Metody .....	31
4.2.1 Příprava značených sérových glykoproteinů .....	31
4.2.2 <i>In vitro</i> feeding .....	33
4.2.3 Příprava kryožezů pro konfokální (fluorescenční) mikroskopii .....	34
4.2.4 Příprava buněk IRE/CTVM19 kultivovaných se značenými séry pro FM .....	37
4.2.5 Fluorescenční a konfokální mikroskopování .....	37
4.2.6 SDS-PAGE, Western blot .....	38
4.2.7 Inkubace a vyvolávání membrán .....	41
5 Výsledky .....	42
5.1 Detekce metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí WB .....	42
5.2 Detekce metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí FM .....	46
5.3 Detekce značených sérových glykoproteinů v buňkách IRE/CTVM19 pomocí WB a FM .....	50
5.4 Vizualizace značených sérových glykoproteinů pomocí 2D SDS-PAGE .....	58
6 Diskuze .....	61
6.1 Sialované glykoproteiny pocházející z metabolismu klíštěte se účastní embryogeneze .....	61
6.2 Sérové glykoproteiny hostitele jsou buňkami IRE/CTVM 19 rozeznávány na základě jejich glykanové části .....	64
7 Závěr .....	67
8 Použité zkratky .....	68
9 Citovaná literatura .....	71
10 Přílohy .....	88

# 1 Úvod

Klíšťata jsou krev sající parazité rozšíření téměř po celém světě. Jsou to vektory (přenašeči) mnoha mikroorganismů, mezi kterými je i množství nebezpečných patogenů, schopných způsobit člověku zdravotní komplikace od lokálních zánětů, přes alergie, až po smrt. Jsou také celosvětově příčinou velkých hospodářských ztrát, které se ročně pohybují bezmála v miliardách dolarů.

Ve vztahu klíštěte, jeho hostitele, a klíšťaty přenášených mikroorganismů, hrají důležitou roli glykany, či jinak sacharidové „antény“ přítomné na proteinech. Glykany se skládají z různých monosacharidových podjednotek a vytvářejí složitě větvené řetězce. Jejich variabilita je tak veliká a má takový potenciál, že i mezi evolučně příbuznými druhy organismů můžeme pozorovat rozdílné glykosylační vzorce, které se navíc dále odlišují i mezi jednotlivými tkáněmi samostatných druhů. Glykany se vyskytují napříč evolučním řetězcem od jednoduchých bakterií až po složité organismy včetně zelených rostlin, klíšťat (členovců) a člověka. Významnou roli má v tomto systému kyselina sialová, která ačkoli je u savců hojně zastoupena, u bezobratlých byla zatím naopak detekována jen v malém množství případů.

Pro vývoj alternativních metod kontroly klíšťat je nutné porozumět nesmírně složitému a komplexnímu molekulárnímu systému vzájemného působení parazitů, jejich hostitelů a přenášených patogenů, stejně jako úlohám jednotlivých molekul, které mají v tomto systému úlohu.

Právě přispění do mozaiky poznání této problematiky má za cíl předložená magisterská práce. Zabývá se otázkou významu sialovaných glykoproteinů pro klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které byly vytvořeny klíštětem, ale i těch, které pocházejí z hostitele a do klíštěte se dostávají během sání hostitelské krve.

## 2 Cíle práce

- provést *in vitro* sání samic *Ixodes ricinus* s přidavkem bioortogonálně značeného ManNAz (*N*-Azidoacetyl-D-Mannosamin)
- detekovat značené sialované glykoproteiny ve vajíčkách a larvách *I. ricinus*
- naznačit sérové glykoproteiny v proteinové a glykanové části (na kyselině sialové)
- provést kultivaci buněk IRE/CTVM19 se značenými sérovými glykoproteiny
- detekovat značené sérové glykoproteiny v buňkách IRE/CTVM19



## 3 Literární přehled

### 3.1 Klíšťatovití (*Ixodida*)

#### 3.1.1 Systematické zařazení

Klíšťatovití (*Ixodida*) jsou členovci (*Arthropoda*) patřící do podmenu klepítkatci (*Chelicerata*), třídy pavoukovci (*Arachnida*), řádu roztoči (*Acari*).

V rámci členovců rozlišujeme několik podmenů. Krom klepítkatců (*Chelicerata*), jsou to stonožkovci (*Myriapoda*), šestinozí (*Hexapoda*), koryši (*Crustacea*), vyhynulí trilobité (*Trilobitomorpha*) a nohatky (*Pycnogonida*).

Současně žijící pavoukovce rozdělujeme do několika řádů. Vyjma roztočů jsou to pavouci (*Araneae*), bičovci (*Amplypigi*), bičnatci (*Thelyphonida*), krátkochvosti (*Schizomida*), roztočovci (*Ricinulei*), sekáči (*Opiliones*), solifugy (*Solifugae*), štírci (*Pseudoscorpiones*), štířenky (*Palpigradi*) a štíři (*Scorpiones*).

Klíšťatovití zahrnují tři rozdílné čeledě: *Ixodidae*, *Argasidae*, *Nuttalliellidae*. *Ixodidae*, nejpočetnější čeleď, také známá jako tvrdá klíšťata, se skládá ze třinácti rodů: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Cornupalpatum*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* a *Rhipicephalus* celkově zahrnujících 720 druhů. Druhou čeledí je skupina *Argasidae*, neboli měkká klíšťata či klíšťatovití, s pěti rody *Argas*, *Antricola*, *Carios*, *Ornithodoros* a *Otobius* zahrnujícími celkem 186 druhů. Třetí čeledí je *Nuttalliellidae*, s jediným rodem *Nuttalliella* a také s jediným dosud objeveným zástupcem *Nuttalliella namaqua*. Dosud bylo tedy popsáno více než 900 zástupců (přehledy druhů shrnuty v <sup>1)</sup> ovšem jejich přesná fylogeneze není stále s jistotou dokončena (<sup>1</sup>). Druhem nejhojněji zastoupeným v České republice je klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*) spadající do čeledě *Ixodidae*, rodu *Ixodes*.

### 3. 1. 2 Charakteristika a výskyt

Klíšťatovití (Ixodida) jsou ektoparazité s nepřímým vývojem vyskytující se po celém světě, Českou republiku nevyjímaje. Klíšťatovití žijí parazitickým způsobem života na svých hostitelích, jejichž krev je pro ně jedinou potravou. Ta je vyžadována pro přeměny životních stádií z larvy na nymfu, dospělce, i pro vykladení vajíček (<sup>2</sup>). Jedná se o hematofágní parazity plazů, ptáků a savců.

Ačkoliv existuje mnoho odchylek a zvláštností v anatomii a životních cyklech různých druhů klíšťat, budu se v této části držet informací relevantních pro nejrozšířenější klíště v České republice, klíštěte obecného (*I. ricinus*).

Tělo dospělce se skládá z „hlavové“ a tělové části. Hlavová část, neboli kapitulum, složená z hypostomu a chelicer, je nástrojem průniku do hostitele. Zvláštním útvarem přítomným na kapitulu jsou palpy, podpůrné útvary mající roli při hledání vhodného místa pro přisátí, ale neučastní se penetrace kůže. Na tělové části jsou patrné 4 páry nohou (nymfy a dospělci) a tvrdý štítek (skutum), který vykazuje výrazný pohlavní dimorfismus. U samic nedosahuje pokrytí celého těla, narozdíl od samce, kterého štítek pokrývá celého. Samice mají pod štítkem červeně zbarvené kožovité alloscutulum, díky kterému lze pohlaví *I. ricinus* na první pohled rozeznat. Na prvním páru nohou je přítomný Hallerův orgán, který obsahuje receptory umožňující nalezení potenciálního hostitele.

Pod pevným štítkem jsou uloženy orgány klíštěte, obklopené hemolymfou. Největší a nejnápadnější z nich je střevo. Začátek střeva se nachází za jícnem, kterým je spojeno s ústním ústrojím. Skládá se z centrálního žaludku, který navazuje na malé střevo, to pokračuje dále zadním střevem, jež ústí do rekta (<sup>3</sup>). Před tímto vyústěním se propojuje s Malpighickými trubicemi, které z těla vylučují odpadní látky.

Dalším, velice důležitým orgánem jsou slinné žlázy, které plní zásadní roli při nasávání klíštěte. Představují také místo, odkud jsou do hostitele přenášeny patogeny, pakliže jsou přítomny. Dále zde nalezneme množství trachejí, kterými je zprostředkováno dýchání, a v případě samice ovaria.

Přibližně ve středu na dorsální straně je přítomno srdce obklopené perikardiálním sinusem napojeného na aortu a dále arteriální cévy (<sup>3</sup>). Je součástí oběhového systému – hemolymfa se z těla dostává do sinu, kde dochází k její filtraci, odtud pokračuje ostií do srdce, které se

díky činnosti svalových vláken stlačuje a vypuzuje tak hemolymfu do aorty, odkud se malými artériemi čerpá do kapitula, nohou a tělní dutiny, tedy do celého těla (<sup>3</sup>).

*I. ricinus* má tři vývojová stádia, larvu, nymfu a dospělé. Larva je oproti dospělci (přibližně 4 mm) jen velmi malá, měří přibližně 650 µm. Oproti nymfám a dospělcům disponuje klíště v tomto stádiu pouze třemi páry nohou. Pro přeměnu do následujících stádií stejně jako vykladení vajíček je nutné nasátí na hostiteli. To trvá ve většině případů několik desítek hodin. Pomocí chelicer klíště penetruje kůži a způsobí krvácení. Díky nim je ale zároveň pevně přichyceno na hostiteli a zde za obousměrné výměny tekutin (možná transmise patogenů) setrvává do úplného nasátí, kdy spontánně hostitele opouští a nastává přeměna na další stádium, či v případě samice vykladení snůšky vajíček. Při této metamorfóze dochází v těle klíštěte k velkým morfologickým změnám (<sup>3</sup>). Typický je tříhostitelský cyklus, přičemž v případě dospělé samice znamená sání téměř konec jejího života. Ta během sání přijímá velké množství krve, a tak několikanásobně zvětšuje svoji velikost. Nasátá samice klade do půdy několik stovek vajec, ze kterých se po přibližně třech týdnech vylíhnou larvy. Vajíčka jsou chráněna mohutným chitinovým obalem chránícím choulostivé vyvíjející se embryo před poškozením a nepříznivým okolím.

V České republice jsou klíšťata ve svém výskytu geograficky limitována především nadmořskou výškou, neboť ve vyšších polohách dochází k poruchám životního cyklu – ten nemůže být dokončen díky tamnímu nepříznivému vlivu mikroklimatu. To zahrnuje nízkou teplotu či relativní vlhkost (<sup>4</sup>). V průběhu posledních let došlo ke změnám v této přirozené bariéře díky globálnímu oteplování, kdy postupné změny makroklimatu ovlivňují lokální mikroklimata. Ta poté poskytují vhodné podmínky pro klíšťata i ve vyšších nadmořských výškách, čímž se klíšťatům otevírají nové životní prostory. Nejvyšší nadmořská výška, kde se v ČR ještě v osmdesátých letech klíšťata nacházela, se pohybovala okolo 750 m.n.m (<sup>4</sup>), v roce 2001 tato hranice činila přibližně 1100 m.n.m (<sup>5</sup>) přičemž v následujících letech se dále posouvala a tak v roce 2007 dosáhla již 1350 m.n.m (<sup>6</sup>). Spolu s rozšiřujícím se výskytem klíšťat se tedy rozšiřují i oblasti kde nalezneme klíšťaty přenášené patogeny, které představují zvětšující se hrozbu.

### 3.1.3 Rizika spojená s klíšťaty

Klíšťata nepředstavují riziko pouze díky své schopnosti přenášet patogeny. Mohou způsobovat alergické reakce, decimují stáda jimi promořená a také přímo ovlivňují kvalitu produktů z těchto zvířat vyráběných. Po celém světě způsobují klíšťata nemalé hospodářské škody (<sup>7,8</sup>) na velkém procentu hospodářsky využívaných zvířat. Pouze v Brazílii jsou škody na dobytku způsobené místním klíštětem *Rhipicephalus microplus* odhadovány na několik miliard dolarů ročně (<sup>8</sup>). Ačkoliv jsou největší ekonomické škody způsobovány klíšťaty přenášenými viry, bakteriemi, houbami a prvoky (<sup>2,9</sup>), ani ostatní aspekty s klíšťaty spjatými nejsou zanedbatelné.

Při sání na hostiteli musí klíšťata obejít všechny jeho obranné mechanismy, což je uskutečněno sekrecí slin obsahující velkých množství bioaktivních molekul do rány (<sup>10</sup>). Spolu se slinami může dojít i k přenosu patogenních mikroorganismů, pro které představují klíšťata přirozeného vektora (<sup>11</sup>).

V České republice mezi hlavní přenášené choroby (nejrozšířenějším klíštětem *I. ricinus*) patří lymská borelióza (spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato), lidská granulomatózní anaplasmóza (rickettsie *Anaplasma phagocytophilum*) a klíšťová encefalitida (virus klíšťové encefalidity). Celosvětově ovšem patří klíšťatům do počtu druhů přenášených patogenů druhé místo po moskytech (<sup>12</sup>). Na předním místě mezi klíšťaty přenášenými chorobami je ve světě, stejně jako v České republice, lymská borelióza, která je například ve Spojených státech amerických dokonce na prvním místě (<sup>13</sup>). Spirochety jsou přenášeny převážně klíšťaty rodu *Ixodes*, a to *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. dammini*, *I. ricinus* a *I. persulcatus* (<sup>14</sup>). Dále můžeme jmenovat tularaémii (bakterie *Francisella tularensis*) přenášenou klíšťaty *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni* a *Amblyomma americanum* (<sup>15</sup>), nebo ehrlichiózu (rickettsie *Ehrlichie chaffeensis*, *E. ewingii*) přenášené *A. americanum* (<sup>16</sup>). Mezi skotem jsou ve Spojených státech amerických také velmi rozšířeny choroby babesióza a anaplasmóza (<sup>17</sup>).

Nepřítomnost zmíněných patogenů nemusí znamenat nezávadnost klíšťat, neboť látky jimi produkované mohou dráždit imunitní systém samy o sobě. Dobrým příkladem je v Evropě se vyskytující klíšťák holubí *Argas reflexus* (Ixodida, Argasidae), který se často nachází ve starých domech s podkrovím či na půdách, které jsou častým sídlem holubů, na něž je vázán. Napadení tímto klíšťákem způsobuje alergické reakce s různou závažností od

místních zánětů až po anafylaktické šoky (<sup>18, 19</sup>). Na základě studie, kdy byly analyzovány reakce na pokousání klíšťákem, která se uskutečnila na 148 dobrovolnících bylo zjištěno, že ačkoliv převažují pouze lokální reakce jako zánět nebo svědění, u nezanedbatelného procenta (8%) lidí se mohou objevit i závažnější symptomy, jako je ztráta vědomí, dušnost, otoky či kopřivka (<sup>20</sup>).

Kromě zmíněných faktorů je nutné také brát v potaz snižování kvality výrobků z chovaných zvířat, ke kterému dochází v důsledku prostého mechanické penetrace kůže a ztrátě krve v důsledku krvácení. Hlášeny jsou také případy paralýzy způsobené klíšťaty. Tu je schopno vyvolat mnoho druhů (<sup>21</sup>), z nichž můžeme jmenovat například klíště *I. holocyclus*, vyskytující se v Austrálii. Toto klíště parazituje na savcích jako jsou ovce, psi či kočky, ale i na lidech (<sup>22</sup>). Hostitelům může přivést díky svému toxinu paralýzu, která může vést až ke smrti, působí v neuromuskulárních spojích, kde inhibuje uvolňování acetylcholinu (<sup>23</sup>). Vyjma paralýzy patří ke klinickým projevům také slabost, rozmazané vidění a obtíže s formulováním slov (<sup>24</sup>).

### **3.1.4 Sání krve na hostiteli**

Pro život klíšťat je nezbytné sání krve. To probíhá různě dlouhou dobu, po kterou musejí být na hostiteli pevně přichycena. K tomu jsou klíšťata anatomicky uzpůsobena. Ačkoliv se jednotlivé druhy klíšťat v sací strategii mohou více či méně odlišovat, základní prvky jsou vždy podobné. Detekce hostitele a nalezení vhodného místa pro přisání je zprostředkováno smyslovými orgány obsahujícími chemo- a mechanoreceptory, které jsou přítomny na končetinách, v ústních částech a na Hallerově orgánu, nacházejícím se na prvním páru končetin (<sup>3</sup>). Ty jsou navíc zakončené zpětně zahnutými bodci usnadňujícími zachycení a pohyb na hostiteli.

Po nalezení vhodného místa pro sání pomocí zmiňovaných receptorů přichází na řadu ústní ústrojí. Část pronikající do kůže se skládá z hypostomu, ozubeného útvaru ve tvaru nože, a chelicer. Po stranách hypostomu s chelicerami se nachází palpy, zaoblené pomocné útvary, které přes kůži nepronikají. V úvodní části přisátí klíště roztáhne podél povrchu kůže palpy a za pomoci chelicer hypostom do ní proniká. Samotný trhavý pohyb chelicer potřebný pro proříznutí tkáně je zprostředkován změnami tlaku v hemolymfě způsobenými pulzujícím srdcem (<sup>25</sup>). Díky zpětnému ozubení hypostomu je klíště v kůži pevně zakotveno.

Uchycení může být navíc podpořeno takzvaným cementem, jenž je vylučován ze slinných žláz některými z klíšťat, ovšem nikoliv klíštětem obecným <sup>(26)</sup>.

Slinné žlázy hrají ve fyziologii klíšťat naprosto zásadní úlohu. Při nasávání musí klíště nejen překonat kožní bariéru, ale také čelit mnohastupňové obraně hostitele, zahrnující vasokonstrikci, krevní koagulaci, srážení krevních destiček, imunitní odpověď či prosté odstranění klíštěte zvířetem, které je na klíštěcí přítomnost upozorněno bolestí v místě sání.

Při samotném nasávání dochází k penetraci hostitelovy kůže a následně pozření velkého množství jeho krve, které může dosahovat stonásobků hmotnosti nenakrmeného klíštěte <sup>(3)</sup>. Míra fyzického „působení“ záleží také na druhu klíštěte (na jeho příslušnosti do čeledi Ixodidae/Argasidae). Tvrdá a měkká klíšťata se liší kromě (ne)přítomnosti tvrdého štítku i způsobem sání na hostiteli. Zatímco tvrdá klíšťata poškozují kůži jen minimálně a krmí se delší dobu, měkká klíšťata se krmí po kratší časový usek, ovšem působí hostiteli nepoměrně hlubší zranění <sup>(27,28)</sup>. Odlišným strategiím sání je uzpůsobena ústní anatomie <sup>(27)</sup>. Při průniku hypostomu kůží dochází k porušení tkáně, tedy narušení cév a následnému unikání krve z oběhové soustavy. Při tomto ději se aktivují obranné systémy hostitele a spouští se kaskáda reakcí směřující k hemostázi, zánětu a aktivaci složek imunitního systému <sup>(29)</sup>. Imunitní odpověď se také mění v závislosti na čase od počátku sání, kdy v ráně působí dynamicky rozdílné druhy bílých krvinek <sup>(30)</sup>.

### **3.1.5 Hemostáza hostitele**

Při normálním průběhu hemostáze dochází k vasokonstrikci, tedy stáhnutí svalové vrstvy v cévní stěně, a aktivaci krevních destiček, v neaktivovaném stavu kolujících v oběhové soustavě, které postupně ucpou cévy v místech poškození. Tím dojde k odvrácení bezprostředního nebezpečí vykrvácení což umožní další kroky vyzdravení a likvidace patogenů. Při zranění jsou odhaleny (sub)endoteliální buňky, se kterými přijdou destičky do kontaktu. Tím se aktivují, čímž postupně dochází ke změně jejich tvaru, tvorbě výběžků, sekreci látek obsažených v jejich granulách způsobující migraci dalších destiček do místa zranění až po tvorbu receptorů pro fibrinogen. Fibrinogen je 340 kDa velký rozpustný protein vyskytující se v plazmě. Fibrinogen se na tento receptor váže, tím dochází k vytvoření sítě ve které se zachycují destičky čímž postupně vzniká finální záplata (review <sup>31, 32</sup>).

Důležitou úlohu zastávají glykoproteinové receptory na membráně destiček. Prvotní a téměř okamžitá adheze destiček na poškozenou stěnu cévy je způsobená navázáním extracelulárního proteinu von Willebrandova faktoru<sup>(33)</sup>, syntetizovaného v (sub)endoteliálních buňkách, na receptor GP Ib-IX-V. Ten je na membránách destiček přítomný ve velkých množstvích. Vytváří se tak jakési přemostění mezi destičkou a endotelem. Tato interakce spouští kaskádu reakcí<sup>(34)</sup>, vedoucí ke změně  $Ca^{2+}$  iontové mobility<sup>(35)</sup>, která aktivuje  $Ca^{2+}$ -dependentní agregační membránový receptor pro fibrinogen, který je následným mediátorem agregace destiček<sup>(34)</sup>. V neaktivovaných destičkách je na cytoplasmatické doméně receptoru GP Ib-IX-V přichycen aktin – vázající protein, který ho váže na cytoskelet buňky<sup>(36)</sup>. Právě aktin a aktin-vázající protein tvoří z velké části cytoskelet destiček a jsou zodpovědné za potřebné rychlé změny tvaru<sup>(37,38)</sup>. Po změně  $Ca^{2+}$  gradientu je aktin-vázající protein  $Ca^{2+}$ -dependentní proteázou calpainem odštěpen, což má za následek rychlou přestavbu cytoskeletu, tedy změnu tvaru destiček<sup>(38)</sup>. Zároveň dochází k sekreci dalších podpůrných látek z poškozených buněk, např. ADP, či uvolnění kolagenových vláken z obnažených subendoteliálních tkání, které aktivují další destičky a tak se informace o poškození šíří z místa zranění do jeho bezprostředního okolí.

V této kaskádě se také uplatňuje tzv. tkáňový faktor (TF), uvolňující se z poraněné tkáně. V klidovém stavu je pod kontrolou tzv. „tissue factor pathway inhibitoru“ (TFPI). TF se v iniciační fázi váže na koagulační faktor VIIa. Po navázání tohoto faktoru na TF se vytváří komplex VIIa/TF, který aktivuje faktor X přeměnou na faktor Xa. Ten způsobuje tvorbu trombinu (faktor IIa) z jeho prekurzoru protrombinu (faktor II)<sup>(31)</sup>. Trombin je 39 kDa velká proteáza, která má zásadní úlohu v krevní koagulační kaskádě<sup>(32)</sup>. Pomocí trombinu jsou z fibrinogenu odštěpeny postupně dva malé peptidy - nejprve fibrinopeptid A a následně fibrinopeptid B, což je nezbytné pro „aktivaci“ fibrinu, neboli jeho polymerizaci, a následné vytvoření fibrinových vláken<sup>(39,40)</sup> zodpovědných za uzavření rány.

V této hemokoagulační kaskádě je tedy obsaženo mnoho enzymů, molekul, které jsou terčem bioaktivních látek obsažených ve slinách klíšťat, které s těmito obrannými mechanismy musí bojovat.

### 3.1.6 Potlačení obranných mechanismů hostitele

Pro sání krve hostitele je nezbytné zabránit aktivaci obranných mechanismů hostitele (<sup>41</sup>). Za tímto účelem si klíšťata vyvinula biologicky aktivní látky, které aktivně sekretují do místa sání – jedná se o látky působící proti hemostáze (<sup>29</sup>, <sup>42</sup>), proti imunitnímu systému (<sup>29</sup>) a potlačující bolest (<sup>43</sup>). Při inhibici obranných molekul hostitele je pro klíšťata nejvýhodnější interferovat v iniciačních fázích obrany, ovšem tyto krev sající parazité disponují molekulami pro ovlivnění obranných mechanismů na všech úrovních.

Za část těchto vlastností je zodpovědná skupina látek patřících mezi prostaglandiny (<sup>44</sup>), které působí proti několika úrovním obranným systémům hostitele – proti vasokonstrikci, degranulaci žírných buněk a shlukování krevních destiček (<sup>42</sup>, <sup>45</sup>).

Jedna z prvních protireakcí klíšťate nastává právě na úrovni potlačení vasokonstrikce. Například ve slinách *I. dammini* byl objeven prostaglandin 6-keto-PGF1 $\alpha$ , který po sekreci do hostitele způsobuje vasodilataci a navíc zabraňuje degranulaci bílých krvinek (<sup>46</sup>). Vyjma vasodilatace a degranulace leukocytů je nezbytné také předejít aktivaci a shlukování co možná největšího množství krevních destiček, které nastává bezprostředně po poranění stěn cév působením několika molekul jako je ADP, trombin a kolagen. Jedním způsobem je defosforylace ADP na AMP, čímž se zabrání ADP-dependentní aktivaci destiček (<sup>47</sup>). Jako další příklad můžeme jmenovat protein Disagregin (6 kDa) izolovaný z *O. moubata*, který se váže na receptor pro fibrinogen přítomný na povrchu krevních destiček a tímto zabraňuje jejich agregaci (<sup>48</sup>).

Rozrůstající se skupinu známých bioaktivních látek uplatňujících se ještě před vytvořením velkých koncentrací trombinu rozšířily některé proteiny izolované z *I. scapularis*. Ve slinných žlázách zde byl izolován homolog savčího TFPI, 35 kDa velký protein pojmenovaný Penthalaris, který má afinitu k faktorům X i Xa (<sup>49</sup>), podobně jako protein Ixolaris, izolovaný také ze slinných žláz, vázající se také k faktoru X i Xa, a tedy inhibující komplex TF/fVIIa (<sup>50</sup>). Inhibice faktoru Xa jsou schopné i další inhibitory proteáz identifikované v *I. scapularis*, a to například identifikovaný 9,8 kDa velký homolog proteinu Salp14, jeden z imunogenních antigenů klíšťecích slin a také 9,3 kDa homolog Salp9Pac (<sup>51</sup>). Inhibicí faktoru Xa tyto látky tedy ve výsledku zabraňují trombogenezi.



Další úroveň potlačování obrany hostitele je inhibice trombinu. Ten má dvě vazebná místa, díky kterým je zprostředkováno odštěpování peptidů z fibrinogenu, aktivní místo a sekundární vazebné místo. Navázat se na tyto místa je schopných mnoho inhibitorů. Patří mezi ně například Ornithodorin (12 kDa) izolovaný z *O. moubata*, schopný vázat se jak na aktivní, tak i na sekundární vazebné místo. Ornithodorinu je podobný (63% na aminokyselinové úrovni) další inhibitor trombinu pojmenovaný Savignin, jež byl izolovaný z *O. savignyi* <sup>(52)</sup>. Dalšími inhibitory jsou například Americanin, protein izolovaný ze slinných žláz *A. americanum* <sup>(53)</sup>, či velice malý protein Variegin izolovaný z *A. variegatum* <sup>(54)</sup>. Inhibitory trombinu jsou známy i mimo Ixodida u ostatních krev sajících parazitů, a to například hirudin izolovaný z pijavice *Hirudo medicinalis* (6.5 kDa), jeho část hirulog (3 kDa) nebo huridinové peptidy <sup>(55)</sup>. Dále například rhodniin (11 kDa) ze slin zákeřnice (ploštice) *Rhodnius prolixus* <sup>(56)</sup>.

Dalším efektem molekul obsažených v klíštěcích slinách je potlačování bolesti, které je způsobeno přítomností kinináz, jež hydrolyzují hostitelův bradykinin <sup>(43)</sup>. Bradykinin je látka zodpovědná kromě jiného za způsobení lokální bolesti a svědění, tedy upozornění hostitele na sání krve klíštětem. Vyjma toho bradykinin podporuje obranu hostitele navozením vasodilatace a zvýšením permeability cév, což usnadňuje migraci bílých krvinek do poškozeného místa. Dále je v klíštěcích slinách přítomný například anti-komplementový protein <sup>(57)</sup> a histamin-vázající proteiny, které v místě penetrace hypostomem cíleně vyvazují histamin <sup>(58)</sup>. Ten je vylučován po degranulaci žírných buněk a bazofilů v reakci na poranění tkáně, kdy po vyplavení způsobuje zánět, tedy větší permeabilitu kapilár, což podobně jako bradykinin usnadňuje pronikání buněk imunitního systému do poškozeného místa <sup>(59)</sup>.

### **3.1.7 Trávící trakt klíšťat, rezervoár mikroorganismů**

Při sání klíšťat dochází k pozření velkého množství krve, která se dostává z ústního ústrojí přes jícn do centrálního žaludku spojeného se střevem. Stěna střeva je vyztužená bazální laminou, na které je přichycena epiteliální vrstva, ve které se nachází sekreční a trávící buňky. Zvětšení efektivní plochy střeva je zajištěno podobně jako u střev obratlovců množstvím výběžků. Obdobně je střevo klíštěte také nikou mikroorganismů, kterýchse zde nachází značné množství a tvoří tak jakousi mikroflóru, která má pro fyziologii klíštěte

nemalý význam - ačkoliv je o klíšťatech všeobecně známo pouze to, že přenáší mnoho nebezpečných mikroorganismů, jako jsou borrelie, ehrlichie či rickettsie, druhová rozmanitost mikroflóry je ve skutečnosti daleko širší. Nachází se zde množství komenzálních a mutualistických druhů (<sup>60</sup>, <sup>61</sup>).

Z klíšťat rodu *I. scapularis* bylo tyto mikroorganismů izolovány kultivací. Zatímco v dospělých jednoznačně převažovaly grampozitivní bakterie (83%) nejčastěji rod *Bacillus*, byl zde ale také dále identifikován rod *Corynebacterium*, u nymf byly grampozitivní bakterie zastoupeny v menším poměru (71%), identifikován byl například rod *Stenotrophomonas* (<sup>62</sup>).

Z velkého množství mikroorganismů opakovaně identifikovaných v klíšťeti *R. microplus* pomocí pyrosekvenování můžeme jmenovat například rody *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* či *Staphylococcus* (<sup>63</sup>, <sup>64</sup>, <sup>65</sup>). Stejně jako v případě klíšťete *I. scapularis* se zde liší druhové složení v jednotlivých vývojových stádiích (<sup>63</sup>). Tyto rozdíly mohou naznačovat vliv některých mikroorganismů na životaschopnost klíšťat. Kromě možného vlivu na život klíšťete se pravděpodobně mohou mikroorganismy ovlivňovat i navzájem mezi sebou (přímo i nepřímo), kdy tedy mikroorganismy přítomné v klíšťeti mohou jistým způsobem ovlivňovat druhy, které jsou původci onemocnění skotu či lidských chorob (<sup>66</sup>, <sup>67</sup>), podobně jak bylo prokázáno v případě moskytů či mouchy tsetse (<sup>68</sup>, <sup>69</sup>).

Příkladem je kolonizace klíšťete *I. scapularis* spirochétami *B. burgdorferi*. Zde, v případě narušení klíšťecí mikroflóry, dochází k redukci kolonizace střeva boréliemi (<sup>70</sup>). K tomuto ovlivnění pravděpodobně dochází díky schopnosti střevní mikroflóry ovlivňovat expresi klíšťecí varianty drozofilního transkripčního faktoru JAK/STAT (<sup>71</sup>, <sup>72</sup>). Tento transkripční faktor reguluje expresi několika genů imunitní odpovědi a genů ovlivňujících strukturu a opravy epitelu střeva (<sup>73</sup>, <sup>74</sup>) skrze glykoprotein peritrophin, který je součástí glykoproteinové vrstvy, která tento epitel chrání (<sup>75</sup>). Díky silnější glykoproteinové vrstvě mají potom borélie ztížené podmínky pro průchod stěnou střeva a mají tím pádem sníženou šanci dostat se do slinných žláz, odkud mohou infikovat savčího hostitele.

### 3.2 *In vitro* feeding klíšťat

Pro výzkum klíšťat a parazitů jimi přenášených, je nutné zajištění vhodných hostitelů. Využívání zvířat pro studium je spjato s řadou překážek. Při krmení *in vivo* na savcích je často nezbytné chovat zvířata, ať už se jedná o skot, psy či malé hlodavce, v kontrolovaných podmínkách, většinou malých prostorách, ve kterých tato zvířata trpí a jsou zatěžována stresem. Vyjma morálních aspektů je nutné také přihlídnout k finanční stránce, kdy zajištění zvířat představuje zejména v případě skotu nemalou zátěž. Proto byla velká snaha vyvinout technologie, které by umožnily vyhnout se zbytečnému trápení zvířat. Alternativou ke krmení klíšťat na laboratorních zvířatech, tedy *in vivo*, je krmení v laboratorních podmínkách *in vitro*, ustáleně „*in vitro* feeding“.

*In vitro* feeding musí dostatečně dobře imitovat všechny aspekty sání na živém tvorů. Musí být tedy zajištěna krev v tekutém stavu, teplota odpovídající povrchu těla a vhodná náhrada kůže. Na systém krmení jsou ovšem kladeny i další požadavky – celá aparatura musí být dostatečně chráněna před kontaminací z vnějšího prostředí, jelikož krev představuje kromě klíšťecí potravy také výborný živný roztok pro všudypřítomné houby a bakterie. Umělá kůže musí také být elastická – při dokončení sání a uvolnění klíšťete z kůže vzniká otvor, kterým by v případě jeho kompletního neuzavření vnikla do krmítka krev, což by vedlo k utopení klíšťat. Tento faktor je zvláště důležitý v případech, kdy se v jednom krmítku vyskytuje více klíšťat.

Vývoj technik *in vitro* feedingu se datuje mnoho let do minulosti, první pokusy s tímto způsobem krmení klíšťat proběhly již v roce 1956 <sup>(76)</sup>. Technika byla postupem času zdokonalována, a tak se postupně zvyšovalo procento klíšťat, které byly v laboratorních podmínkách úspěšně dokrmeny.

Experimenty byly v minulosti prováděny například na řezech kůže, na kterých byly relativně úspěšně krmeny larvy (více než 50% larev dokrmeno a jejich nadpoloviční většina se přeměnila na nymfy) klíšťete *R. microplus* <sup>(77)</sup>. Membrána byla použita poprvé v roce 1979 právě při krmení *R. microplus* <sup>(78)</sup>. Vynikajících výsledků bylo dosaženo při krmení měkkých klíšťat (*O. coriaceus*) při kterém bylo úspěšně vykrmeno až 90% klíšťat, a to pomocí krmítek s médiem z červených krvinek a telecího séra s parafilmovou membránou pokrytou vrstvou chlupů morčete <sup>(79)</sup>. Protokol byl dále optimalizován pro využití klíšťaty *I. ricinus* <sup>(80)</sup>. *In vitro* feeding se dnes využívá pro mnoho účelů (např. <sup>10</sup>),

neboť rychlá příprava krmicích soustav a následná snadná manipulace s nimi dovolují krmení klíšťat v běžných laboratorních podmínkách. Výhodou je také možnost jednoduchého monitorování průběhu sání a přesná kontrola složení živného roztoku, tedy krve. Pro naše účely bylo postupováno dle publikací z roku 2007 s několika odchylkami<sup>(80, 81, 82)</sup>.

### 3.3 Glykosylace

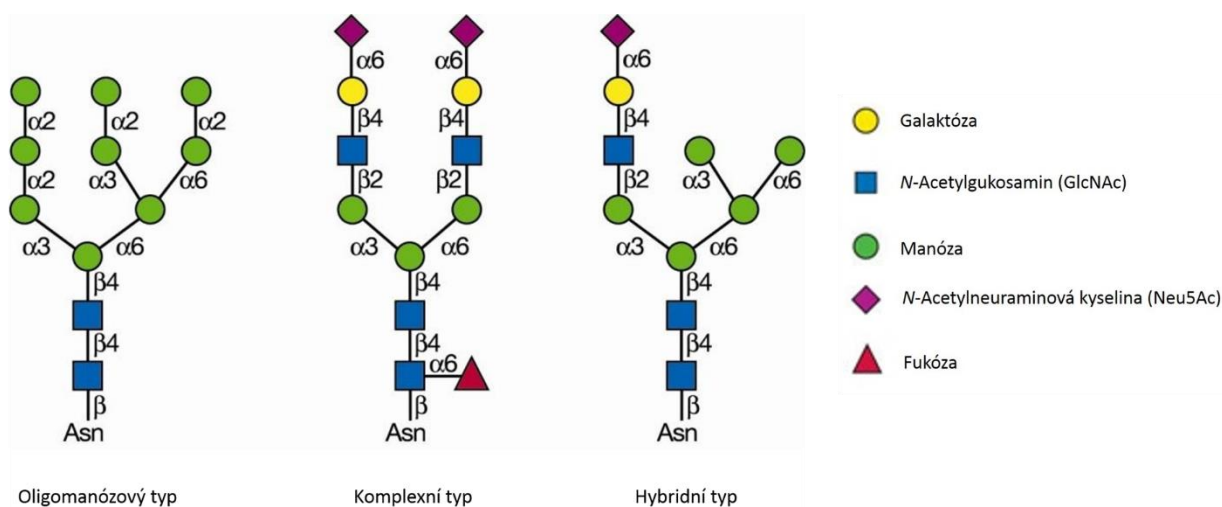
Glykosylace je proces přidávání glykanů, neboli oligosacharidových řetězců, na proteinovou kostru glykoproteinu, či lipidový základ glykolipidu. Produkty glykosylace jsou obecně známy jako glykokonjugáty. Jedná se o jednu z postranslačních modifikací (ačkoliv proces probíhá v případě *N*-glykanů i během translace). Glykany neposkytují pouze jednu specifickou funkci, ale naopak záběr vlastností jimi propůjčovaný je veliký, a modifikovány jsou proteiny zastávající nejrůznější funkce od stavebních komponent, přes hormony po fluoreskující proteiny, glykany se účastní sestavování proteinů, rozeznávání buněk, adheze buněk, hydratace tkání a zadržování vody či imunitních reakcí<sup>(83, 84)</sup>.

Glykany rozdělujeme do několika tříd, ze kterých jsou současně nejlépe prozkoumané *N*-vázané glykany (*N*-glykany). Právě *N*-glykany jsou pro tuto práci relevantní. Významnou skupinou jsou vedle *N*-glykanů *O*-vázané glykany (*O*-glykany). Ty ovšem, jelikož postrádají společné jádro, nemají specifická *O*-glykosylační místa (jako je asparagin sequonu v případě *N*-glykanů), představují komplikovanější objekt studia. Z toho důvodu, informací o jejich roli v bezobratlých a v interakcích parazit-hostitel je stále známo relativně málo.

Glykany jsou složeny z jednotlivých monosacharidů, nejčastěji hexóz. Ty jsou zde přítomné v pyranózové (spojení hydroxylové skupiny na pátém uhlíku s aldehydickou skupinou na prvním) D- konformaci. V glykokonjugátech se vyskytují často glukóza, galaktóza a mannóza a dále hexózy vzniklé z těchto nahrazením hydroxylové skupiny na druhém uhlíku acetylovanou aminoskupinou jako jsou *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) a *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc), dále fukóza (deoxy-hexóza v L- konformaci) i tzv. kyselina sialová. Pod pojmem sialová kyselina je zařazená celá skupina devitíuhlíkatých cukrů, nejčastější z nich je ovšem *N*-acetylneuraminová kyselina<sup>(83)</sup>.

Glykany se na rozdíl od proteinů nesestavují podle templátu, ale jsou přidávány na specifická místa na proteinové kostře. V případě *N*-glykanů jsou tato místa přesně určena a nazývají se sequony. Sequon se skládá z asparaginu, X, serinu/threoninu; na druhé pozici (X) může být jakákoliv aminokyselina, nemůže se zde však vyskytovat prolin<sup>(85)</sup>. *N*-glykany se připojují na první aminokyselinu z tripletu – na asparagin a to skrze tzv. proximální monosacharidickou jednotku GlcNAc<sup>(83)</sup>.

Všechny *N*-glykany mají stejné jádro. To se skládá ze dvou GlcNAc a třech manóz, jež je dále rozšiřováno monosacharidy. Rozeznáváme tři typy *N*-glykanů lišící se strukturou – komplexní, hybridní a vysoce mannózový typ (viz Obr. 1).



Obrázek 1: Příklady zástupců tříd *N*-glykanů: oligomanózový (vysoce mannózový), hybridní a komplexní typ. Převzato a upraveno z Essentials of Glycobiology<sup>(84)</sup>.

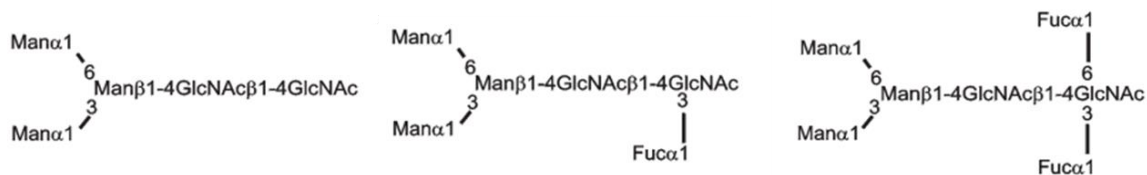
Sestavení *N*-glykanu probíhá v endoplasmatickém retikulu – nejdříve je sestaven prekurzor a ten je jako celek připojen na asparagin sequonu, kde je připojení dále měněn. *N*-glykanové jádro je sestaveno na cytoplasmatické straně membrány ER – navázání dvou GlcNAc a pěti manóz. Toto jádro je následně přeneseno skrze membránu do lumen ER, kde je dále zpracováváno až na finální podobu, tedy dvou GlcNAc, devíti manóz a třech glukóz. Tento prekurzor je potom pomocí enzymu oligosacharyltransferázy připevněn na proteinovou kostru, kde může být upravován velkou škálou enzymů. Enzymy upravující glykany můžeme dělit na glykosidázy a glykosyltransferázy. Do nich patří velká rodina enzymů zahrnující mannosidázy, GlcNAc-transferázy, galaktosyltransferázy, fukosyltransferázy, sialidázy či sialyltransferázy<sup>(83)</sup>.

### 3.3.1 Glykany obratlovců a bezobratlých

Ačkoliv jsou glykany bezobratlých stále z velké části neprozkoumané, můžeme vycházet především ze studií glykanů základních modelových organismů, tedy hád'átka *Caenorhabditis elegans* a mušky octomilky *Drosophila melanogaster*. Jsou to mnohobuněčné organismy s relativně krátkým životním cyklem a velkým počtem potomstva, což z nich dělá vynikající modely pro studium glykanů nejen díky jejich osekvenovanému genomu. Obecně jsou u bezobratlých zastoupeny ve velké míře vysoce mannózové typy glykanů<sup>(86, 87, 88)</sup>, ale vyskytují se zde v menším množství i komplexní a hybridní typy. Komplexní a hybridní glykany zaujímají 12% glykanového profilu octomilky<sup>(89)</sup>. Glykanový profil bezobratlých se stejně jako v případě obratlovců dynamicky mění v závislosti na stupni vývoje, jak bylo prokázáno například na modelu hád'átka<sup>(90)</sup>.

Obecně tedy platí, že ačkoliv glykany v obratlovcích a bezobratlých obsahují stejné monosacharidy, existují zde charakteristiky, podle kterých můžeme tyto dvě rozdílné skupiny odlišit. Dle současného zobecněného poznání glykany bezobratlých obsahují velké množství vysoce mannózových glykanů, a jen málo glykanů hybridního a komplexního typu, které jsou naopak charakteristické pro glykany obratlovců. Ty jsou navíc velmi často sialovány (review<sup>91</sup>). Na vyšší úrovni kromě těchto trendů můžeme ve složení glykanů pozorovat obrovskou variabilitu napříč celým stromem života. Dva příbuzné druhy nemusí nutně vykazovat shody v glykosylačních vzorcích a *vice versa*, podobné struktury můžeme pozorovat i u velice vzdálených skupin organismů oddělených před desítkami milionů let jako jsou jednobuněční parazité a savci. Tato skutečnost je pravděpodobně zapříčiněna působením vnějšího evolučního tlaku způsobeného viry a mikrobiálními parazity<sup>(91, 92)</sup>.

Přítomnost prekurzoru *N*-glykanů v octomilce byla prokázána již před relativně dlouhou dobou<sup>(93)</sup>, nicméně postupem času byla data zpřesňována a tak bylo identifikováno více a více enzymů z *N*-glykosylační dráhy. Jedná se například o homology podjednotek savčí Dol-P-Man syntetázy, mannosyl-<sup>(94)</sup> a glukosyltransferáz<sup>(95)</sup> a oligosacharyltransferáz<sup>(96)</sup>. V mouše *D. melanogaster* byly detekovány také glykany obsahující fukózu: core- $\alpha$ 1,6-fukosylované<sup>(93)</sup>, core- $\alpha$ 1,3-fukosylované<sup>(97)</sup>, difukosylované<sup>(98)</sup> i nefukosylované glykany<sup>(93)</sup> – příklady těchto fukosylovaných *N*-glykanů zobrazuje Obr. 2. Byly zde také nalezeny i dva sialované *N*-glykany<sup>(99)</sup>.



Obrázek 2: Příklady nefukosylovaného, core-1,3-fukosylovaného a difukosylovaného *N*-glykanu přítomných v mouše octomilce. Převzato a upraveno z Fabini a kol. 2001 (<sup>97</sup>).

Podobně jako v případě drozofily byly i u *C. elegans* detekovány fukosylované struktury, přičemž také z velké většiny převažují vysoce mannózové glykany - tyto oligomanózové glykany jsou stejné jako glykany nalezené v obratlovcích (<sup>100</sup>). Komplexní a hybridní glykany zde pravděpodobně přítomny nejsou, nebo jsou jen velice málo zastoupeny. Také se zde vyskytují (core-)fukosylované struktury na proximálním GlcNAc (<sup>88</sup>, <sup>101</sup>).

Co se klíšťat a jejich glykomů týče, je situace zmapovaná pouze málo. Prvotním předpokladem je podobnost ke glykomům zmiňovaných organismů octomilky a háďátka. To bylo několikrát nezávisle potvrzeno. Vysoce manózový typ *N*-glykanů, tolik rozšířený u členovců, byl detekován v klíšťatech *O. moubata* (<sup>102</sup>), *D. marginatus*, kde byl také přítomen komplexní typ (<sup>103</sup>), a *I. scapularis*, kde byly taktéž detekovány komplexní glykany bez i s core-fukózou (<sup>104</sup>).

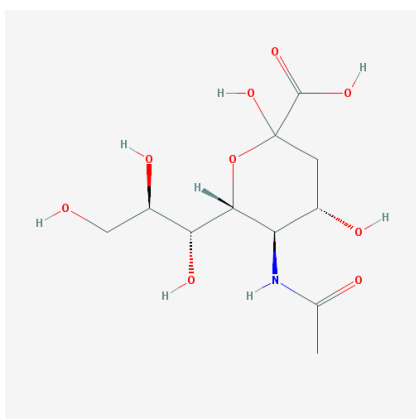
Fukóza je ovšem samostatnou kapitolou. Jedná se o deoxy-hexózu vyjímečnou svojí L-konformací (6-deoxy-L-galaktóza). Fukosylované glykany nalezneme běžně jak u bezobratlých (<sup>105</sup>), tak u obratlovců (<sup>106</sup>). Zde ovšem mohou některé fukosylované glykany pocházející z bezobratlých způsobovat alergické reakce. Fukosylace glykanů je zprostředkována pomocí fukosyltransferáz, které mohou fukózu navázat ve čtyřech různých vazbách:  $\alpha$ 1,2,  $\alpha$ 1,3,  $\alpha$ 1,4 a  $\alpha$ 1,6, přičemž každý typ vazby je zprostředkován pomocí samostatné rodiny enzymů. Fukóza může v některých případech být silně imunogenní, příkladem budiž krevní systém AB0. V savčím systému existuje transferáza H, která je  $\alpha$ 1,2-fukosyltransferázou exprimovanou v prekurzorech červených krvinek, jež syntetizuje antigen H a to připojením  $\alpha$ 1,2-fukózy na terminální galaktózu oligosacharidů několika krvinkových glykanů. U jedinců s A nebo B krevní skupinou je tento antigen nasyntetizován a dále zpracován jinými glykosyltransferázami, ovšem u 0 chybí (<sup>106</sup>). Proti těmto antigenům je pak v nekompatibilním jedinci vedena prudká, život ohrožující imunitní reakce. Právě to je důvodem důkladných vyšetření před dárcovstvím krve. U savců jsou

nicméně fukosylované glykany vyjma krvinek skupin důležité při ontogenezi (<sup>107</sup>), dále jsou součástí glykoproteinů zodpovědných za interakce mezi hostiteli a jejich patogeny či za adhezi bílých krvinek na endotel (pomocí selektinů <sup>106</sup>). Alergické reakce mohou být ovšem vedeny i proti fukosylovaným strukturám pocházejících z bezobratlých. Příkladem může být včelí jed, kde core  $\alpha$ 1,3-fukóza je imunitním systémem savců rozpoznána jako cizí a je proti ní vedena alergická reakce (<sup>108</sup>). Hlavní složkou toho jedu je 15,7 kDa velký protein fosfolipáza A<sub>2</sub> (<sup>109,110</sup>), která obsahuje jedno glykosylační místo s *N*-glykanem, ve kterém je navázána fukóza na proximální GlcNAc v  $\alpha$ 1,3- vazbě pro obratlovce imunogenní (<sup>111</sup>).

Dalším monosacharidem, jež se liší ve výskytu mezi bezobratlými a obratlovci je kyselina sialová.

### 3.3.2 Kyselina sialová

Kyselina sialová (Sia) je jednotné označení skupiny negativně nabitých monosacharidů hexóz vyznačujících se devítiuhlíkatou kóstrou. Nejčastější formou kyseliny sialové je *N*-acetylneuraminová kyselina znázorněná na Obr. 3. Již dlouho je známo, že velice často a ve vysokých koncentracích se sialované glykoproteiny vyskytují ve tkáních obratlovců, kde jsou přítomny na povrchu mnoha typů buněk, ovšem v poslední době se ukazuje, že existují ve specifických případech také u členovců a bakterií (<sup>112</sup>).



Obrázek 3: Nejčastější forma kyseliny sialové: *N*-Acetylneuraminová kyselina. Převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439197#section=Top>.

Biosyntéza kyseliny sialové probíhá za účasti několika enzymů. Nejprve je zpracován prekurzor uridin-difosfát-*N*-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) na donorový monosacharid



cytidin-monofosfát-*N*-acetylneuraminovou kyselinu (CMP-Neu5Ac) <sup>(112)</sup>, který je napojen na cílový glykan pomocí sialyltransferázy.

Všechny sialyltransferázy obsahují čtyři konzervované domény, tzv. sialylmotivy L, S, III, VS <sup>(113, 114, 115)</sup>. Sialyltransferázy lze rozdělit do několika rodin, které zprostředkovávají samostatné druhy vazeb:  $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6-,  $\alpha$ 2,8-. Specifickým případem je vazba v poloze  $\alpha$ 2,8-, která umožňuje tvorbu polysialovaných řetězců <sup>(116)</sup>. Díky množství hydroxylových skupin také kyselina sialová poskytuje glykoproteinům negativní náboj.

Rolí kyseliny sialové u obratlovců je mnoho: buněčná signalizace, adheze buněk, ovlivňuje alternativní dráhu komplementu <sup>(117, 118)</sup> a jiné části imunitního systému <sup>(119)</sup>, neurogenezi <sup>(116)</sup>, či chrání organismus před invazí patogenů <sup>(91, 92)</sup>. Nejčastějším místem výskytu kyseliny sialové (u obratlovců) je tedy vnější membrána buněk <sup>(120)</sup>, ovšem Sia je přítomna také například v krevním séru, kde nalezneme velké množství sialovaných glykoproteinů <sup>(121)</sup>. Typickým zástupcem sialovaných sérových glykoproteinů je fetuin <sup>(122)</sup>.

Kvůli velkému množství kyseliny sialové na povrchu savčích buněk <sup>(120)</sup> a z toho vyplývajícího faktu, že při kontaktu bakterie-savec je často první struktura, v jejíž přítomnosti se bakterie ocitá, právě kyselina sialová, si evolucí tyto organismy vyvinuly cesty, jak ji využít ve svůj prospěch. Jednou z nich je zneužít kyselinu sialovou jako jakési mimikry pro skrytí a únik před hostitelovým imunitním systémem <sup>(123)</sup>, druhou je rozložit Sia a použít metabolity jako zdroj energie, či uhlíku. Za tímto účelem exprimují bakterie mnoho sialyltransferáz a sialidáz <sup>(124, 125)</sup>, které jim umožňují s kyselinou sialovou pracovat. Pozoruhodná je také schopnost některých virů využít kyselinu sialovou jako receptor a tedy jako vstupní bránu do hostitelských buněk <sup>(126)</sup>.

Pro skrytí před složkami imunitního systému lze použít taktiku vlastní syntézy kyseliny sialové, nebo její odštěpení z buněk hostitele a následné inkorporace do vlastních glykokonjugátů.

První z nich je tedy biosyntéza kyseliny sialové. Ta může probíhat tzv. *de novo*, tedy ze základních jednoduchých metabolitů, prekursoru UDP-GlcNAc přes ManNAc (*N*-acetylmannosamin) po donor CMP-Neu5Ac (cytidine-5-monofosfo-*N*-acetylneuraminová kyselina) napojeným příslušnou sialyltransferázou na akceptor, čehož jsou schopné například *Campylobacter jejuni*, *Neisseria meningitidis*, či *Escherichia coli* kmenu K1 <sup>(127)</sup>, nebo pouze částečné sialylační dráhy za využití meziproductů hostitele <sup>(128)</sup>.

V bakterii *N. meningitidis* je primární funkcí polysialované kapsule zamezení navázání komplementu (<sup>129</sup>), podobně v případě *E. coli*, přítomnost polysialovaných řetězců zásadním způsobem ovlivňuje rychlost odstranění bakterií hostitelem (<sup>130</sup>).

Druhým způsobem je získání kyseliny sialové přímo z buněk hostitele. Za tímto účelem některé bakterie používají sialidázu, kterou odštěpují kyselinu sialovou z hostitelských glykokonjugátů (<sup>131</sup>). Do této skupiny spadají například *Haemophilus influenza* (<sup>132</sup>), *Pasteurella multocida* (<sup>133</sup>), *Corynebacterium diphtheriae* (<sup>134</sup>) či *Trypanosoma brucei* (<sup>135</sup>).

Příkladem takového využití kyseliny sialové pro vlastní kamufláž za hostitelské buňky je *H. influenza*. Jedná se o bakterii, která je častým původcem zánětu středního ucha. Tato gramnegativní bakterie má několik kmenů, které navíc mohou a nemusí být enkapsulované. Kapsule, pakliže je přítomna, chrání bakterii před nežádoucími procesy, jakými jsou fagocytóza či likvidace komplementem. Kmeny postrádající kapsuli jsou obecně méně invazivní, nicméně v případě, že do svých lipopolysacharidů inkorporují hostitelovu kyselinu sialovou, stávají se odolnější vůči hostitelově imunitnímu systému, čímž rapidně zvyšují svoji virulenci. Při mutaci genu sialyltransferázy a tedy narušení schopnosti dokončení sialylace vlastních glykokonjugátů dochází k velice rychlé likvidaci těchto patogenů (<sup>136</sup>), které tedy dále nepředstavují pro hostitele riziko. Sialylace je zde tedy pravděpodobně jedním z hlavních faktorů virulence.

Druhým příkladem zásadního vlivu kyseliny sialové získané patogenem z hostitele na přežívání patogenního organismu může být *T. brucei*. Jedná se o trypanosomu, původce spavé nemoci, přenášenou vektorem mouchou tsetse v subsaharské Africe. Zde je jako u mnoha ostatních vztahů mezi vektory a jejich patogeny názorně vidět evoluční soutěžení, kdy si mouchy tsetse na obranu před infekcí trypanozami vyvinuly trypanocidní prostředí (<sup>137</sup>), nicméně i přes to našly tato protozoa efektivní způsob pro obejití obranných mechanismů vektora (<sup>138</sup>). Trypanosoma se po infekci vektora dostává do střeva, kde dokáže přežít nepřátelské prostředí a z krevní oběhové formy diferencuje na procyklickou formu (<sup>137</sup>), která po krátké době ve střevě mouchy ztrácí schopnost přežití v savci. Dále se translokují do slinných žláz, odkud se pouze v omezeném procentu nakažených much a až po několika týdnech od nakažení může dostat až do finálního savčího hostitele, kde může vyvolat infekci (<sup>139</sup>). Procyklická forma obsahuje velké množství GPI (glykosylfosfatidylinositol) vázaných proteinů procyklinů (<sup>140</sup>, <sup>135</sup>). Trypanosoma v tomto

stádiu exprimuje trans-sialidázu. Ta je ukotvena na GPI a má schopnost specificky přenést kyselinu sialovou v  $\alpha 2,3$ - vazbě z terminální galaktózy hostitelových donorových glykokonjugátů na terminální galaktózu akceptorového glykokonjugátu vedlejšího řetězce GPI na povrchu buněk trypanosomy (<sup>141</sup>, <sup>142</sup>, <sup>143</sup>). Jako donor mohou sloužit krevní proteiny savce přítomné v trávicím traktu tsetse či buňky střeva. Trypanosoma si tímto způsobem vytváří sialovaný glykokalyx sloužící jako obrana před trypanocidním prostředím v trávicím traktu svého intermediálního hostitele, tsetse, který tak má zásadní zodpovědnost za šíření této nebezpečné choroby, zodpovědné za úmrtí desítek tisíc lidí.

Je také pravděpodobné, že kyselina sialová je zahrnutá i v kompetici mezi některými druhy bakterií sdílejícími stejnou niku v hostiteli. Například některé v lidském horním dýchacím traktu vyskytující se bakterie aktivně snižují fitness jiných druhů, aby samy zvětšily svůj životní prostor. Pneumokokus *Streptococcus pneumoniae*, jež je v dýchacích cestách běžně přítomen, vylučuje sialidázy schopné odštěpení kyseliny sialové z terminálních galaktóz ve vazbách  $\alpha 2,3$ -,  $\alpha 2,6$ - a z GalNAc ve vazbě  $\alpha 2,6$ - (<sup>144</sup>). Ukazuje se, že tyto sialidázy plní pravděpodobně dvojí účel. Prvním je, jak bylo dříve zmíněno, štěpení kyseliny sialové ze savčích glykokonjugátů, která pak je dalšími enzymy zakomponována do bakteriálních struktur, což těmto bakteriím poskytuje ochranu před baktericidním účinkem komplementu. Druhým je ovšem likvidace těchto mimiker konkurujícím bakteriím, kdy tyto sialidázy exprimované *S. pneumoniae* dokáží desialovat kromě hostitelských glykokonjugátů i glykokonjugáty *N. meningitidis* a *H. influenza* (<sup>145</sup>), čímž odhalují jejich přítomnost hostitelskému komplementu a tedy rozšiřují svůj životní prostor.

Kromě zmíněných možných využití kyseliny sialové se nabízí také její rozložení a využití jako zdroj energie, uhlíku či dusíku. Například bakterie *E. coli*, běžně přítomná v lidském organismu, využívá volnou kyselinu sialovou z prostředí pro tvorbu pyruvátu a *N*-actylmannosaminu. Ty mohou dále vstupovat do syntézy jiných molekul, či postupovat dále v katabolických drahách (<sup>146</sup>, <sup>147</sup>, <sup>148</sup>). Vyjma známých bakterií *E. coli* je tato schopnost vlastní mnoha dalším mikroorganismům, zahrnující některé streptokoky (<sup>149</sup>) či *H. influenza* (<sup>150</sup>, <sup>132</sup>).

Kromě výše zmíněných skutečností některé patogeny používají kyselinu sialovou jako receptor pro rozpoznání hostitelských buněk (<sup>126</sup>). Příkladem mohou být dvě rodiny virů. Rozšířený polyomavirus (*Polyomaviridae*), původce závažného onemocnění progresivní

multifokální leukoencefalopatie (<sup>151</sup>), či rotaviry, viry zodpovědné za dětské průjemové onemocnění (<sup>152</sup>).

### 3.3.3 Kyselina sialová v klíštěti a octomilce

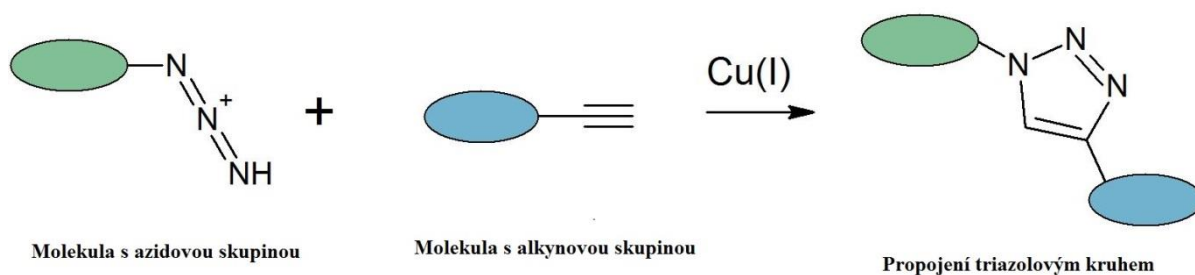
Přítomnost sialovaných struktur v klíštěti *I. ricinus* byla předpovězena na základě lektinoblotu pomocí lektinů MAA II a SNA (<sup>153</sup>) a potvrzena hmotnostní spektrometrií i pomocí imunodetekce Western blotem (<sup>154</sup>). Klíšťata patří do skupiny krev sajících parazitů, pro které je tedy krev jediným zdrojem potravy. Jelikož je velké množství glykoproteinů hostitelské krve sialováno, není snadné odlišit kyselinu sialovou vytvořenou klíštětem od té, která pochází z molekul hostitele. Výstupní data z hmotnostní spektrometrie glykanů tuto informaci neobsahují, proto je nutné zvolit i jiných přístupů studia. Práce kvantifikující celkové množství kyseliny sialové v poměru k metabolicky vytvořené dokazuje, že většina Sia přítomné v dospělé samici *I. ricinus* pochází z hostitele (<sup>155</sup>). Nicméně, malá množství metabolicky vytvořených glykanů obsahujících kyselinu sialovou byla detekována v ováriích a slinných žlázách. Detekce fluorescenční mikroskopií odhalila, že tato Sia je lokalizovaná v některých oocytech (<sup>155</sup>). Tím vyvstávají otázky, jakou roli zde kyselina sialová má, a jakých procesů v ontogenezi se účastní.

V rámci členovců se vyskytují metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny také v glykoprofilu mouchy octomilky. Zde byla kyselina sialová detekována již na začátku devadesátých let (<sup>156</sup>) během embryonálního vývoje a její přítomnost byla několikrát potvrzena (<sup>99</sup>, <sup>157</sup>). Drozofila disponuje jedinou sialyltransferázou, DSiaT, příbuznou obratlovcí rodině ST6Gal sialyltransferáz, patřící mezi  $\alpha$ 2,6- sialyltransferázy (<sup>157</sup>). V této mouše má tedy Sia důležitou roli při vývoji a fungování neurálního systému, kdy se exprimuje v embryonálním vývoji (<sup>156</sup>). Je pravděpodobné, že se účastní excitace neuronů, zajišťuje funkčnost sodíko-draslíkové pumpy a účastní se interakcí mezi svalovými vlákny a neurony (<sup>158</sup>). Role Sia v savčích nervových soustavách je již známá (viz kapitola věnovaná kyselině sialové). Z těchto důvodů lze předpokládat možnost podobné úlohy kyseliny sialové v námi zkoumaném klíštěti *I. ricinus*.

### 3.4 Bioortogonální chemie a „Click“ reakce

Bioortogonální chemie je relativně nové odvětví chemie zabývající se značením molekul. Její součástí jsou značené molekuly, které mohou existovat v živém organismu, a nenarušovat jeho nativní procesy. Jedná se o uměle vytvořené molekuly, obsahující velice malou nereaktivní skupinu. Ta následně může být spojena se sondou, která má na sobě skupinu kompatibilní, díky čemuž se tyto dvě molekuly propojí kovalentní vazbou (příklad Click reakce mezi azidovou a alkynovou skupinou znázorňuje Obr. 4).

Je to efektivní alternativa ke dříve používaným sondám jako je fluoreskující protein GFP (26,9 kDa), který je ovšem tak veliký, že díky své samotné přítomnosti ovlivňuje okolí a především ty molekuly, které mají být s jeho pomocí studovány. Oproti těmto značením v bioortogonální chemii pracujeme se skupinami velkými pouze několik atomů, které neovlivňují svou přítomností biologické okolí, a tak umožňují studovat děje které se uskutečňují v živých systémech v nativním stavu. Bioortogonální chemie funguje prakticky tak, že poskytneme buňkám analog určitého metabolitu, který přichází do metabolické dráhy buňky a kompetuje s nativními metabolity. Buňka pak tento analog použije jako stavební kámen a inkorporuje ho do svých struktur. Na malou značku poté můžeme připojit sondu, kterou dále detekujeme.

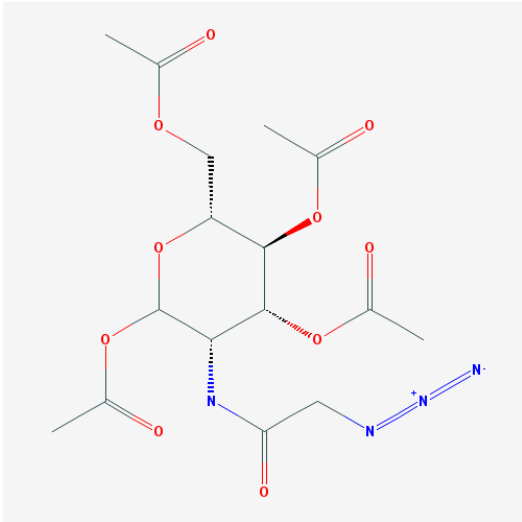


Obrázek 4: Znázornění Click reakce mezi azidovou a alkynovou skupinou. Převzato a upraveno z: [http://medchem101.com/?page\\_id=142](http://medchem101.com/?page_id=142).

Konkrétní praktické využití spočívá např. v odlišení právě nasyntetizovaných buněčných komponent od starších, či metabolicky vytvořených proteinů od těch proteinů, které se dostaly do buňky či organismu z vnějšího prostředí (<sup>159</sup>).

Nejvíce využívanou detekční reakcí je pravděpodobně reakce alkynu a azidu za vzniku triazolového kruhu (<sup>160</sup>), takzvaná 1,3-dípolární cykloadice (odtud název Click). Tato reakce probíhá za určitých podmínek (<sup>161</sup>, <sup>162</sup>), ovšem na předním místě je reakce probíhající v přítomnosti askorbátu sodného katalyzovaná ionty  $\text{Cu}^+$ . Ta je velice rychlá a oproti nekatalyzovaným reakcím vyžaduje řádově kratších časových intervalů (<sup>161</sup>). Oproti ostatním způsobům získání značených biomolekul (<sup>163</sup>) vyniká Click reakce vyjma velkou rychlostí také tím, že je plně kompatibilní s vodním prostředím, pracuje ve fyziologickém pH, probíhá efektivně, azid i alkyň jsou inertní vůči živému okolí a nedochází zde k denaturaci proteinů (<sup>160</sup>). Click reakce může při použití určitých substrátů specifických podmínek probíhat i bez přítomnosti katalyzátoru  $\text{Cu}^+$  (<sup>164</sup>), a to v případě, že značení probíhá přímo v žijícím organismu či buňkách a použití iontů mědi by mělo pro živý organismus nepříznivé účinky.

Praktickým příkladem bioortogonální chemie s využitím Click reakce je detekce azidohomoalaninu (homologu aminokyseliny methioninu). Ten obsahuje azidovou skupinu. Pokud kultivujeme buňky v médiu s příměsí azidohomoalaninu, translační mechanismus buněk inkorporuje azidohomoalanin do nově vytvářených proteinů namísto methioninu, a tak vzniká celá škála proteinů, kterou můžeme odlišit a identifikovat právě na základě této skupiny. Na azidovou skupinu může být posléze Click reakcí navázána přes alkyň libovolná sonda (například biotin, fluorescein, Alexa Fluor® 488), kterou můžeme mnoha způsoby detekovat (Western blotem, fluorescenční mikroskopií, elektronovou mikroskopií) či využít při přípravě proteinů na analýzu hmotnostní spektrometrií. V minulosti byl azidohomoalanin využit například pro identifikaci nově syntetizovaných proteinů savčích buněk (<sup>165</sup>, <sup>166</sup>). Další molekulou využitelnou pro Click chemii, která disponuje azidovou skupinou je ManNAz (*N*-Azidoacetyl-D-mannosamin). ManNAz (Obr. 5) je prekurzorem kyseliny sialové (*N*-acetyl-mannosaminu) a pro účely identifikace metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů byl využit v této práci.



Obrázek. 5: Struktura ManNAz (*N*-Azidoacetyl-*D*-Mannosamin), prekurzor kyseliny sialové disponující azidovou skupinou. Převzato z:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71311757#section=Top>

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

##### Klíšťata

Pro veškerou experimentální činnost prováděnou v této práci byla použita klíšťata druhu *Ixodes ricinus*. Byla nasbírána v letních měsících vlahkováním v Branišovském lese, Českých Budějovicích. Klíšťata byla uchovávána v laboratorních chovech Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Zde byla klíšťata uskladněna ve skleněných nádobkách s průduchy, vysokou relativní vlhkostí a teplotou 26 °C.

##### Klíštěcí linie

Práce s klíštěcími liniemi byla prováděna na linii IRE/CTVM 19 (<sup>167</sup>). Jedná se o linii derivovanou z embrya *I. ricinus*, která může obsahovat buňky pocházející z více tkání. Kultivovány byly v kultivátoru při 28 °C v kultivačních zkumavkách se zploštělým dnem, pasáž probíhala po uplynutí čtrnácti dnů a to výměnou poloviny obsahu kultivační zkumavky za čerstvé médium L-15 obohaceného o 20% BOFES, 10% TPB a 1% glutamin. Klíštěcí linii poskytla Banka klíštěcích buněčných kultur Pirbright Institute ([www.pirbright.ac.uk](http://www.pirbright.ac.uk)).

#### 4.1.2 *In vitro* feeding

##### Krev

Pro *in vitro feeding* byla použita čerstvá býčí krev odebraná na jatkách v Českých Budějovicích. Ta byla ošetřena proti sražení heparinem (Sigma-Aldrich) o koncentraci 15 U/ml. Dále bylo do krve přidáno (uváděné výsledné koncentrace v krvi) 5 µg/ml gentamicinu, 1 mM ATP, 100 U/ml Nystatinu (všechny chemikálie z Sigma-Aldrich). V případě klíšťat krmených krví s příměsí ManNAz (*N*-azido-mannosamin, Life



Technologies/Thermo Fisher Scientific) činila výsledná koncentrace ManNAz v krvi 10 µg/ml (ManNAz rozpouštěn v dimethylsulfoxidu, DMSO, koncentrace zásobního roztoku 10 mg/ml). V případě kontrolních klíšťat byl použit pouze DMSO (Sigma-Aldrich) pro vyloučení jeho případného vlivu v následných detekcích sialovaných glykoproteinů. Krev byla uskladněna při 4 °C do okamžiku použití.

### **Soustava pro krmení klíšťat**

Krmítka pro krmení klíšťat byla vyrobena firmou Plexi – Kubík Miroslav (<http://www.plexikubik.cz/>) dle nákresu (viz Příloha 1). Ta byla umístěna do šestijamkových panelů, ve kterých se nalézala krev, která byla v kontaktu se syntetickou membránou, imitující savčí kůži. Jako pevný základ pro membránu posloužil celulózový papír na čištění čoček mikroskopu (Kodak). Na ten byla nanešena směs následujícího složení:

Elastosil E4 (Wacker)	15g
Elastosil FL white color paste (Wacker)	0,15g
DC 200 silicone oil (Fluka)	4,5g
Hexan (Sigma-Aldrich)	2,9g

### **4.1.3 Roztoky pro přípravu vzorků na fluorescenční mikroskopii**

Všechny roztoky použité pro fluorescenční mikroskopii (FM) byly před použitím přefiltrovány přes 0,22 µm filtr.

1x PBS

1x PBS/20 mM glycin

4% formaldehyd/1x PBS

4% formaldehyd/0,1% glyceraldehyd/1x PBS

0,25% Triton X-100/1x PBS

3% BSA/1x PBS

50 mM NH<sub>4</sub>Cl/1% BSA/1x PBS

1% BSA/1x PBS

1% BSA/1x PBS + příslušná protilátka

Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories)

### **4.1.4 Příprava kryožezů**

Tissue Freezing Medium (Leica Biosystems)

10% želatina

2,3 M sacharóza

Liquid blocker Super Pap Pen mini (Daido Sangyo)

L-Azidomoalanin (AHA) (Click Chemistry Tools)

#### 4.1.5 Značení sérových glykoproteinů

Telecí sérum (Biowest)

Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences)

1x PBS

Oxidační činidlo 100 mM NaIO<sub>4</sub>/1M kyselina octová

1M TRIS

Fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) (Thermo Fisher Scientific)

Fluorescein-5-Thiosemicarbazid (Sigma-Aldrich)

Alexa Fluor® 488 5-Sulfodichlorphenol ester (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)

Alexa Fluor® 488 Hydroxylamin (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)

0,25% trypsin, EDTA in HBSS (Thermo Fisher Scientific)

1M NaOH

1M HCl

BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

#### 4.1.6 Bioortogonální (Click) chemie

Click IT Cell reaction buffer kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)

Alexa Fluor® 488 Alkyn (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)

20 mM CuSO<sub>4</sub>

50 mM THPTA ("3,3',3''-(4,4',4''-(Nitrilotris(methylen))tris(1H-1,2,3-triazole-4,1-diy))tris(propan-1-ol)") (Click Chemistry Tools)

5 mM askorbát sodný

100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5mM Biotin-alkyn (Click Chemistry Tools)

Methanol

Chloroform

#### 4.1.7 SDS-PAGE a blotování

Pro elektroforetickou separaci byla použita elektroforetická souprava firmy Bio-Rad. Pro blotting bylo použito blotovací zařízení Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell firmy Bio-Rad. PVDF membrána i blotovací papír byly zakoupené u téže firmy. Složení SDS-PAGE gelů v Tab. I.

Tabulka I: Složení polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.

	Separáční gel 12%	Zaostřovací gel 5 %
30% akrylamid (37,5:1 akrylamid:bisakrylamid, MERCK)	2 ml	165 µl
4x separáční pufr	1,25 ml	-
4x zaostřovací pufr	-	250 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,7 ml	575 µl
10% persíran amonn�	50 µl	10 µl
TEMED (MERCK)	2 µl	1 µl
TCE (Trichloro etanol, Sigma-Aldrich)	25 µl	5 µl

### **Separáčn  pufr 4x**

1,5 M TRIS  
0,4% SDS (sodiumdodecylsulf t)

### **Zaostřovací pufr 4x**

1,0 M TRIS  
0,4% SDS

### **Lyzační pufr 1x**

100 mM fosforečnan sodn y  
1% SDS  
1x inhibitory fosfat z (Thermo Fisher Scientific)  
1x inhibitory prote z (Thermo Fisher Scientific)

### **Elektrodov  pufr 1x**

25 mM TRIS  
192 mM glycin  
3,6 mM SDS

### **Blotovací pufr 1x**

25 mM TRIS  
192 mM glycin  
20% methanol

### **4x redukuj c  SDS-PAGE vzorkov  pufr (Fermentas, Thermo Fisher Scientific)**

200 mM TRIS  
400 mM DTT  
8% SDS  
0,4% bromfenolov  modř  
40% glycerol

### **Proteinov  marker**

Protein Marker VI (10 – 245) prestained (AppliChem)

### **Blokuj c  roztok**

1x PBS/5% sušen  ml ko

### **Prom vac  roztok**

1x PBS/0,05% Tween 20

### **AP vyvolávací pufr**

100 mM TRIS

100 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

pH = 9,5

125 µg/ml BCIP/250 µg/ml NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium)

### **Blue Silver CBB barvicí roztok**

10% kyselina fosforečná

10% síran amoný

0,12% Coomassie Blue G-250

20% methanol

### **Blue Silver CBB fixační roztok**

50% ethanol

2% kyselina fosforečná

### **2D SDS-PAGE**

Mini-PROTEAN TGX 12% precast gels (Bio-Rad)

ReadyStrip IPG Strips 3-10 (Bio-Rad)

Mineral oil (Bio-Rad)

Roztok pro překryv ReadyStrip (0,003% bromfenolová modř, 25 mM TRIS, 192 mM glycín, 3,6 mM SDS, 1% agaróza) (Bio-Rad)

### **IEF rehydratační pufr**

7M Urea

2M Thiourea

2% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate)

40 mM DTT (dithiotreitol)

0,2% Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare Life Sciences)

1% Bromfenolová modř

### **SDS-PAGE equilibrizační pufr I**

6M Urea

375 mM TRIS, pH=8,8

2% SDS

20% Glycerol

2% DTT

### **SDS-PAGE equilibrizační pufr II**

6M Urea

375 mM TRIS, pH=8,8  
2% SDS  
20% Glycerol  
2,2% iodoacetamid

### **Protilátky pro fluorescenční mikroskopii a western blotting**

Anti-Goat IgG konjugovaná s alkaickou fosfatázou, made in horse (Vector Laboratories)  
Streptavidin konjugovaný s alkaickou fosfatázou (Vector Laboratories)  
Anti-Rabbit IgG konjugovaná s alkaickou fosfatázou, made in goat (Vector Laboratories)  
Anti-Fluorescein, made in goat (Vector Laboratories)  
Biotinilated Anti-Streptavidin, made in goat (Vector Laboratories)  
Anti-rabbit DyLight® 549 IgG, made in goat (Vector Laboratories)  
Anti-Alexa Fluor® 488, made in rabbit (Vector Laboratories)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Příprava značených sérových glykoproteinů**

#### **Dealbuminace séra**

Pro dealbuminaci séra byla použita Blue Sepharose 6 Fast Flow. Blue Sepharose byla důkladně zvortexována po dobu 20 sekund a 1 ml suspenze byl smíchán s PBS v poměru 1:1. Následně byla tato směs centrifugována silou 100 x g při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn. Sefaróza byla takto promyta třikrát. Následně byl 1 ml séra smíchán s 1 ml PBS a 1 ml suspenze promyté sefarózy. Tato směs byla ponechána na rotátoru při pokojové teplotě po dobu 30 minut, následně byla zcentrifugována (100 x g, 5 min, RT) a odpipetovaný supernatant obsahující zředěné dealbuminované sérum byl zfiltrován 0,22 µm filtrem. Teprve takto upravené sérum bylo dále zpracovááno.

#### **Určení optimálního množství značky pro jednotlivá značení**

Pro zjištění optimálního množství všech čtyř značek použitých pro naznačení glykoproteinů byly provedeny optimalizační reakce, kde byl zjišťována efektivita různých množství značek a vliv manipulace se vzorkem a chemikálií použitých v průběhu reakce

např. rozpouštědlo či kyseliny/zásady na úpravu pH, dále také možnost využití trypsinizace pro odstranění možných sérových proteinů zachycených na vnější straně buněčné membrány a možnost třídenní kultivace buněk s vyměněným médiem (viz Obr. 15-18). Následující postup značení uvádí použitá množství stanovená na základě optimalizace.

### **Značení glykanové části sérových glykoproteinů pomocí Alexa Fluor®**

#### **488-hydroxylaminu**

Nejprve byl smíchán 1 ml dealbuminovaného séra s 10 µl 100 mM NaIO<sub>4</sub>/1M kys. octové pro oxidaci kyseliny sialové. Tato směs byla ponechána 30 minut při 4°C ve tmě. Po uplynutí tohoto času bylo pomocí roztoku 1M NaOH upraveno pH na 7,0. Ke směsi bylo přidáno 15 µl 10 mM hydroxylaminu (rozpuštědlo DMSO). Nyní byla směs inkubována 2 hodiny při 4 °C. Po uplynutí této doby byla směs zamrazena na -20 °C.

### **Značení glykanové části sérových glykoproteinů pomocí Fluorescein-5-**

#### **Thiosemicarbazidu**

Nejprve byl připraven zásobní 10 mM roztok fluorescein-5-thiosemicarbazidu (rozpuštědlo DMSO). 1 ml dealbuminovaného séra byl smíchán s 10 µl 100 mM NaIO<sub>4</sub>/1M kys. octové kvůli oxidaci kyseliny sialové nacházející se v terminálních oblastech glykanů, obdobně jako v případě Alexy hydroxylaminu. Tato směs byla ponechána 30 minut při 4°C ve tmě. Po uplynutí 30 minut bylo pomocí roztoku 1M NaOH neutralizováno pH na 7,0. Ke směsi bylo nyní přidáno 15 µl 10 mM fluorescein-5-thiosemicarbazidu. Po tomto kroku byla směs inkubována 120 minut při 4 °C. Po uplynutí této doby byl roztok zmrazen na -20 °C pro zastavení značící reakce.

### **Značení proteinové části sérových glykoproteinů pomocí Alexy Fluor® 488**

#### **5-Sulfo-dichlorphenol esteru**

Nejprve byl připraven zásobní roztok Alexy Fluor® 488 5-Sulfo-dichlorphenol esteru (SDP) o koncentraci 10 µg/µl rozpuštěním v DMSO. Nyní bylo smícháno 154 µl dealbuminovaného séra s 10 µl roztoku Alexy Fluor® 488 SDP. Směs byla inkubována při mírném třepání 60 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po uplynutí tohoto času bylo k reakci přidáno 30 µl TRIS pH 7,0 pro zastavení značící reakce, tedy vyvážení nezreagované Alexy.

## **Značení proteinové části sérových glykoproteinů pomocí Fluorescein-5-isothiokyanátu**

Zásobní roztok FITC o koncentraci 10 µg/µl byl připraven rozpuštěním příslušného množství lyofilizovaného prášku v DMSO. 1 ml dealbuminovaného séra byl smíchán se 100 µl roztoku FITC. Tato směs byla inkubována na třepacím zařízení 60 minut ve tmě za pokojové teploty. Po uplynutí 60 minut byla zastavena značící reakce, a to přidáním 100 µl TRIS pH 7,0.

## **Značení proteinové části pomocí FITC a glykanové Alexou Fluor® 488**

### **Hydroxylaminem**

Pro dvojitě značené sérové glykoproteiny bylo použito FITC značené sérum, které bylo následně naznačeno pomocí Alexy hydroxyaminu, dle postupu uvedeného výše.

## **Kultivace buněk IRE/CTVM19 se značenými séry**

Buňky byly kultivovány v kultivačních zkumavkách se zploštělou stěnou v inkubátoru při 27 °C. Bylo použito médium L-15 obohacené o 20% telecího séra 10% TPB, 1% glutaminu a 2% značeného séra. Ve všech případech bylo kultivováno 300 000 buněk/ml ve 4 ml média s přídatkem 80 µl séra se značenými glykoproteiny po dobu 7 dní, následně byly buňky zcentrifugovány, značené sérum bylo odstraněno a médium vyměněno za čerstvé. Po třech dnech byly buňky lyzovány. Počítání a kontrola přežívání buněk bylo provedeno pomocí Burkerovy komůrky.

### **4.2.2 *In vitro* feeding**

Příprava krmítek pro klíšťata probíhala dle protokolu <sup>(80)</sup> s několika odchylkami (byla vynechána doba inkubace před *in vitro* feedingem, kdy jsou samice po dobu tří týdnů drženy v přibližně 90 % relativní vlhkosti při 20 °C, dále nebylo využito stimulu zvířecích štětín <sup>82)</sup>). Skleněná deska byla obalena potravinovou fólií, která byla následně zafixována lepící páskou. Na tuto fólii byly kladeny celulózové papíry (Kodak), jež byly na protilehlých koncích taktéž zafixovány páskou. Byla připravena silikonová směs obsahující

silikon E4 (Wacker), FL white color paste (Wacker), DC 200 silicone oil (Fluka) a hexan (Sigma-Aldrich) o příslušné gramáži, která byla následně rozetřena na 60 – 80  $\mu\text{m}$  tenkou vrstvou po papíru. Tato směs byla ponechána 14 hodin při pokojové teplotě na pracovním stole schnout. Vyhovující tloušťka byla ověřena ultrametrem. Krmítka byla po spodní straně potřena tenkou vrstvou silikonu E4 a přitlačena na membránu. Zde byla ponechána 4 hodiny. Krmítka byla následně vyříznuta skalpelem, kterým byla i odstraněna fólie na spodní straně membrány. Následně bylo pomocí ponoření do 70% ethanolu zjištěno, zda membrány neprotékají.

Do šestijamkových panelů bylo do každé jamky napipetováno 3,1 ml krve ošetřené heparinem, antibiotiky, nystatinem a ATP. Krev byla dále obohacena o ManNAz o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , v případě kontrolních klíšťat bylo přidáno stejné množství DMSO. Do jednoho krmítka bylo umístěno 10 samic a 5 samců, po jejich vložení na membránu bylo krmítko ucpáno prodyšnou bandáží. Panel se šesti krmítky byl následně umístěn do vodní lázně vyhřívané na 37 °C. Lázeň byla přiklopena pro navození vysoké vlhkosti. Krev byla měněna po dvanácti hodinách, přičemž během každé výměny byl panel vyčistěn proudem destilované vody a PBS s Nystatinem o koncentraci 100 U/ml. Klíšťata byla tímto způsobem krmena, dokud nedošlo k samovolnému uvolnění klíštete. Po nakrmení byla klíšťata povrchově desinfikována 70% ethanolem po dobu 10 sekund a následně 3x omyta sterilní vodou. Takto očištěná klíšťata byla uskladněna k vykladení. Několik samic bylo usmrceno a okamžitě z nich byly vypitvány jednotlivé orgány: slinné žlázy, střevo, Malpigické trubice, ovária. Jako kontroly byly tyto orgány odebrány ze samic krmených krví s přídavkem DMSO. Vajíčka byla odebírána v časových intervalech od vykladení do vylíhnutí. Larvy byly odebrány a zpracovány ihned po vylíhnutí. Jako kontroly posloužily vajíčka a larvy pocházející ze samic krmených krví s přídavkem DMSO.

#### **4.2.3 Příprava kryorezů pro konfokální (fluorescenční) mikroskopii**

##### **Příprava řezů buňkami IRE/CTVM19 značených AHA**

Buňky byly kultivovány v obohaceném L-15 médiu (viz materiál) s přídavkem AHA o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  po 24 hodin. Poté byly zcentrifugovány silou 400 x g po dobu tří minut, médium obsahující AHA bylo odstraněno a nahrazeno stejným objemem média bez AHA, ve kterém byly buňky ponechány 2 hodiny. Příprava probíhala při pokojové teplotě,



není-li specifikováno jinak. Buňky byly 3x promyty PBS vždy po dobu 10 minut. Následným krokem byla fixace 4% formaldehydem v PBS po dobu 15 minut. Buňky (přibližně 120 tisíc buněk) byly po tomto kroku zcentrifugovány, supernatant byl odpipetován. Nyní byly buňky opět 3x promyty PBS vždy po dobu 10 minut. Buňky byly po posledním promytí rozsuspendovány v 200  $\mu$ l 10% želatiny rozehřáté na 37 °C, mírně rozmíchány pipetou a centrifugovány silou 300 x g po dobu 5 minut pro zakoncentrování na dně zkumavky. Tato směs želatiny a buněk byla inkubována 10 minut při teplotě 4 °C. Během této doby došlo ke ztuhnutí želatiny. Skalpelem byla rozkrojena zkumavka a želatina vyloupana z plastového obalu zkumavky. Buňky v želatině byly následně umístěny do 2 cm dlouhé formy obdélníkovitého tvaru, které obsahovala Tissue Freezing Medium. V této formě byla hluboce zamrazena pomocí tekutého dusíku. Po kompletním zamražení celé formy byl vzorek vyloupan a část obsahující buňky byla vyříznuta pomocí žiletky a připevněna na ocelový terčík. Terčík byl následně zamražen tekutým dusíkem a umístěn do mikrotomu (Leica CM 1850 UV), kde byl vzorek nařezán za teploty -24 °C. Zde byly nakrájeny 5  $\mu$ m tenké řezy buněk, které byly přilepeny (působením teplého povrchu skla) na podložní sklíčko. Na podložním sklíčku byly vzorky obtaženy hydrofobním fixem (Pap Pen) a po jeho zaschnutí bylo přikročeno k dalším inkubacím. Následovala permeabilizace 0,25% Tritonem X-100/PBS po dobu 20 minut. Po permeabilizaci byla provedena Click reakce pomocí Click iT Cell Reaction Buffer kitu dle protokolu výrobce. Click reakce probíhala po dobu 30 minut s použitím 1  $\mu$ M Alexy Fluor® 488 Alkyne. Následně byly řezy blokovány pomocí 3% BSA/PBS 60 minut. Po blokování byla zhasena autofluorescence pomocí chloridu amoného (50 mM NH<sub>4</sub>Cl/1% BSA/PBS) po dobu 20 minut. Dále byly buňky 3x promyty 1% BSA/PBS po dobu 10 minut. Následně byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující primární protilátku (Anti-Alexa Fluor® 488 rabbit, ředění 1:1000) s inkubací 1 hodinu. Po tomto kroku následovalo 3x promytí 1% BSA/PBS po dobu 10 minut. Následně byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující sekundární protilátku (Anti-rabbit DyLight 549, ředění 1:1000) a řezy v něm byly inkubovány 1 hodinu. V následujícím kroku byly řezy promyty 3x 1% BSA/PBS po 10 minutách a 3x v PBS po 10 minutách. Po tomto kroku byly ponechány na pracovním stole 20 minut vyschnout. Vzorky byly zakápnuty kapkou Vectashield Mounting Medium obsahujícím DAPI a přikryty krycím sklíčkem. Po přitlačení bylo sklíčko obtaženo lakem pro zamezení vyschnutí a posunu skel.

### **Příprava řezů vajíček a larev *I. ricinus***

Vajíčka samic krmených *in vitro* byla odebírána v časech 3, 7, 14, 21 dnů v případě 1 µg/ml a 3, 7, 14 dnů v případě 10 µg/ml ManNAz po vykladení. Larvy byly odebrány ihned po vylíhnutí. Jak vajíčka, tak larvy byly zpracovány stejnou metodou pro dosažení mikroskopovatelných řezů dle následujícího postupu. Příprava probíhala při pokojové teplotě, není-li specifikováno jinak. Nejprve byly vzorky 3x promyty roztokem PBS po dobu 15 minut. Vajíčka byla fixována roztokem 4% formaldehyd/0,1% glutaraldehyd/PBS po dobu 60 minut, larvy tímtež po dobu 120 minut. Po fixaci byly vzorky znovu 3x promývány PBS/20 mM glycinem po dobu 15 minut. Po tomto kroku byly zalaty 10% želatinou předeřátou na 37 °C, důkladně promíchány pomocí špičky pipety a ponechány 10 minut při 4 °C. Ztuhlá želatina obsahující vzorky byla odkrojena skalpelem a vyloupena z plastového zbytku zkumavky. Larvy a vajíčka v želatině byly následně uloženy do 2 cm dlouhé formy obdélníkovitého tvaru, která obsahovala Tissue Freezing Medium. V této formě byla hluboce zamrazena pomocí tekutého dusíku. Po kompletním zamražení celé formy byl vzorek vyloupen a část obsahující vajíčka/larvu byla vyříznuta pomocí žiletky a připevněna na ocelový terčík. Terčík byl následně zamražen tekutým dusíkem a umístěn do kryomikrotomu, kde byl vzorek při teplotě -24 °C nařezán na 5 µm tenké řezy v případě vajíček a 4 µm tenké řezy v případě larev. Řezy byly pomocí tepla přilepeny na podložní sklíčka. Na podložním sklíčku byly vzorky obtaženy hydrofobním fixem (Pap Pen), po jeho zaschnutí bylo přikročeno k dalším inkubacím. Následovala permeabilizace 0,25% Tritonem X-100/PBS po dobu 20 minut. Nyní byla provedena Click reakce pomocí Click iT Cell Reaction Buffer kitu dne protokolu výrobce. Click reakce probíhala po dobu 30 minut při 1 µM koncentraci Alexy Fluor® 488 Alkyne. Následně byly řezy blokovány pomocí 3% BSA/PBS 60 minut. Po tomto kroku byla zhasena autofluorescence pomocí chloridu amoného (50 mM NH<sub>4</sub>Cl/1% BSA/PBS) po dobu 20 minut. Dále byly řezy 3x promyty PBS/1% BSA po dobu 10 minut. Byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující primární protilátku (Anti-Alexa Fluor® 488 rabbit, ředění 1:1000) s inkubací 1 hodinu. Po tomto kroku následovalo 3x promytí 1% BSA/PBS po dobu 10 minut. Byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující sekundární protilátku (Anti-rabbit DyLight 549, ředění 1:1000) a řezy v něm byly inkubovány 1 hodinu. Řezy byly promyty 3x 1% BSA/PBS po 10 minutách a 3x v PBS po 10 minutách. Po tomto kroku byly ponechány na pracovním stole 20 minut vyschnout. Vzorky byly zakápnuty kapkou

Vectashield Mounting Medium obsahující DAPI a přikryty krycím sklíčkem. Po přitlačení bylo sklíčko obtaženo lakem pro zamezení vyschnutí a posunu skel.

#### **4.2.4 Příprava buněk IRE/CTVM19 kultivovaných se značenými séry pro FM**

Buňky byly kultivovány v obohaceném L-15 médiu s přidavkem 2% značených sér z celkového objemu média. Kultivovány byly takto sedm dní, poté byly centrifugovány při 400 x g po dobu tří minut, médium obsahující značené sérum bylo odpipetováno a nahrazeno stejným objemem čistého média, se kterým byly tyto buňky kultivovány tři dny. Po tomto kroku byly buňky přemístěny na zakryté podložní sklíčko, jeden den pro uchycení na sklo. Následující příprava probíhala při pokojové teplotě. Buňky byly 3x promyty PBS po dobu 10 minut. Následným krokem byla fixáž 4% formaldehydem po dobu 15 minut. Následovala permeabilizace 0,25% Tritonem X-100/PBS po dobu 10 minut. Následně byly buňky blokovány 3% BSA/PBS 60 minut. Po blokaci byla zhášena autofluorescence pomocí chloridu amoného (50 mM NH<sub>4</sub>Cl/1% BSA/PBS) po dobu 10 minut. Dále byly buňky 3x promyty PBS/1% BSA po dobu 10 minut. Následně byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující primární protilátku (Anti-Alexa Fluor® 488 rabbit, ředění 1:1000) a inkubovány byly 1 hodinu. Po tomto kroku následovalo 3x promytí 1% BSA/PBS po dobu 10 minut. Následně byl aplikován roztok 1% BSA/PBS obsahující sekundární protilátku (Anti-rabbit Dylight 549, ředění 1:1000) a buňky v něm byly inkubovány 1 hodinu. V následujícím kroku byly buňky promyty 3x 1% BSA/PBS po 10 minutách a 3x v PBS po 10 minutách. Po tomto kroku byly ponechány na pracovním stole 20 minut vyschnout. Vzorokly byly zakápnuty kapkou Vectashield Mounting Medium obsahující DAPI a přikryty krycím sklíčkem. Po přitlačení bylo sklíčko obtaženo lakem pro zamezení vyschnutí a posunu skel a byly zmikroskopovány.

#### **4.2.5 Fluorescenční a konfokální mikroskopování**

Řezů vajíček a larev byly mikroskopovány na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu Olympus Fluoview FV-10i a prohlíženy pomocí softwaru FV-10i-SW. Pořízené snímky byly zpracovány a upraveny programem FV10-ASW 1.7 Viewer. Druhým mikroskopem použitým v této práci byl fluorescenční mikroskop Olympus BX-60

vybaven digitální kamerou Olympus DP71 s prohlížečím softwarem DPC Controller. Fotky z fluorescenčního mikroskopu byly proloženy pomocí programu ImageJ (<sup>168</sup>).

#### **4.2.6 SDS-PAGE, Western blot**

##### **Příprava lyzátů klíš'at a buněk**

Klíš'ata byla před samotnou extrakcí proteinů povrchově sterilizována 70% ethanolem po dobu 30 sekund. Následně byla 3x promyta sterilní vodou a osušena filtračním papírem. Klíš'ata byla usmrcena a byly vypitvány slinné žlázy, střeva, Malpighické trubice a ovaria. Samice, jednotlivé orgány, vajíčka i larvy byly následně 3x promyty sterilním roztokem PBS a umístěny do lyzačního pufru. Vzorky byly následně umístěny do homogenizátoru (TissueLyser II, Qiagen), kde byly zhomogenizovány olověnou kuličkou (frekvence 30 úderů za sekundu, 15 minut). Následně byly vzorky umístěny do sonikační vany, kde byly při 4 °C sonikovány po dobu 15 minut. Poté byly vzorky přemístěny do vortexu, kde byly 15 minut vortexovány. Vzorky byly umístěny do centrifugy, kde byly po dobu 5 minut při 4°C centrifugovány silou 14 000 x g. Následně byl odpipetován supernatant, byla změřena koncentrace proteinů a tento vzorek byl následně zamražen na teplotu -20 °C do počátku další práce. Buňky IRE/CTVM19 byly zpracovány stejným způsobem, tzn. 3x promyty PBS, sonikovány, vortexovány, centrifugovány dle stejných parametrů jak bylo uvedeno pro vzorky klíš'at, vajíček a larev. Koncentrace roztoků obsahující proteiny byla měřena metodou BCA pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay Kit dle pokynů výrobce. Vzorky určené pro SDS-PAGE pocházející z *in vitro* krmených klíš'at krví s přidavkem ManNAz i buněk IRE/CTVM19, byla provedena Click reakce dle níže uvedeného postupu. Po této reakci byly vzorky zbaveny všech látek jež Click reakce vyžaduje, a to srážením proteinů dle níže uvedeného postupu.

##### **Click reakce**

Při Click reakci vzorků pro následnou SDS-PAGE byly používány vzorky připravené pro tuto metodu dle postupu uvedeného výše. Byla připravena reakce dle (<sup>169</sup>), tedy smíchán pufr 100 mM dihydrogenu fosforečnanu draselného o pH = 7,0 s lyzátem obsahujícím 50 µg proteinů (celkový objem 432,5 µl, tedy např. 382,5 µl pufru a 50 µl vzorku o

koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Následně bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  5 mM biotin-alkynu a 25  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Byl připraven premix 2,5  $\mu\text{l}$  20 mM CuSO<sub>4</sub> s 5  $\mu\text{l}$  50 mM THPTA. Ten byl přidán do roztoku. Po tomto kroku bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  askorbátu sodného. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Následně byly proteiny sráženy dle postupu uvedeného níže.

### **Srážení proteinů**

Pro srážení proteinů byl použit metanol a chloroform. 100  $\mu\text{l}$  vzorku obsahujícího proteiny bylo smícháno s 400  $\mu\text{l}$  metanolu, 100  $\mu\text{l}$  chloroformu a 300  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Směs byla intenzivně vortexována a centrifugována silou 14 000 x g při pokojové teplotě 1 minutu. Následně byla odpipetována horní fáze a ke zbytku přidáno 400  $\mu\text{l}$  metanolu. Směs byla vortexována a centrifugována stejným způsobem jako v minulém kroku. Supernatant byl odstraněn a vysrážená peleta proteinů ponechána na pracovním stole vyschnout. Proteiny byly následně rozpuštěny v malém množství lyzačního pufru.

### **Příprava vzorků před aplikací na gel**

Proteinové extrakty z klíšťat, orgánů, vajíček, larev a buněk byly pro SDS-PAGE připraveny stejným způsobem. Ke zpracovaným vzorkům (viz výše) bylo přidáno odpovídající množství 4x koncentrovaného redukčního vzorkového pufru obohaceného o DTT, následně byly vzorky zahřáty na 75 °C na 5 minut a centrifugovány silou 5 000 x g po dobu 5 minut.

### **Průběh SDS-PAGE a Western blottingu**

SDS-PAGE byla provedena dle protokolu (<sup>170</sup>). Nejprve byly odmaštěny skla a připravena elektroforetická aparatura. Polyakrylamidové separační a zaostřovací gely byly připraveny z příslušných chemikálií dle údajů v Tab. I. Spolu se vzorky byl nanesen proteinový marker (Protein Marker VI (10 – 245) prestained (AppliChem)). Zdroj byl nastaven na 120 V, separace probíhala 75 minut.

Po dokončení SDS-PAGE byl gel opláchnut destilovanou vodou. Dále byla v blotící aparatuře seskládána blotící sestava. Ta se skládala (směrem od anody ke katodě) ze

savého papíru, PDVF membrány, polyakrylamidového gelu a savého papíru. Blotting probíhal vždy 12 hodin při voltáži 3V. Blotting tedy probíhal dle protokolu (<sup>171</sup>).

### **Průběh 2D SDS-PAGE a Western blottingu**

Pro přípravu vzorku na dvourozměrnou SDS-PAGE (2D SDS-PAGE) bylo vysráženo 50 µg sérových proteinů (odpovídajících 3,8 µl značených dealbuminovaných sér) pomocí methanolu a chloroformu. K proteinové peletě byl přidán rehydratační IEF pufr. Pro izoelektrofokusaci byly použity proužky ReadyStrip IPG Strips (Bio-Rad). Proužky byly rehydratovány 125 µl rehydratačním IEF pufru obsahujícím proteniny a překryty minerální olejem. V tomto stavu byly při pokojové teplotě ponechány 12 hodin. Následně byla provedena izoelektrofokusace v aparatuře Hofer IEF100 dle schématu uvedeného v Tab. II.

Tabulka II: Parametry izoelektrofokusace.

Voltáž	Napětí [V]	Délka [min]	Volthodiny [Vh]
konstantní	250	30	125
gradient	1000	60	1000
gradient	4000	120	8000
konstantní	4000	120	8000
konstantní	500	420	3500

Po dokončení izoelektrofokusace byly proužky očištěny od minerálního oleje a ekvilibrovány, a to pomocí ekvilibračního pufru I (EP I) a ekvilibračního pufru II (EP II). Na jeden proužek bylo nanášeno nejprve 2,5 ml EP I a inkubováno po dobu 5 minut za mírného třepání při RT. Po pěti minutách byl EP I slit a vyměněn za nový EP I. Po druhé pětiminutové inkubaci byl odpipetován a nahrazen 2,5 ml EP II, se kterým byla celá ekvilibrační procedura zopakována stejným způsobem, jako v případě EP I.

Po ekvilibraci byla rozehřáta overlay agaróza na 90 °C. Nyní byl ekvilibrovaný proužek promyt několikrát v elektrodovém pufru a umístěn na precast TGX polyakrylamidový gel (Bio-Rad). Po tomto kroku byl proužek zalit zahřátou agarózou. Do levé části (ke konci

proužku s pH=3) byl umístěn 2x2 mm velký čtverec filtračního papíru napuštěný 3  $\mu$ l markeru (Protein Marker VI (10 – 245) prestained).

Nastavení SDS-PAGE i provedení blotu bylo stejné jako v případě jednodimenzionální SDS-PAGE.

#### **4.2.7 Inkubace a vyvolávání membrán**

Po provedení elektroblotu byly PVDF membrány omyty proudem destilované vody pomocí stříčky a zbaveny blotovacího pufru. Následovaly jednotlivé inkubace, které probíhaly vždy při RT za mírného pohybu na třepacím zařízení. Nejprve byly membrány blokovány pomocí 5% odtučněného mléka/PBS. Po blokaci byly inkubovány s roztokem 5% odtučněného mléka/PBS a primární protilátkou ředěnou 1:1000 po dobu 60 minut. Následně byly promyty v PBS-T po dobu 10 min. Promývání bylo 3x opakováno. Po promývání přišla na řadu inkubace se sekundární protilátkou ředěnou 1:1000 v roztoku 5% odtučněného mléka/PBS po 60 minut. Následovalo opět promývání PBS-T 3x 10 minut. Po odmytí nenavázaných sekundárních protilátek (v případě kdy byly vyvolávány pomocí Click reakce signály pocházející z NeuNAz bylo použito trojitě značení) byly membrány zality 10 ml AP vyvolávacím pufrem a přidáno 200  $\mu$ l BCIP/NBT. Membrány byly ponechány na pracovním stole, dokud se nevyvinul signál. Potom byl AP vyvolávací roztok odlit, membrána byla opláchnuta proudem destilované vody a ponechána na stole vyschnout.

## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí WB

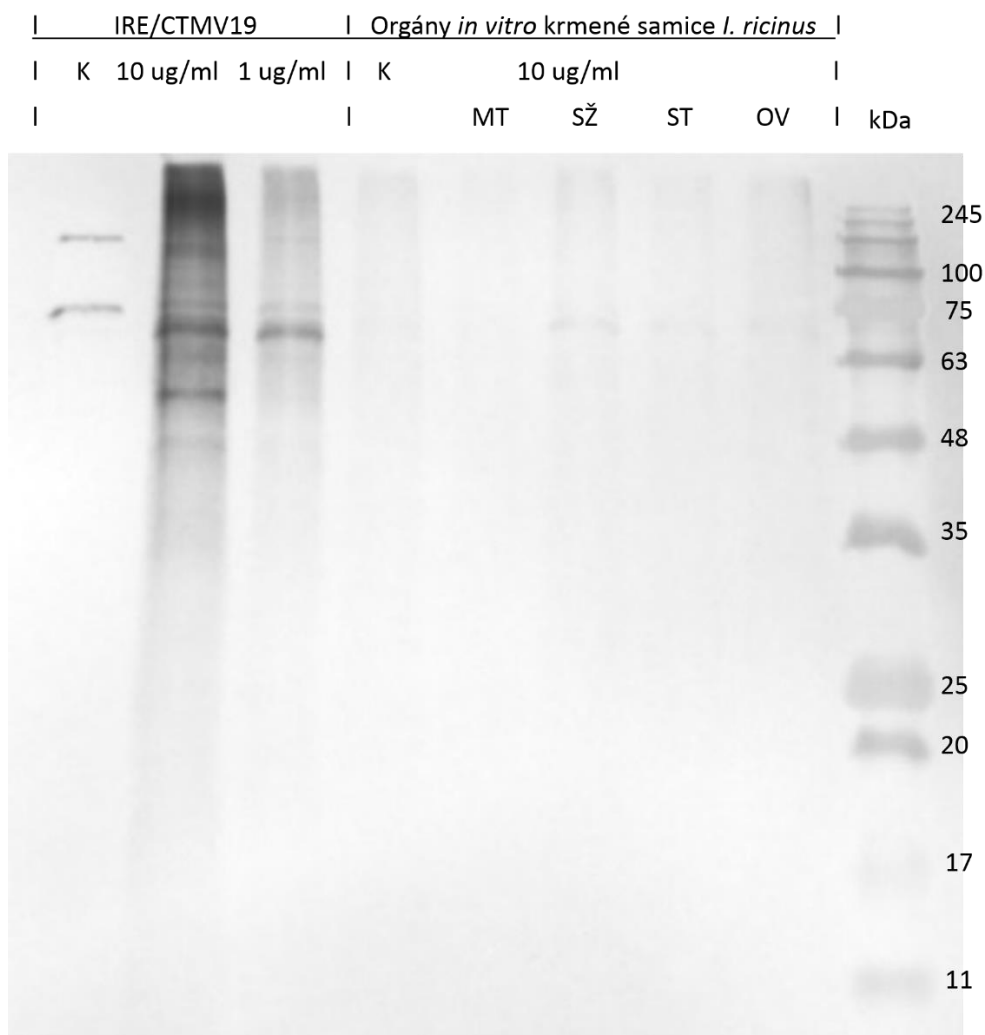
V *in vitro* podmínkách byly samice *I. ricinus* krmeny na námi vytvořené silikonové membráně nahrazující kůži krví obohacenou o prekurzor kyseliny sialové obsahující azidovou skupinu – ManNAz. Tento prekurzor byl metabolizován klíštětem na NeuNAz a následně inkorporován do vlastních, metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů. Na azidovou skupinu v těchto glykoproteinech byla pomocí Click reakce navázána přes alkynovou skupinu za vzniku kovalentní vazby (triazolového kruhu) Alexa Fluor® 488®. Glykoproteiny s navázanou Alexou byly následně detekovány pomocí Western blotu protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou (viz Obr. 6 - 9), a pomocí mikroskopie protilátkou konjugovanou s DyLight 549 (viz Obr. 11 - 13).

Detekci metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí Western blotu v orgánech *in vitro* krmené samice a buněk IRE/CTVM19 znázorňuje Obrázek 6. Samice byla krmena krví s 10 µg/ml ManNAz. Jako negativní kontrola použit lyzát celé *in vitro* krmené samice krví s DMSO o stejné koncentraci. Buňky byly kultivovány 7 dní s příměsí ManNAz o koncentracích 1 µg/ml, 10 µg/ml a DMSO o stejné výsledkové koncentraci v médiu jako negativní kontrola.

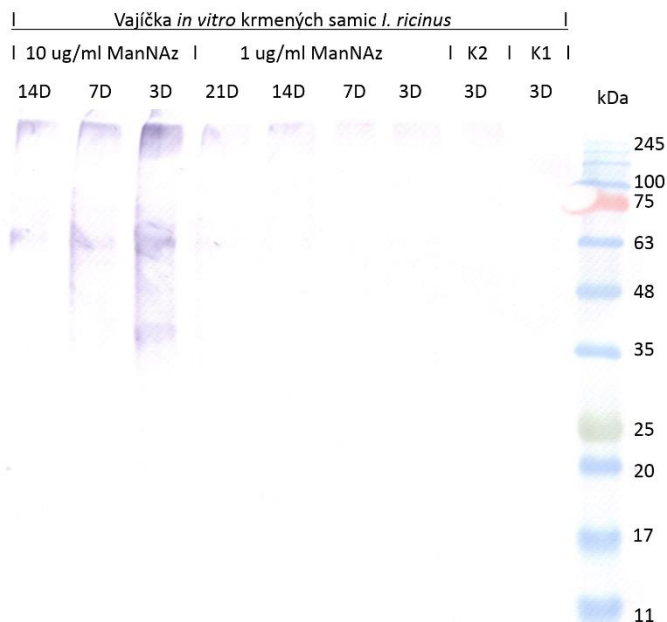
Obrázky 7 a 8 znázorňují detekci metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí Western blotu obsažených ve vajíčkách *in vitro* krmených samic odebíraných v uvedených intervalech po vykladení (3 – 21 dní v případě samic krmených krví s ManNAz o koncentraci 1 µg/ml, 3 – 14 dní v případě samic krmených krví s ManNAz o koncentraci 10 µg/ml). V případě těchto obrázků se jedná o technické opakování, tedy vajíčka odebírána v uvedených časových intervalech po vykladení pocházela z 1 samice v případě obou koncentrací ManNAz. Click reakce byla provedena nezávisle dvakrát. Jako negativní kontrola byla použita vajíčka samice krmené krví s přídavkem DMSO odebraná po 3 dnech (K1, K2). Vzorek K1 představuje lyzát, K2, lyzát s provedenou Click reakcí. Všechny vzorky byly sráženy chloroformem a methanolem.



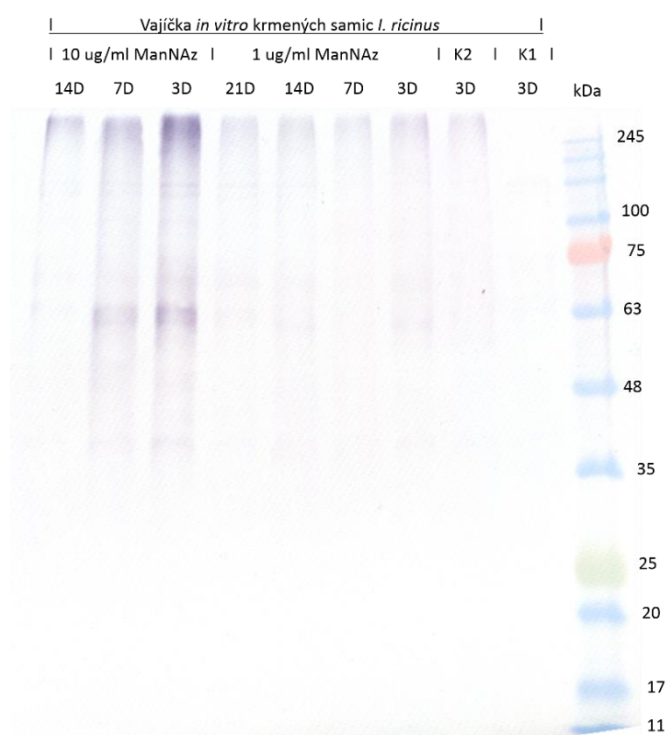
Obrázek 9 znázorňuje detekci metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí Western blotu obsažených ve vajíčkách *in vitro* kmených samic krví s ManNAz o koncentraci 10 µg/ml odebíraných v uvedených intervalech po vykladení (3 – 14 dní). Tyto vzorky pocházejí z vajíček ze dvou dalších různých samic (A, B), celkem tedy byly klíštětem vytvořené sialované glykoproteiny detekovány ve snůškách vajíček pocházejících ze třech samic *in vitro* kmených krví s přidavkem ManNAz.



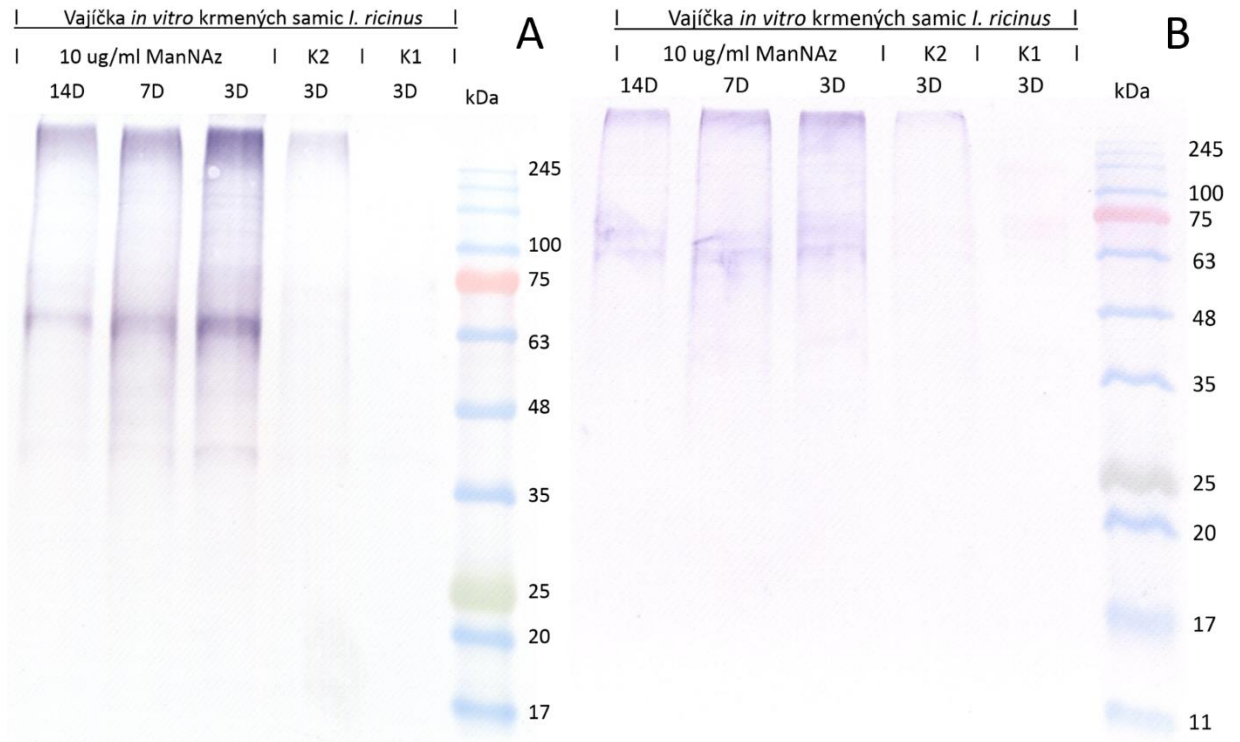
Obrázek 6: Metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny v orgánech *in vitro* kmené samice *I. ricinus* krví s ManNAz o koncentraci 10 µg/ml a buněk IRE/CTVM19 detekované pomocí Click reakce. (MT=Malpigické trubice, SŽ=slinné žlázy, ST=střevo, OV=ovária, K=kontrola). Po Click reakci proběhlo srážení. Detekce pomocí alkaickéu fosfatázy.



Obrázek 7: Metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny ve vajíčkách *in vitro* krmené samice *I. ricinus* krví s ManNAz o koncentracích 1 µg/ml a 10 µg/ml odebíraných po uvedených intervalech od vykladení. Kontroly K1, K2 bez a s proběhnutou Click reakcí a srážením. Detekce alkalickou fosfatázou.



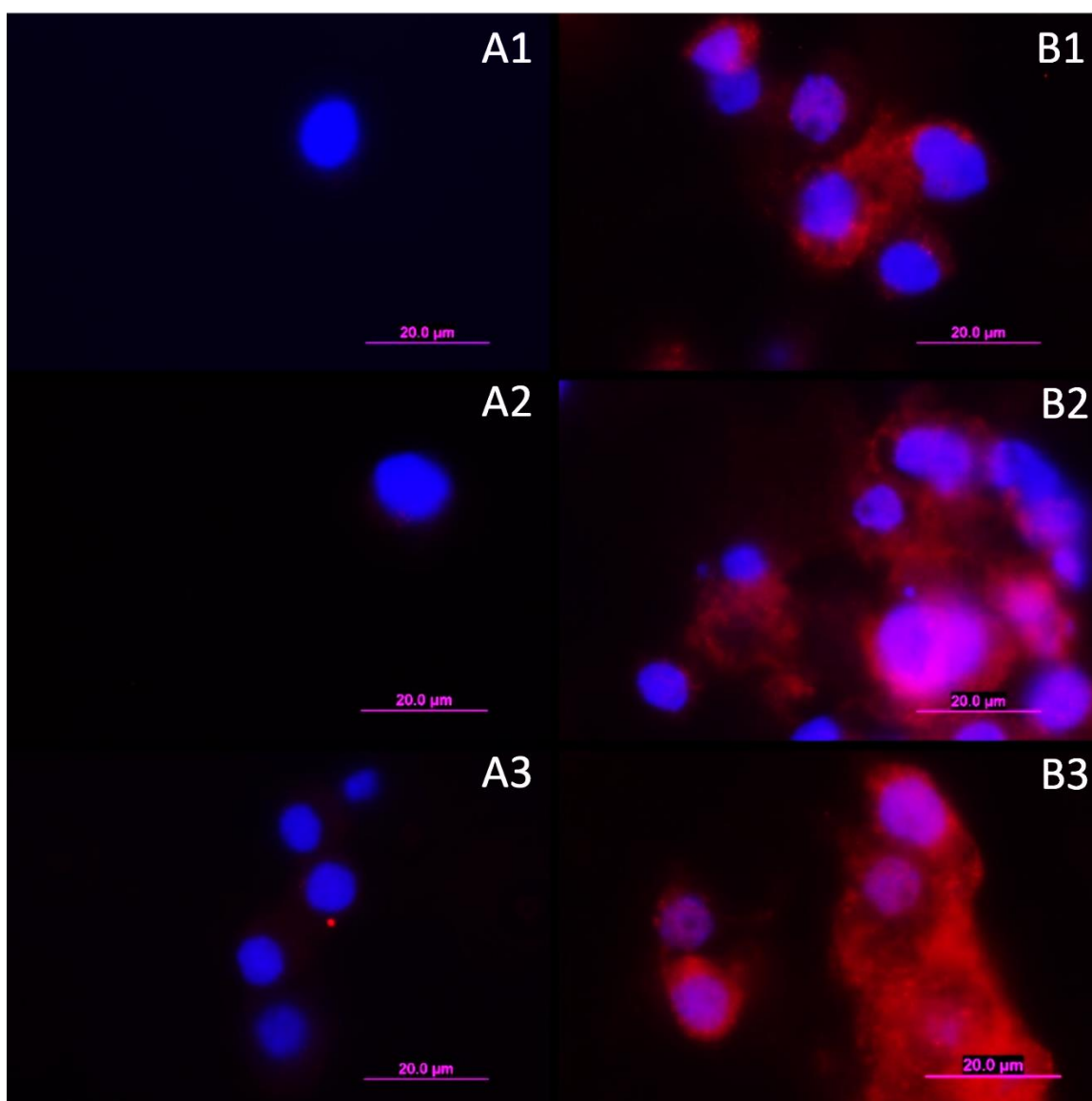
Obrázek 8: Metabolicky vytvořené sialované glykoproteinů ve vajíčkách *in vitro* krmené samice *I. ricinus* krví s ManNAz o koncentracích 1 µg/ml a 10 µg/ml odebíraných po uvedených intervalech. Technické opakování, materiál použit stejný jako v případě Obr. 7. Kontroly K1, K2 bez a s proběhnutou Click reakcí a srážením. Detekce alkalickou fosfatázou.



Obrázek 9: Detekce metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů ve vajíčkách *in vitro* krmené samice *I. ricinus* (2 jedinci, A, B) krví s ManNAz o koncentraci 10 µg/ml odebíraných po uvedených intervalech od vykladení. Kontroly K1 bez srážení a bez Click reakcí, K2 kontrola pochází z vajíček samice krví obohacenou pouze o DMSO, ale s proběhnutou Click reakcí a následným srážením. Detekce alkalickou fosfatátou.

## 5.2 Detekce metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů pomocí FM

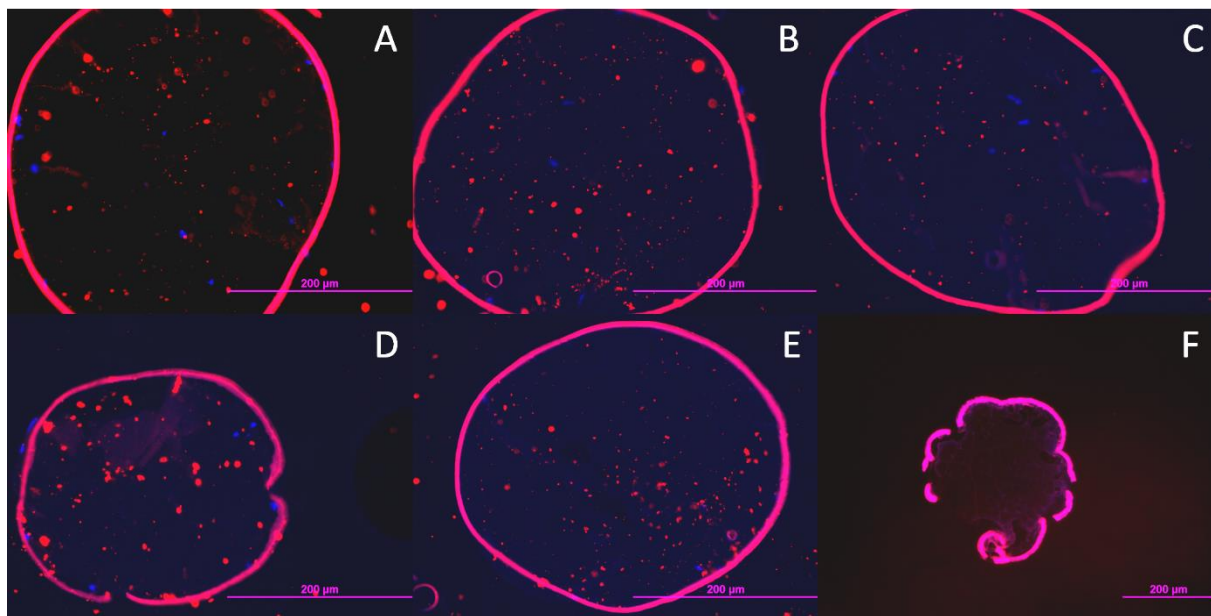
Pro detekci a lokalizaci pomocí fluorescenční mikroskopie byly zhotoveny řezy. Pro zjištění, zda mohou být 5  $\mu\text{m}$  tenké řezy značeny pomocí Click reakce byl proveden pilotní pokus, kdy byly nařezány zafixované buňky IRE/CTVM19 kultivované 12 hodin s AHA o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tyto řezy byly úspěšně naznačeny, negativní kontrola navíc odhalila jen minimální zkříženou reaktivitu, viz Obrázek 10.



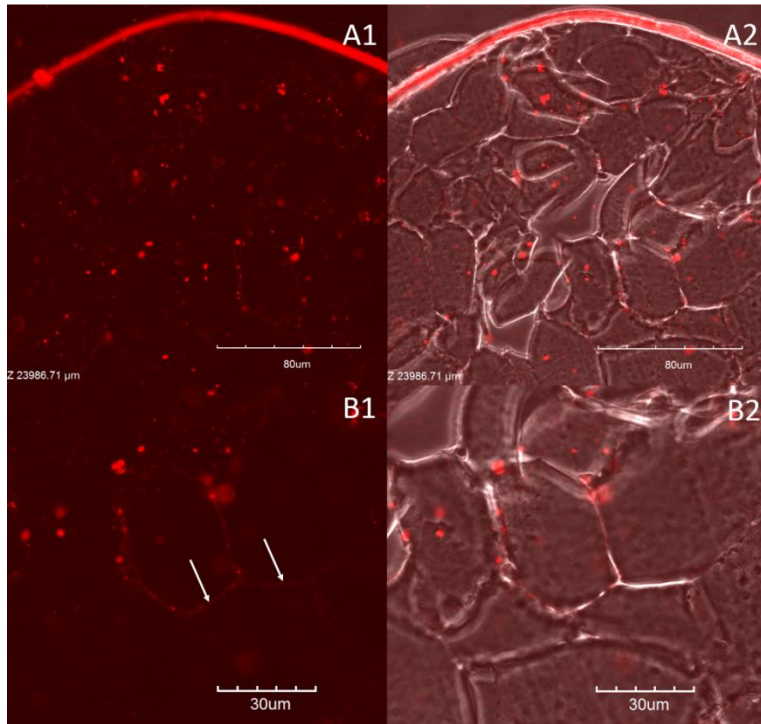
Obrázek 10: Buňky IRE/CTVM19 značené AHA 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (B1-B3). (A1-A3) negativní kontrola. Červená: AHA, detekce DyLight 549, modrá: DAPI. Měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

Vajíčka odebraná 14 dní po vykladení samice krmené krví s koncentrací ManNAz 10  $\mu\text{g/ml}$  byla nakrájena na 5  $\mu\text{m}$  tenké řezy a připravena pro fluorescenční mikroskopování. Tato vajíčka zachycuje Obrázek 11, kde došlo k potvrzení výsledků z Western blotu. Signál se nacházel pouze ve vejcích pocházejících ze samic krmených krví, která byla obohacená o ManNAz, v kontrolních nikoli. Všechna vejce byla zpracována identickým způsobem. Pro přesnou lokalizaci signálu a lepší rozlišení byly vzorky mikroskopovány konfokálním mikroskopem (viz Obr. 12). Zde je kromě neurčitých bodových signálů patrný signál podél plasmatických membrán buněk.

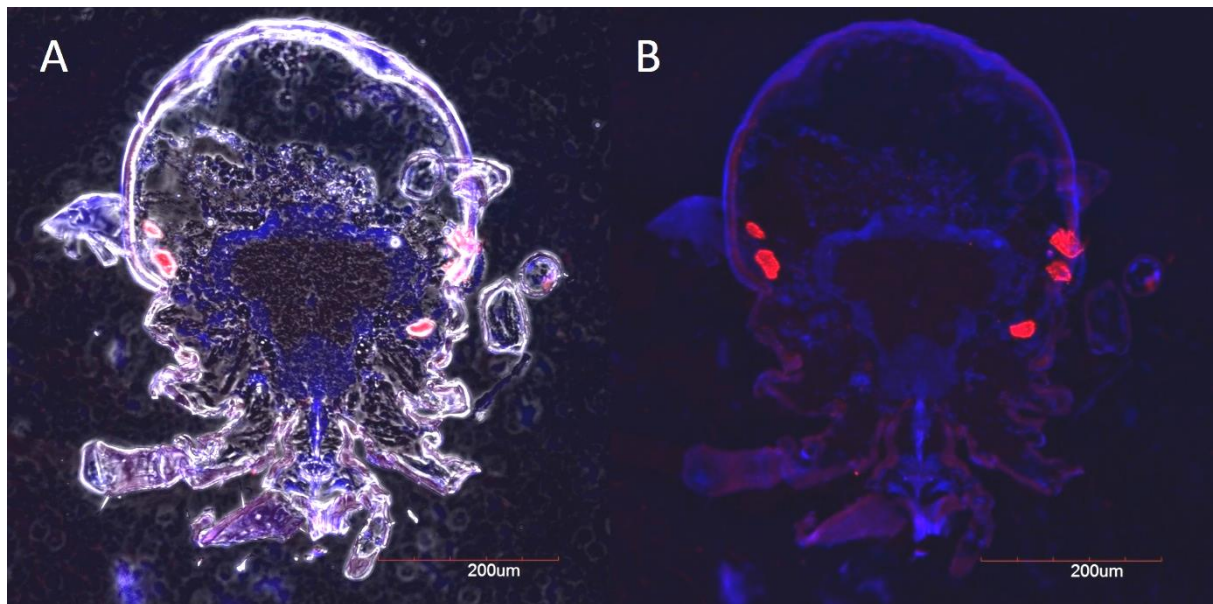
Některá vajíčka byla ponechána na vykladení a stejným způsobem jako v případě vajíček byly připraveny 4  $\mu\text{m}$  tenké řezy larvami. Řezy byly následně naznačeny identicky jako řezy vajíčky a mikroskopovány ve snaze detekovat případné sialované glykoproteiny. Ty byly lokalizovány pomocí konfokálního mikroskopu (viz Obr. 13). Proostření detailů jednotlivých specifických signálů viz Přílohy 2 – 5.



Obrázek 11: Vajíčka pocházející z *in vitro* krmené samice krví, která byla obohacená o 10  $\mu\text{g/ml}$  ManNAz, odebraná 14 dní po vykladení (A-E). Kontrola F. Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Modrá: DAPI. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

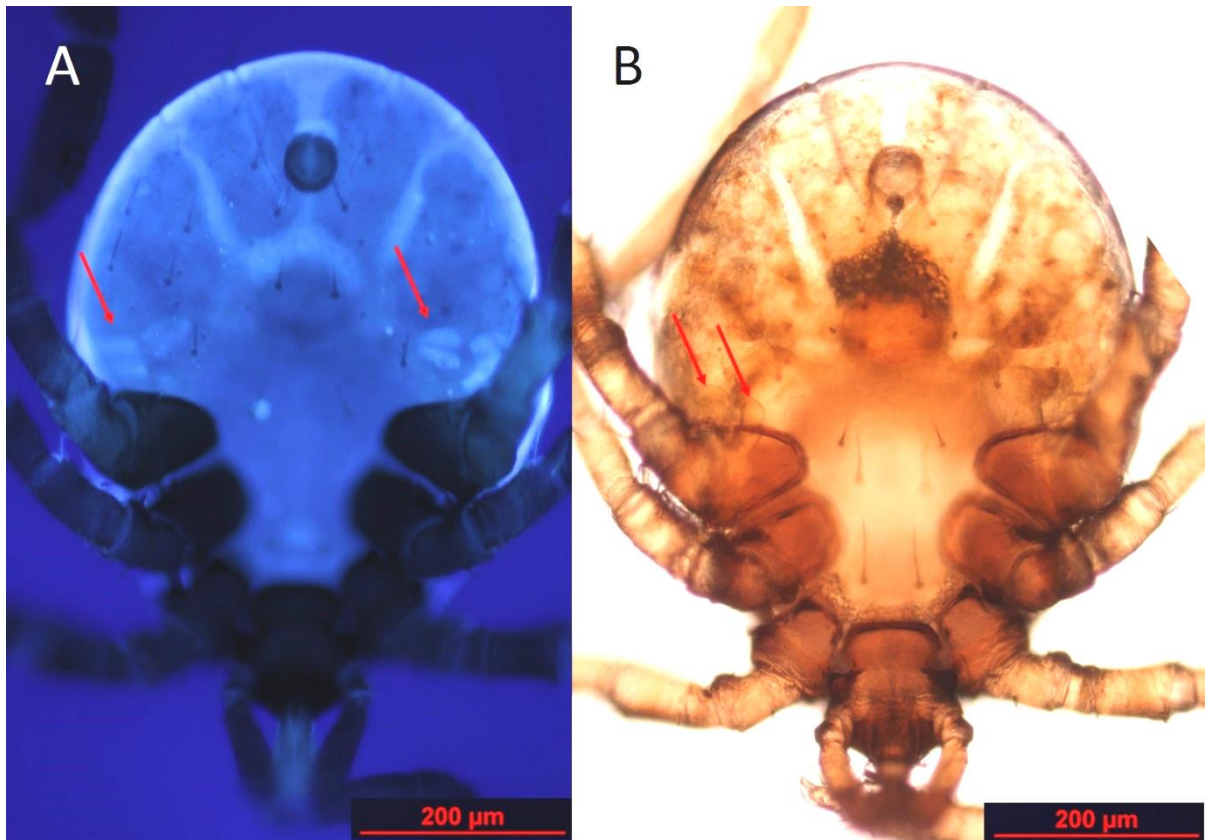


Obrázek 12: Vnitřní struktura vajíčka z Obr. 11 označeného A. (A1) a (A2) filtr pro DyLight 549, (A2) proloženo s Nomarskiho kontrastem. (B1) a (B2) detail s označeným signálem pocházející z plasmatické membrány. Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Měřítka 30/80  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 13: Larva *I. ricinus* (dorsální pohled) pocházející z vajíčka samice krmené *in vitro* krví s ManNAz o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . A proloženo Nomarskiho kontrastem. B filtr pro DyLight 549 a DAPI. Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Modrá: DAPI. Měřítka 200  $\mu\text{m}$ .

Pro identifikaci specifického signálu z larválních útvarů (viz Obr. 13) byly zhotoveny fotografie larev na mikroskopu Olympus BX-60. Larvy byly před mikroskopováním zafixovány 4% formaldehydem. Pravděpodobný zdroj signálu byl identifikován a označen viz Obr. 14 (fotografie (B) pořízená pod světelným mikroskopem, fotografie (A) pořízena pod DAPI filtrem).



Obrázek 14: Ventrální pohled na larvu *I. ricinus*. (A) fotografie přes DAPI filtr. (B) fotografie pod světelnou fází. Měřitko 200 µm.

### **5.3 Detekce značených sérových glykoproteinů v buňkách IRE/CTVM19 pomocí WB a FM**

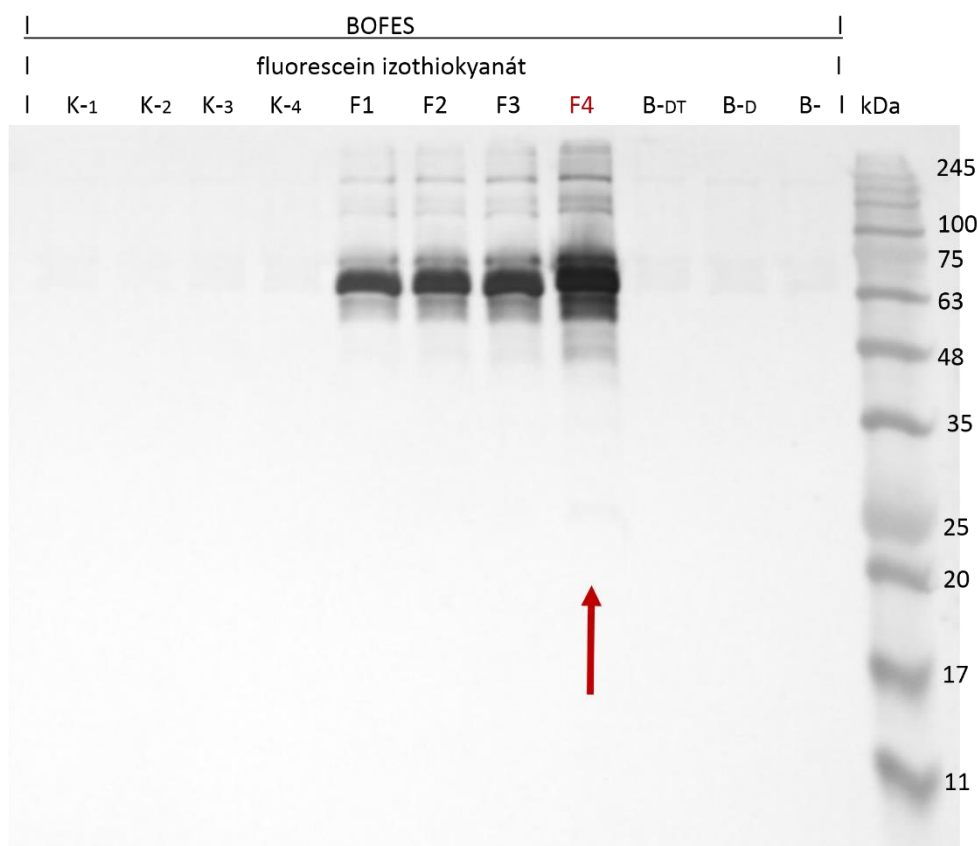
Telecí sérum bylo naznačeno pomocí fluoresceinu a Alexy Fluor® 488 zvláště i zároveň na glykanové (na kyselině sialové) a proteinové části. Pro optimalizaci koncentrace značící látky a odhalení případného vlivu doprovodných chemických a fyzikálních vlivů se značením spjatých byly provedeny pilotní reakce – optimalizace byla vykonána pro jednotlivé značící chemikálie a vliv na sérum byl sledován jak pomocí Western blotu, tak pomocí Coomassie blue barvení. Reakce byly optimalizovány tak, aby séra byla naznačena stejným množstvím fluoresceinu a Alexy na obou jednotlivých částech. Zásobní roztoky všech značících látek obsahovaly DMSO jako rozpouštědlo. Na základě pokusů byly stanoveny optimální koncentrace značidel a vyloučen negativní efekt teploty, rozpouštědel.

Testována byla také trypsinizace (0,25% trypsin po 10 minut) povrchu těchto buněk (viz Obr. 16-B) a výměna značeného média za čisté 3 dny před zhotovením lyzátu buněk (viz Obr. 16-A), kvůli možnému zachytávání se značených glykoproteinů na vnější straně membrány buněk a tedy následnému ovlivnění výsledků, kdy náš záměr byl detekovat pouze ty glykoproteiny, které pronikly dovnitř buněk.

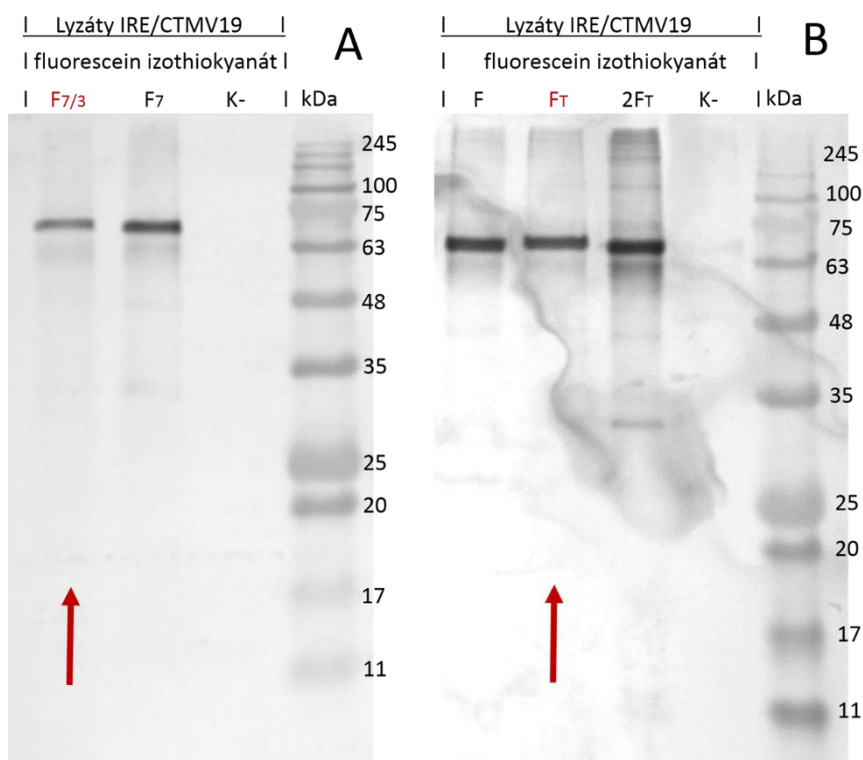
Obrázek 15 znázorňuje efektivitu značení proteinové kostry sérových glykoproteinů pomocí fluorescein izothiokyanátu. Zvýrazněná je koncentrace použitá v následném experimentu, kdy bylo toto značené sérum přidáno do média k buňkám. Odpovídá 1 mg FITC na 5 mg proteinu. Je zde také podrobně zkoumána nezávadnost přidávaných látek, tedy DMSO jakožto rozpouštědla, a TRISu, který byl použit díky obsahu NH<sub>2</sub> skupin, jež vyvázaly nezreagované molekuly FITC, jež by mohly značit povrch buněk při kultivaci. V vzorků B-, B-D, B-DT byl zkoumán vliv přidaného DMSO a TRISu odpovídajícímu množství použitému v jamce F4 (vyznačené), kde bylo použito největší množství fluorescein izothiokyanátu. Označení B- odpovídá neupravenému séru, B-D zastupuje sérum, s kterým bylo pracováno stejně jako s naznačeným, ovšem bylo zde přidáno pouze DMSO, a označení B-DT odpovídá séru zpracovanému identickým postupem jako sérum F4 (tedy použití DMSO, TRIS), pouze bez fluoresceinu. Vzorky K-1 až K-4 odpovídají potom také negativním kontrolám, zpracovaných identickým způsobem jako F1 až F4, kde bylo ovšem přidáváno množství DMSO odpovídající množství roztoku FITC pro toto značení použitých. Na značení 5 mg proteinu bylo postupně použito 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2



mg a 1 mg FITC (zásobní roztok FITC byl koncentrováný 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , rozpouštědlo DMSO). V případech ostatních značidel byly již, na základě tohoto experimentu, který negativní účinky se značením spjatých vyloučil, negativní kontroly prováděny pouze s množstvími doprovodných chemikálií odpovídajících nejvyšším koncentracem značidel.

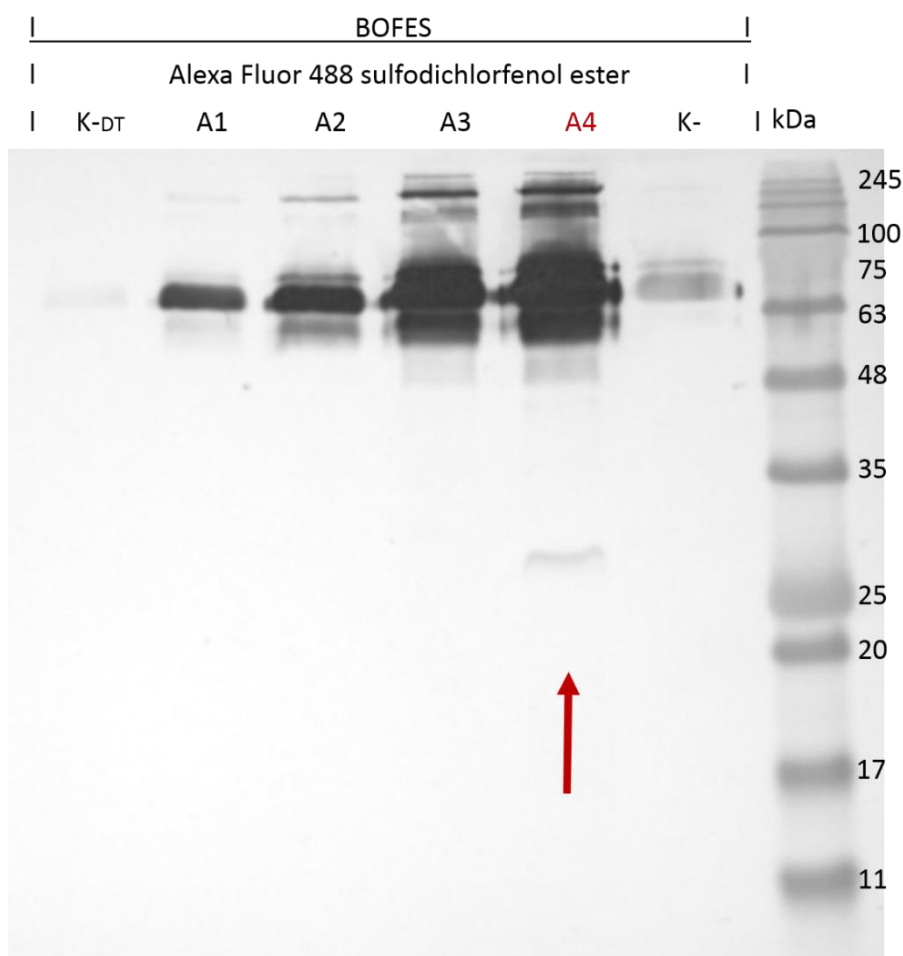


Obrázek 15: Testování účinku různých množství FITC při značení sérových glykoproteinů. Vzorky F1-F4 představují séra značená různým množstvím FITC, tomu odpovídající negativní kontroly K-1-K-2, místo FITC přidáno pouze rozpouštědlo DMSO. Vyznačený vzorek odpovídá koncentraci použité v následujících experimentech (1 mg FITC na 5 mg proteinu). B- značí neupravené sérum, B-D sérum s DMSO, B-DT sérum s DMSO a TRIS. Detekce pomocí alkalické fosfatázy.



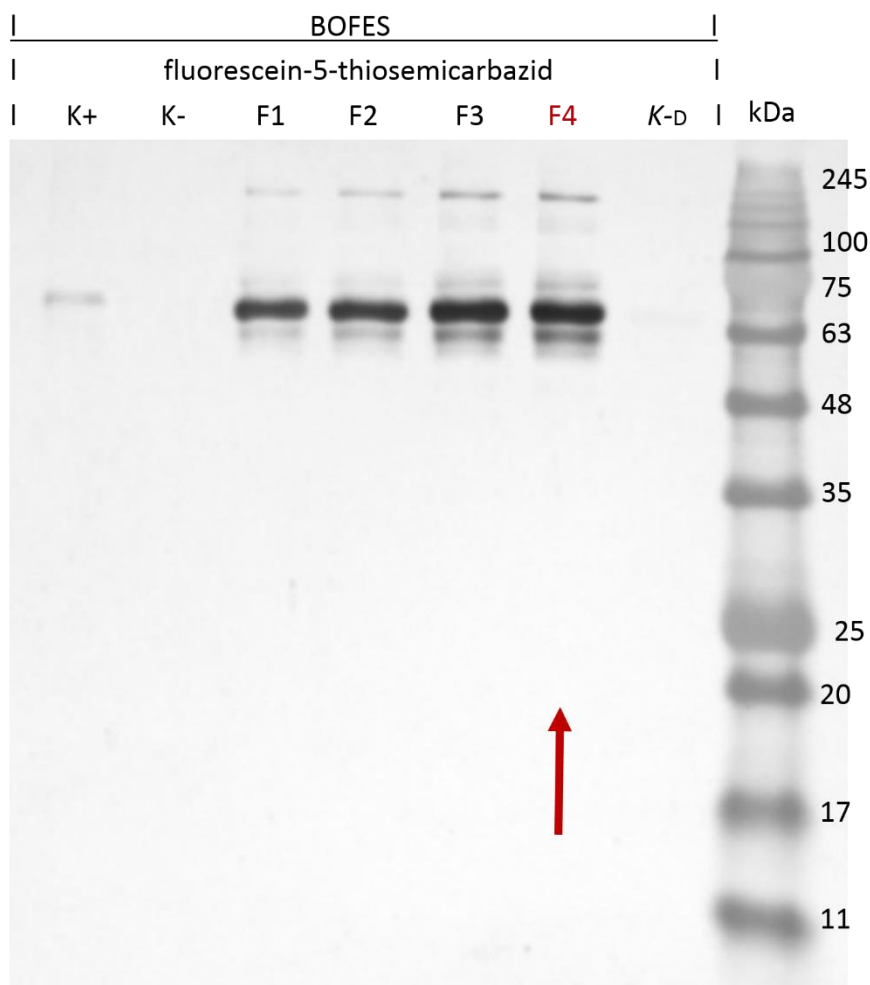
Obrázek 16: (A) Testování vlivu třech dní kultivace buněk IRE/CTVM 19 bez značených sérových glykoproteinů na detekci FITC značených sérových glykoproteinů. F7 lyzát buněk kultivovaných s FITC značenými sérovými glykoproteiny po dobu 7 dní. F7/3 buňky kultivované s FITC značeným sérem po dobu 7 dní a 3 dny bez značeného séra (zvýrazněno). K- negativní kontrola, lyzát buněk bez značeného séra. (B) Testování zda detekované značené glykoproteiny nepocházejí z vnější membrány, ale skutečně z vnitřních prostor buněk. F značí lyzát buněk kultivovaných 7 dní s FITC značenými sérovými glykoproteiny, Ft je lyzát těchto buněk po trypsinizaci, 2Ft dvojnásobné množství tohoto lyzátu, K- negativní kontrola, stejná jako v případě (A). Detekce alkalickou fosfatázou.

Obrázek 17 znázorňuje efektivitu značení proteinové části sérových glykoproteinů pomocí Alexy Fluor® 488 sulfodichlorfenol esteru. Vzorky A1 – A4 obsahují značená séra různými množstvími Alexy na 1000 µg sérových proteinů (A1 odpovídá 0,5 µg, A2 5 µg, A3 25 µg, A4 50 µg), K- znázorňuje nezpracované sérum, K-DT potom negativní kontrolu zpracovanou identickým způsobem jako značené sérum A4 (označené). Zvýrazněná je koncentrace použitá v následujícím experimentu, tedy 50 µg Alexy na 1000 µg sérových proteinů, kdy bylo takto značené sérum přidáno do média k buňkám. Odpovídá 1 mg Alexy na 20 mg proteinu.



Obrázek 17: Testování různých množství Alexy Fluor® 488 sulfodichlorfenol esteru při značení sérových glykoproteinů. Vzorky A1-A4 představují jednotlivá séra značená různými množstvími Alexy, negativní kontrola K-DT s použitým DMSO, odpovídající objemu značícího roztoku (tedy 50 µg na 1000 µg proteinů), použité ve vzorku A4 (zvýrazněno). To bylo následně použito pro živý pokus s buňkami. K- představuje druhou negativní kontrolu, nezpracované sérum. Detekce pomocí alkalické fosfatázy.

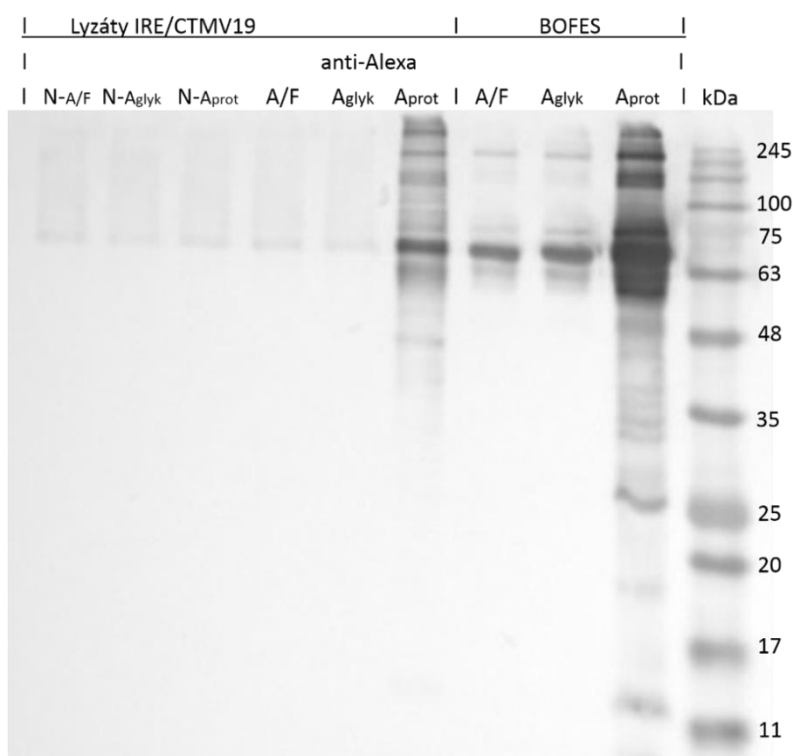
Obrázek 18 znázorňuje efektivitu značení glykanové části glykoproteinů, a to pomocí fluorescein-5-thiosemicarbazidu. Vzorky F1 až F4 odpovídají sérum značeným postupně jinými množstvími fluoresceinu. 100  $\mu$ l séra bylo značeno: 1,5  $\mu$ l 1,25 mM roztoku fluoresceinu (odpovídá F1), 1,5  $\mu$ l 2,5 mM (F2), 1,5  $\mu$ l 5 mM (F3) a 1,5  $\mu$ l 10 mM (F4). Zvýrazněný vzorek (F4) odpovídá poměru značícího roztoku Alexy k séru použitého pro naznačení séra pro experiment s inkubací značeného séra s buňkami.



Obrázek 18: Testování různých množství fluorescein-5-thiosemicarbazidu při značení sérových glykoproteinů. Vzorky F1-F4 představují jednotlivá séra značená různými množstvími fluoresceinu, negativní kontrola K-D (DMSO a TRIS), K- (neopracované sérum) a pozitivní kontrola představující lyzát buněk kultivovaných s FITC značeným sérem. Zvýrazněný vzorek F4 (1,5  $\mu$ l 10 mM roztoku fluoresceinu na 100  $\mu$ l séra) byl použitý pro kultivaci s buňkami. Detekce pomocí alkalické fosfatázy.

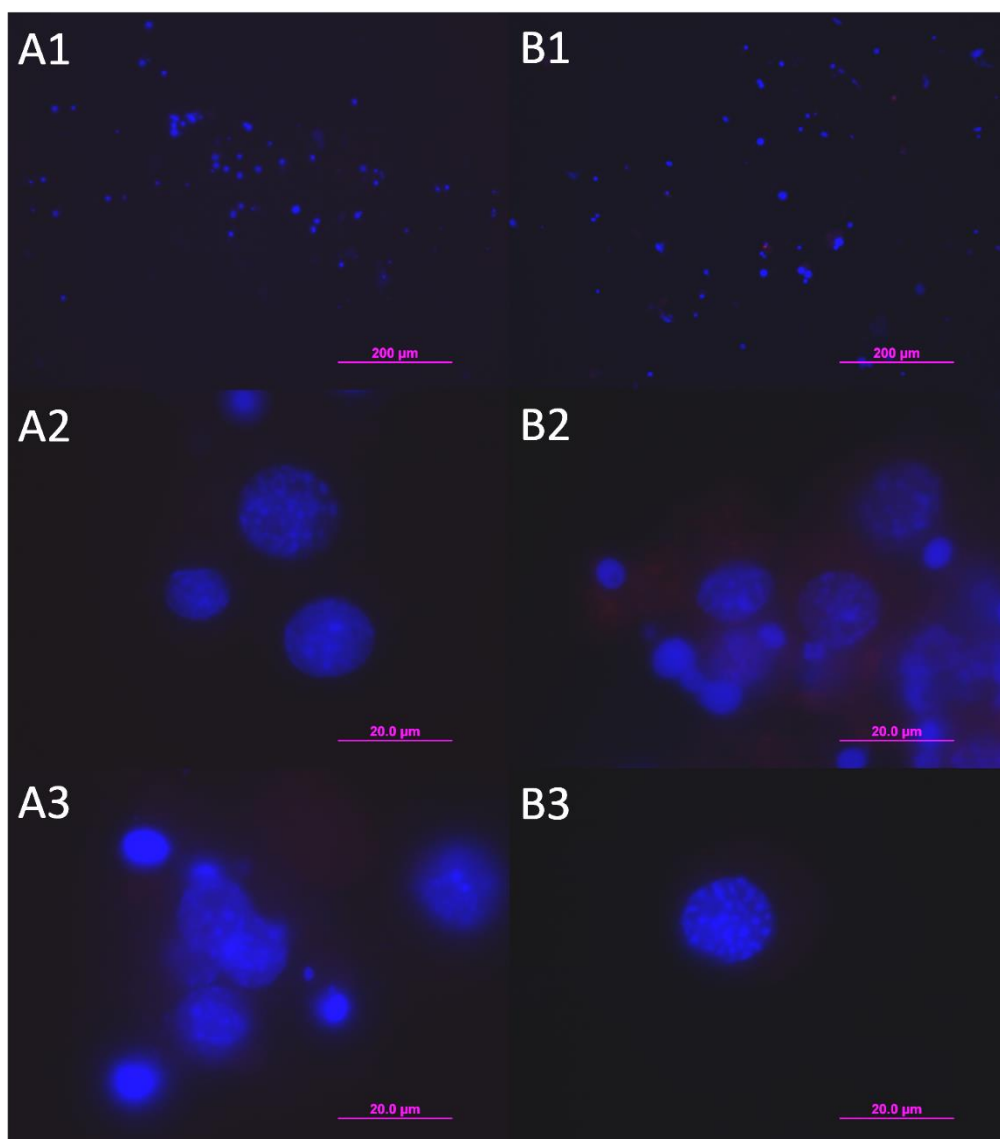
V případě značení glykoproteinů pomocí Alexy Fluor® 488 hydroxylaminu bylo značeno 100 µl séra pomocí 1,5 µl 10 mM roztoku Alexy, stejně jako v případě fluorescein-5-thiosemicarbazidu. Efektivita tohoto postupu byla experimentálně ověřena Western blotem. Ve všech případech byly buňky kultivovány s přidavkem 2% celkového objemu značeného séra (4 ml média + 80 µl značeného séra) po dobu sedmi dnů se značenými sérovými glykoproteiny, a následně tři dnů bez značených sérových glykoproteinů. Lyzáty byly zhotoveny identickým způsobem.

Obrázky 19 a 21 znázorňují lyzáty buněk IRE/CTVM19 kultivovaných se značenými séry, a tato jednotlivá séra. Na Obrázku 19 je detekována Alexa (primární protilátka anti-Alexa, sekundární anti-králičí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou), na Obrázku 21 fluorescein (primární protilátka kozí anti-fluorescein, sekundární anti-kozí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou). Negativní kontroly odpovídají příslušným kultivačním reakcím, přičemž byly připravovány identickým způsobem jako buňky se značeným sérem, ovšem místo značených sér byly použity negativní kontroly těchto sér.

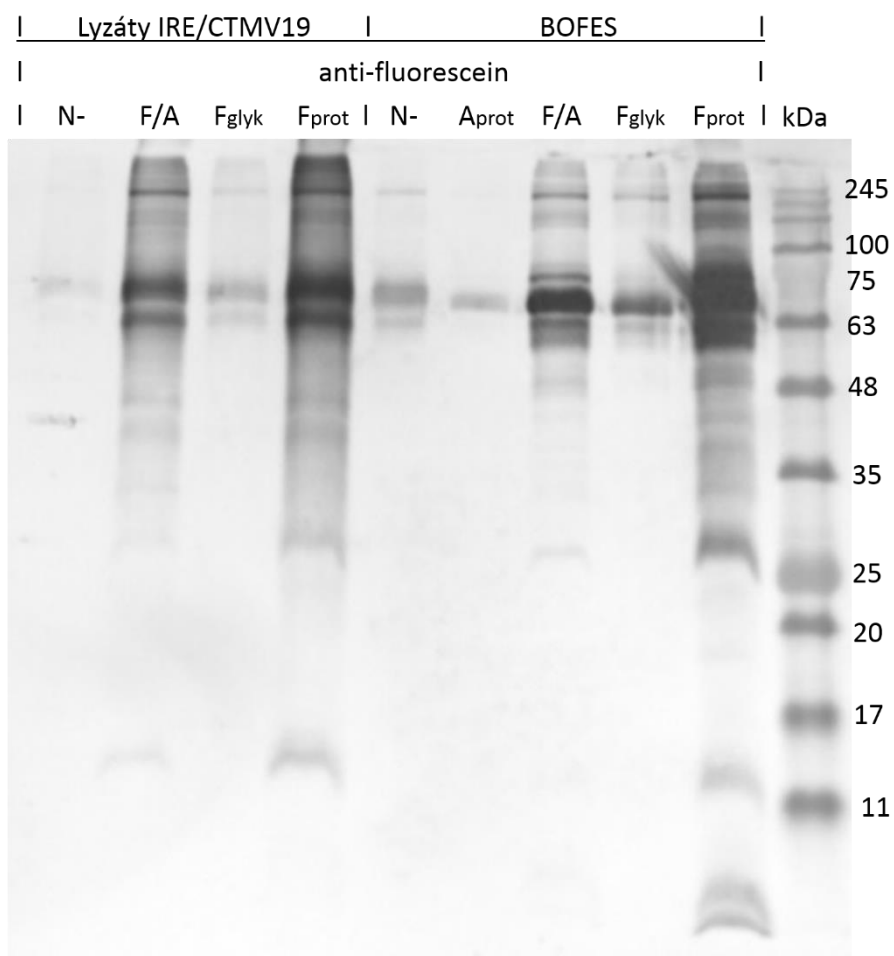


Obrázek 19: Lyzáty buněk kultivovaných se značenými sérovými glykoproteiny a tyto jednotlivé sérové glykoproteiny, detekce pomocí anti-Alexa protilátky. Apröt – Alexa navázaná na proteinové kostře glykoproteinů, Aglyk – Alexa navázaná na glykanové části glykoproteinů, A/F Alexa navázaná na glykanové části a fluorescein na proteinové. N-Aprot, N-Aglyk, N-A/F odpovídají jednotlivým negativním kontrolním reakcím. Detekce alkalickou fosfatázou.

Na tomto místě byla provedena kontrola výsledků Western blotu pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky IRE/CTVM 19 kultivované 7 dní se sérovými glykoproteiny značenými Alexou jednotlivě v glykanové a proteinové části byly následně 3 dny kultivovány čerstvého média bez značených glykoproteinů. Buňky kultivované s glykoproteiny značenými Alexou na glykanové části a buňky kontrolní, tedy bez značeného séra, zobrazuje Obrázek 20. Kvůli potížím s kultivací těchto buněk byl tento experiment několikrát opakován, i přes tuto snahu se nepodařilo získat kvalitní obrázky buněk v případě značeného séra v proteinové části.



Obrázek 20: Buňky IRE/CTVM 19 kultivované s Alexou značeným sérem na glykanové části glykoproteinů (B1-B3). Kontrolní buňky (A1-A3). Červená: Alexa Fluor® Hydroxylamin. Modrá: DAPI. Měřítka: A1, B1 200 µm, A2, A3, B2, B3 20 µm.



Obrázek 21: Lyzáty buněk kultivovaných se značenými séry a tato jednotlivá séra detekce pomocí anti-fluorescein protilátky. F<sub>prot</sub> – fluorescein navázaný na proteinové kostře glykoproteinů, F<sub>glyk</sub> – fluorescein navázaný na glykanové části glykoproteinů, A/F dvojitě značenému séru s Alexou navázanou na glykanové části a fluoresceinem a proteinové kostře, A<sub>prot</sub> značí Alexu navázanou na proteinové části, N- negativní kontrola (lyzáty buněk bez značeného séra). Detekce alkalickou fosfatázou.

Z uvedených Obrázků 20 a 21 vyplývá, že ty glykoproteiny, které byly naznačeny v proteinové části byly buňkami internalizovány, ovšem ty glykoproteiny, které byly značeny v glykanové části, se do vnitřních prostor buněk nedostaly. V případě dvojitě značeného séra při detekci pomocí anti-fluoresceinu ovšem toto značené sérum bylo uvnitř buněk detekováno. Formulovali jsme hypotézu, že tyto detekované glykoproteiny jsou naznačené v proteinové části, ovšem v glykanové značení není kompletní. Pro zodpovězení této otázky byla provedena dvoudimenzionální elektroforéza námi použitých sér, která by

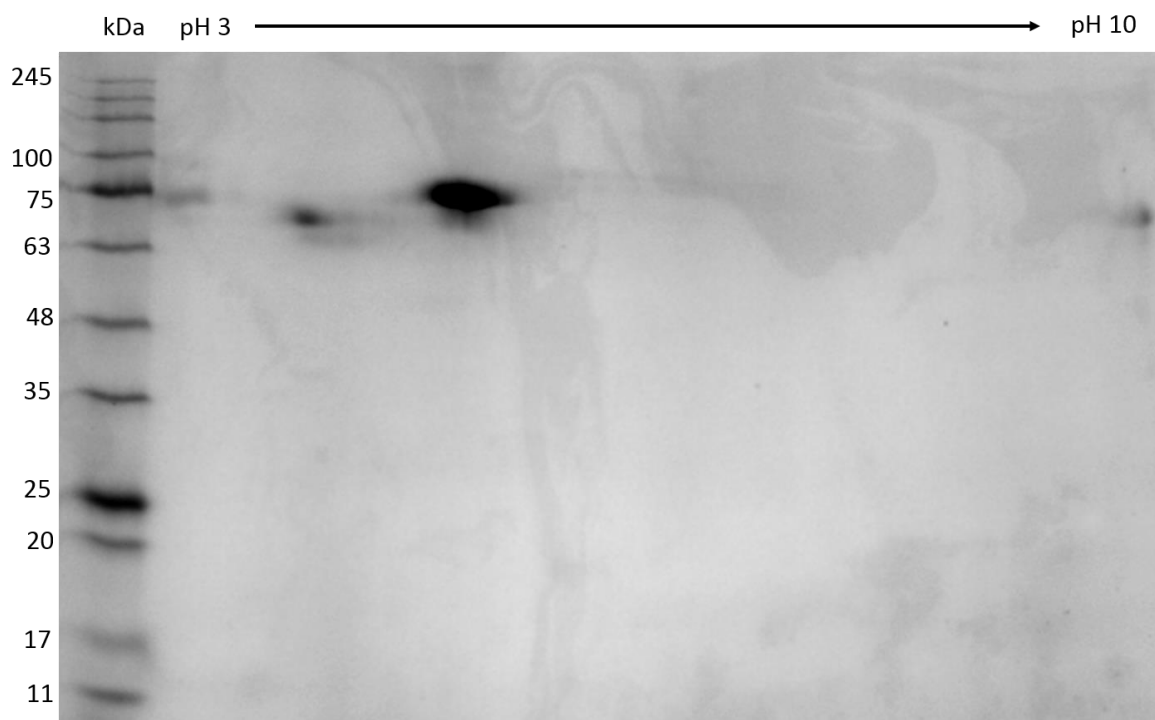
umožnila odlišení glykoproteinů bez značené kyseliny sialové (nezměněný náboj a tedy i pI hodnota) a se značenou kyselinou sialovou (pI je změněné a tedy i umístění proteinů na 2D gelu je odlišné).

## **5.4 Vizualizace značených sérových glykoproteinů pomocí 2D SDS-PAGE**

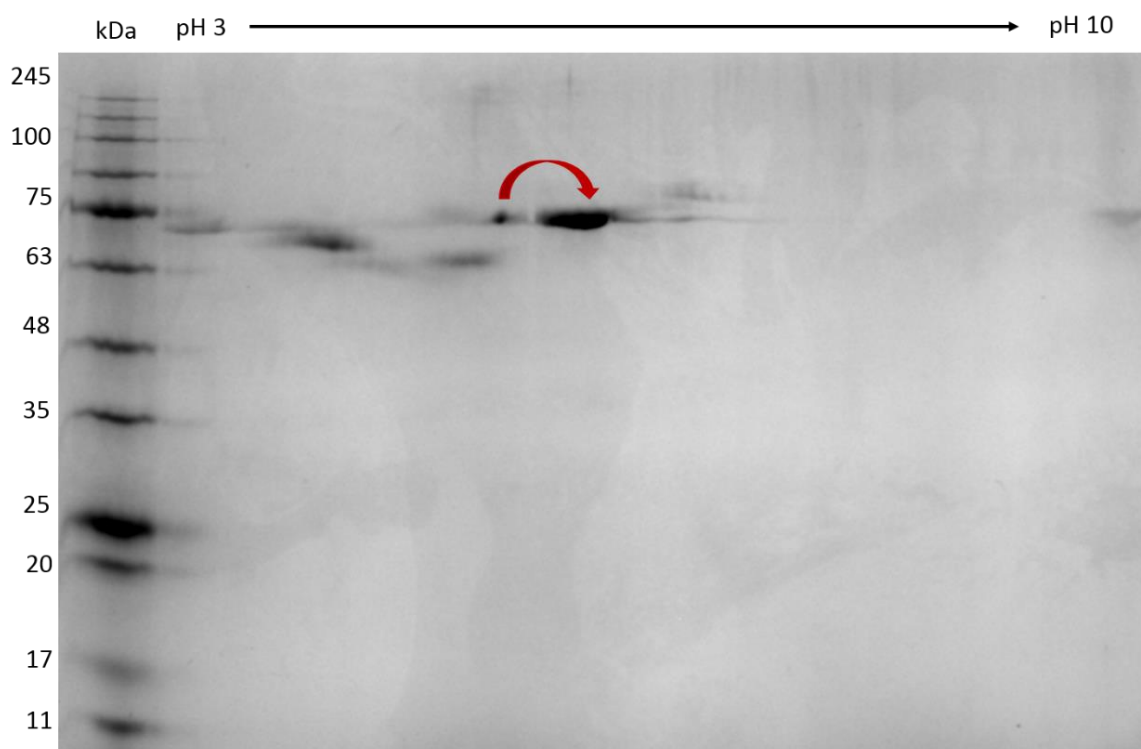
Na 2D SDS-PAGE bylo rozděleno stejné množství séra značeného pomocí FITC a dvojitě značeného séra, tedy pomocí FITC a následně značeného Alexou na kyselině sialové. Po elektroforéze byly gely obarveny pomocí Coomassie Blue (Obr. 22 a 23) anebo přebílotovány na membránu, kde byl detekován fluorescein pomocí anti-fluorescein protilátek v případě FITC značeného séra (vizv Obr. 24) a Alexa Fluor® 488 pomocí anti-Alexy v případě dvojitě značené séra (viz Obr. 25).

Z obrázků gelů obarvovaných Coomassie Blue (Obr. 22 a 23) je patrné, že po naznačení FITC séra Alexou došlo k posunu části signálu směrem do vyššího pH, což bylo způsobeno změnou náboje glykoproteinů v důsledku navázání Alexy na kyselinu sialovou (a vyrušení negativního náboje). Z rozdílu intenzity a rozmístění signálu v případě vizualizace pomocí protilátek je pravděpodobné, že je ve vzorku přítomno více navázaného fluoresceinu, než Alexy, což je v souladu se skutečností, že glykoproteiny obsahují nesrovnatelně více  $\text{NH}_2$  skupin, než kyseliny sialové. Výsledky tedy naznačují, že značení kyseliny sialové pomocí Alexy skutečně nebylo úplné a v séru se nacházely FITC značené proteiny s nemodifikovanou kyselinou sialovou.

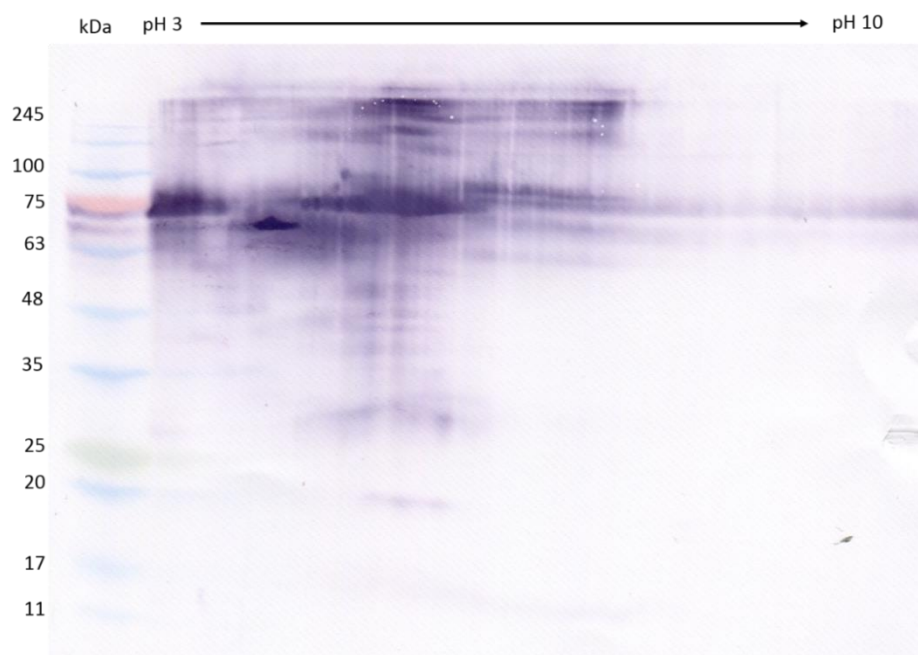




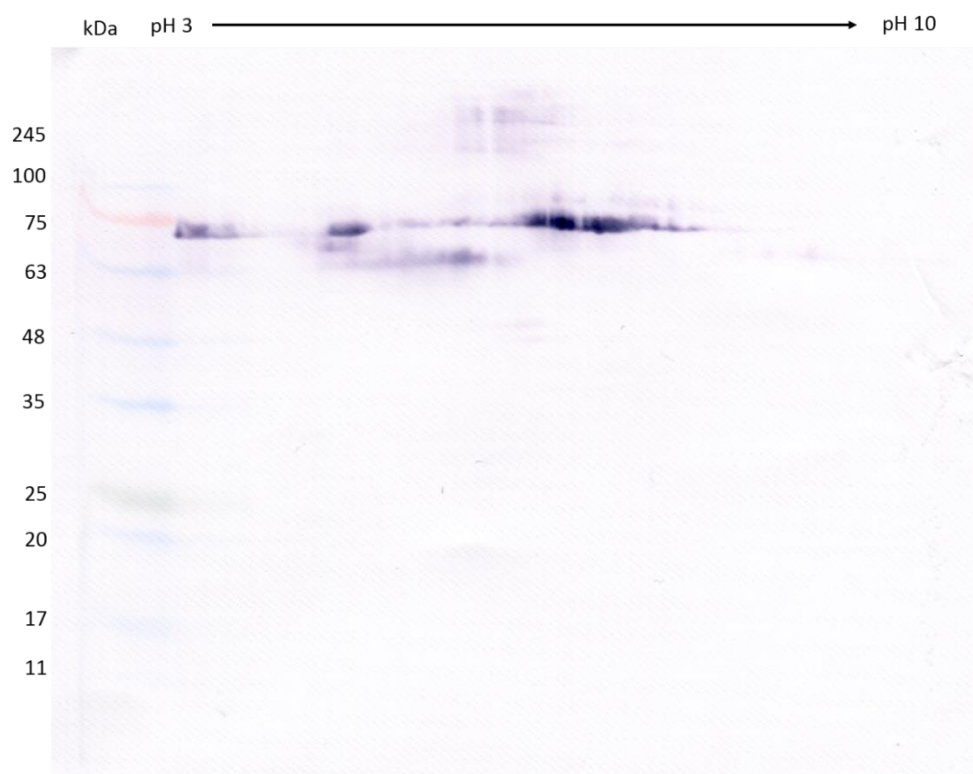
Obrázek 22: Dvoudimenzionální SDS-PAGE vizualizace FITC značeného séra pomocí Coomassie Blue.



Obrázek 23: Dvoudimenzionální SDS-PAGE dvojité značeného séra vizualizovaného pomocí Coomassie Blue. Znázorněný posun signálu oproti séru značeného pouze FITC (viz Obr. 22).



Obrázek 24: Dvoudimenzionální SDS-PAGE vizualizace FITC značeného séra pomocí anti-fluorescein protilátek. Detekce alkalickou fosfatázou.



Obrázek 25: Dvoudimenzionální SDS-PAGE dvojitě značeného séra vizualizovaného pomocí anti-Alexa protilátek. Detekce alkalickou fosfatázou.

## 6 Diskuze

Klíště *Ixodes ricinus* se vyskytuje na velkém území České republiky. Zde dochází v poslední době k rozšiřování těchto klíšťat i do oblastí, kde ještě před několika desítkami let klíšťata nebyla pozorována (<sup>4</sup>, <sup>6</sup>), a tím pádem i ke zvětšení území, na kterém jsou jak lidé, tak divoká i hospodářská zvířata těmito krev sajícími parazity ohrožena. Klíšťata jsou vektory patogenních mikroorganismů, které způsobují závažná onemocnění. Pro umožnění vývoje nových způsobů zásahu do životního cyklu těchto parazitů je nutné porozumět na molekulární úrovni úloze jednotlivých částí komplexního systému parazit-patogen-hostitel, a právě z tohoto důvodu zde byla studována role sialovaných glykoproteinů pocházejících z metabolismu klíštěte i hostitele pro klíště *I. ricinus*.

### 6.1 Sialované glykoproteiny pocházející z metabolismu klíštěte se účastní embryogeneze

Tato část práce navazovala na dřívější výzkum kyseliny sialové v klíštěti *I. ricinus*. Sia byla v tomto organismu byla detekována již v roce 2006 v buňkách slinných žláz, a to pomocí lektinů SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) a MAA II (*Maackia amurensis* agglutinin II), které rozeznávají Sia ve vazbách  $\alpha$ 2,3- (MAA II i SNA) a  $\alpha$ 2,6- (SNA) (<sup>153</sup>). Přítomnost Sia zde byla později potvrzena jak ve slinných žlázách (nikoli samotných slinách) tak střevě pomocí Western blotu i hmotnostní spektrometrie (<sup>154</sup>). Těmito metodami ovšem nelze určit původ sialovaných glykoproteinů, tedy zda byly tyto molekuly vytvořeny klíštětem, nebo hostitelem. Z několika důvodů je možné ovšem usoudit na hostitelský původ. Prvním je, že zdrojem potravy pro klíšťata je krev savců, která obsahuje velké množství sialovaných glykoproteinů, které mohou v klíštěti přetrvávat po velice dlouhou dobu (<sup>172</sup>). To je zapříčiněno charakteristickým trávením klíšťat, které probíhá postupně, tedy dlouhou dobu po nasátí a poskytuje klíšťatům obecně velkou odolnost vůči hladovění (<sup>3</sup>). Druhým důvodem je, že dle *N*-glykomu MS identifikovaných *N*-glykanů mají zde identifikované sialované glykany dvě, nebo tři antény, kde je Sia navázaná v terminálních oblastech na galaktóze (<sup>154</sup>), díky čemuž spadají do skupin hybridních a komplexních *N*-glykanů, charakteristických pro obratlovce. Na tyto studie

navazuje práce z roku 2014, která si za cíl stanovila objasnit původ sialovaných glykoproteinů<sup>(155)</sup>. Byla zde kvantifikována a porovnána veškerá Sia přítomná v klíštěti a Sia metabolicky vytvořená, značená bioortogonálně. Dle výsledků této studie je většina kyseliny sialové přítomné v klíštěti hostitelského původu, nicméně malé množství sialovaných glykoproteinů vytvořených metabolismem klíštěte bylo detekováno ve slinných žlázách a ovariích<sup>(155)</sup>.

Pro odlišení klíštětem vytvořených glykoproteinů bylo v této práci použito stejného principu, a to detekce na základě bioortogonálně značeného prekurzoru. Využitím tohoto přístupu se lze vyhnout několika doprovodným efektům<sup>(173)</sup>, které mohou vzniknout odstraněním Sia, ať už zapříčiněného mutací sialyltransferáz, či odštěpováním sialidázou. Tím je například zbavení buňky negativního náboje, který Sia poskytuje, či odhalení glykanových residuí na kterých je kyselina sialová lokalizována v terminálních pozicích.

Zvoleným způsobem studia je proto využití zmiňované bioortogonální chemie, kdy byl použit označený prekurzor kyseliny sialové malou nereaktivní (azidovou) skupinou (ManNAz) k tomu, aby byl tento prekurzor příslušnými enzymy klíšťat zapracován do metabolicky vytvořených glykoproteinů. Tím bylo možné odlišit sialované glykoproteiny pocházející z hostitele od sialovaných glykoproteinů pocházejících z metabolismu klíštěte<sup>(159)</sup>. ManNAz již byl pro detekci sialovaných glykanů využit dříve<sup>(155, 174)</sup>, stejně jako jiné prekurzory<sup>(175, 176)</sup>, například *N*-levulinoylmannosamin<sup>(177)</sup>.

Pro tyto účely byly sestaveny krmící aparatury<sup>(80)</sup>, ve kterých byly samice *I. ricinus* skrze silikonovou membránu krmeny býčí krví obohacenou o ManNAz o výsledné koncentraci 1 a 10 µg/ml. Paralelně byl tento prekurzor o stejných koncentracích přidán k buňkám IRE/CTVM 19, derivovaných z embrya *I. ricinus*, které s ním byly kultivovány po dobu sedmi dnů. Tento modifikovaný prekurzor v klíštěcích buňkách kompetoval s analogickými nativními prekurzory (ManNAc, *N*-acetylmannosamin) biosyntetické dráhy sialovaných glykoproteinů, a byl metabolizován na NeuNAz (*N*-azido neuraminová kyselina). Ten byl využit k syntéze sialovaných glykoproteinů, které obsahovaly malou nereaktivní azidovou skupinu, pocházející z přidaného prekurzoru ManNAz. Ta byla následně spojena kovalentní vazbou přes triazolový kruh<sup>(160)</sup> pomocí 1,3-dipolární cykloadice (Click reakce) s Alexou disponující alkynovou skupinou. Alexa byla posléze detekována protilátkami.

Metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny byly detekovány v buňkách IRE/CTVM 19 a ve vajíčkách *I. ricinus* pomocí Western blotu (viz Obr. 6 - 9). Přítomnost těchto glykoproteinů v jednotlivých orgánech vykrmené samice nebylo možné pomocí WB jednoznačně určit (viz Obr. 6). Ve vajíčkách, která byla odebírána v různých časových odstupech po vykladení, byly klíštětem vytvořené sialované glykoproteiny detekovány, a také byla zaznamenána změna obsahu těchto glykoproteinů (viz Obr. 7 - 9), kdy v okamžiku vykladení vajíček byla největší, a do okamžiku vylíhnutí larev se postupně snižovala. Na základě toho se domníváme, že tyto glykoproteiny hrají určitou roli při embryogenezi.

Tento závěr je podpořen výsledky výzkumu sialovaných glykoproteinů u mouchy octomilky, hmyzu, který není hematofágní. Zde byla Sia detekována při embryonálním vývoji, kde má roli při vývoji neurálního systému (<sup>156</sup>). Sialyltransferáza je zde exprimovaná pouze v nervových tkáních (<sup>157</sup>). V případě vyšších organismů (savců) mají sialované glykoproteiny taktéž důležitou funkci v nervovém systému (<sup>116</sup>) a jejich obsah je zde větší, než v jiných typech tkání (<sup>178, 179</sup>). Nachází se zde ve formě polysialových řetězců ve vazbě  $\alpha 2,8$ - na NCAM (neural cell adhesion molecules), které zprostředkovávají mezibuněčné interakce, účastní se axonálních růstů a zprostředkovávají tvárnost a flexibilitu neuronů v centrální nervové soustavě (<sup>116</sup>). Přítomna je ovšem kyselina sialová i ve vazbách  $\alpha 2,3$ - a  $\alpha 2,6$ -, kdy se dále účastní rozvíjení komplexity mozku ale i jeho vývoje (<sup>180</sup>). Z důvodu existence těchto indicií, kdy se sialované glykoproteiny účastní dějů spjatých s neurálním systémem nejen ve vyspělých organismech, jako jsou savci, ale i klíštěti evolučně příbuznějšího organismu, mouchy octomilky, jsme provedli sérii experimentů pro objasnění možnosti role kyseliny sialové v neurálním systému klíštěte. Analýza sialovaných glykoproteinů pomocí MS není v tomto stavu možná, neboť srážení proteinů, nutné po získání proteinů po Click reakci, zabraňuje řádnému rozdělení proteinů při SDS-PAGE. Tento problém nebylo možné odstranit prodlužováním doby sonikace, vortexováním ani zředěním vzorku (data neukázána), či aplikací ultrafiltrace namísto srážení proteinů pomocí metanolu/chloroformu. Vliv srážení proteinů a ultrafiltrace na proteinový profil při SDS-PAGE viz Příloha 6, v tomto případě byly použity identické vzorky jako v experimentu zobrazeném na obrázku 9-A.

Pro zodpovězení otázky možného působení metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů při vývoji nervové soustavy byla provedena lokalizace těchto molekul pomocí 5  $\mu$ m tenkých kryořezů vajíček. Možnost využití takového postupu byla nejprve

otestována zhotovením 5 µm tenkých kryožezů buněk IRE/CTVM 19 značených azidohomoalaninem (viz Obr. 10), následnou Click reakcí a detekcí pomocí protilátek konjugovaných s fluorescenční značkou DyLight 549. Po úspěšném testu využití tohoto postupu byly zhotoveny 5 µm tenké řezy vajíček a 4 µm tenké řezy larvou. Ty byly značeny identickým postupem a signál pocházející z metabolicky vytvořených sialovaných glykoproteinů byl vizualizován pomocí konfokální mikroskopie (viz Obr. 11 - 13). Signál se zde nacházel podél membrán buněk a v mnoha neuspořádaných shlucích (viz Obr. 11, 12). V následujícím stádiu, tedy larvách, byl nalezen stejným způsobem specifický signál (viz Obr. 13, Přílohy 2 - 5), ovšem z důvodu neznámé anatomie larvy nebyl přiřazen k žádné struktuře, či nervovému systému. Na základě výsledků námi provedených experimentů nemůžeme potvrdit očekávanou podobnost s octomilkou a je tedy možné, že metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny ve vývoji nervové soustavy klíštěte *I. ricinus* na rozdíl od mnoha jiných druhů živočichů (<sup>156</sup>, <sup>116</sup>) žádnou úlohu nemají a jejich funkce v embryogenezi prozatím zůstává neznámá.

## **6.2 Sérové glykoproteiny hostitele jsou buňkami IRE/CTVM 19 rozeznávány na základě jejich glykanové části**

V krevním séru hostitele se nachází velké množství sialovaných glykoproteinů (<sup>121</sup>), které představují značnou část potravy. Pro objasnění vlivu kyseliny sialové nacházející se na hostitelových sérových glykoproteinech bylo použito buněk IRE/CTVM 19 (<sup>181</sup>). Pro kultivaci těchto buněk je využíváno médium, které obsahuje 20% telecího séra, jež je zdrojem živin a stavebních látek. Pro objasnění role kyseliny sialové v příjmu sérových glykoproteinů byly tyto glykoproteiny značeny dvěma odlišnými molekulami, Alexou Fluor® 488 a fluoresceinem, a to jednotlivě na kyselině sialové (tedy glykanové části) a proteinové části. Bylo zhotoveno i sérum, kde byly glykoproteiny značené současně na proteinové kostře i na kyselině sialové.

Pro značení kyseliny sialové bylo použito Alexa Fluor® 488 hydroxylaminu a fluorescein-5-thiosemicarbazidu. Princip značení spočíval ve vytvoření aldehydových skupin na kyselině sialové pomocí oxidace jodistanem sodným (<sup>182</sup>), které následně umožnily kovalentní navázání Alexy a fluoresceinu. Značení proteinové kostry glykoproteinů bylo uskutečněno Alexa Fluor® 488 sulfodichlorophenol esterem a fluorescein-5-

isothiokyanátem. Tyto molekuly byly navázány na volné aminové skupiny glykoproteinů (přehled struktur použitých molekul pro značení jak kyseliny sialové, tak proteinové kostry viz Příloha 7). Pro každé značení byly provedeny optimalizační reakce pro zjištění vhodného množství značící látky. Za účelem zajištění detekce pouze těch glykoproteinů, které se dostaly do vnitřních prostor buněk byly provedeny trypsinizační reakce a výměna média za čerstvé neobsahující značené glykoproteiny 3 dny před zhotovením lyzátu (po 7 dnech kultivace se značenými glykoproteiny).

Značené sérové glykoproteiny byly kultivovány s buňkami IRE/CTVM19 (ve všech případech byly buňky kultivovány s příměsí 2% celkového objemu média se značenými séry). Následně byly značené glykoproteiny detekovány pomocí Western blotu a fluorescenční mikroskopie. Díky centrifugaci, promývání, trypsinizaci buněk a ponecháním buněk po určitý časový interval v absenci značených sér byly detekovány pouze ty značené glykoproteiny, které se nacházely ve vnitřním prostředí buněk, ale nikoli ve vnějším prostoru, či zachycené na vnější straně membrány buněk.

Membránou buněk pronikaly pouze ty glykoproteiny, které byly značené na proteinové kostře glykoproteinů (viz Obr. 19 a 21). Stejněho výsledku bylo dosaženo v případě značení dvěma odlišnými molekulami, Alexou Fluor® 488 a fluoresceinem. V případě, že se značící molekula nacházela na kyselině sialové (glykanové části) nebyly detekovány v buňkách žádné značené glykoproteiny (viz Obr. 19 a 21). Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že se buňky při přijímání glykoproteinů orientují podle glykanové struktury glykoproteinů, a v případě pozměnění této glykanové struktury nedokáží glykoproteiny identifikovat. Výsledky dosažené pomocí Western blotu byly v případě buněk kultivovaných s Alexou na glykanové části ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie (viz Obr. 20).

Původ signálu detekovaného anti-fluoresceinovými protilátkami v případě dvojité značeného séra fluoresceinem na proteinové a Alexou na glykanové části byl vysvětlen rozdělením glykoproteinů pomocí dvoudimenzionální SDS-PAGE. Jak je patrné ze skenů membrán (Obr. 24 pro FITC značené sérum, Obr. 25 pro dvojité značené sérum) a fotografií gelů barvených pomocí Coomassie Blue (Obr. 22 pro FITC značené sérum, Obr. 23 pro dvojité značené sérum), při navázání Alexy na kyselinu sialovou a tedy snížení negativního náboje sialovaných FITC značených glykoproteinů dochází k posunu glykanů směrem do vyššího pH, ovšem k tomuto posunu došlo pouze u části glykoproteinů, z čehož

usuzujeme, že pouze část glykoproteinů byla Alexou naznačena. V buňkách byly tedy detekovány ty glykoproteiny, které byly naznačeny fluoresceinem na proteinové části, avšak jejich glykanová část zůstala nedotčena. Glykoproteiny s poškozenou/neznámou glykanovou strukturou tedy nejsou rozeznány, internalizovány do vnitrobuněčných prostor a dále využívány.

Na základě těchto experimentů provedených na modelu klíštěcích buněk IRE/CTVM 19 se domníváme, že sérové glykoproteiny jsou klíštětem rozeznávány na základě glykanové struktury.



## 7 Závěr

Úspěšně byl proveden *in vitro* feeding samic *Ixodes ricinus* krví s přídavkem bioortogonálně značeného ManNAz, tedy prekursoru kyseliny sialové obsahujícího azidovou skupinu. Klíštětem byly posléze metabolicky vytvořeny sialované glykoproteiny, které byly značeny pomocí Click reakce a následně detekovány za využití Western blotu a fluorescenční/konfokální mikroskopie.

Bylo dokázáno, že klíště *I. ricinus* vytváří vlastní sialované glykoproteiny, které se účastní embryogeneze ve vajíčku. Zde byly tyto molekuly lokalizovány konfokální mikroskopií v plasmatických membránách buněk. Ve stádiu larvy byly tyto molekuly také detekovány a lokalizovány, ovšem z důvodu nedostatku anatomických podkladů nebylo možné určit orgán výskytu těchto molekul, nebo jejich funkci.

V druhé části práce byl pomocí značení sérových glykoproteinů dvěma různými molekulami (fluoresceinem a Alexou Fluor® 488) zkoumán význam kyseliny sialové hostitelových glykoproteinů pro klíště, respektive rozpoznávání hostitelových sérových glykoproteinů klíštětem na modelu buněk derivovaných z embrya *I. ricinus* IRE/CTVM 19. Na základě provedených výsledků se domníváme, že kyselina sialová, potažmo glykanová část glykoproteinů je rozpovědná za rozeznání těchto molekul klíštěcími buňkami a tedy jejich využívání klíštětem.

## 8 Použité zkratky

2D SDS-PAGE	dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
AA	akrylamid
ADP	adenosindifosfát
AHA	L-Azidohomoalanin
AMP	adenosinmonofosfát
AP	"alkaline phosphatase" alkalická fosfatáza
APS	"amonium persulfate" peroxosíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCA	"bicinchoninic acid assay"
BCIP/NBT	"5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium"
BSA	"bovine serum albumin"
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CHAPS	"3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate"
CMP-Neu5Ac	cytidine-5-monofosfo-N-Acetylneuraminová kyselina
DAPI	2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
EP I	equilibrizační pufr I
EP II	equilibrizační pufr II
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin

GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GP Ib-IX-V	"glycoprotein Ib-IX-V"
GPI	glykosylfosfatidylinositol
IEF	izoelektrofokusační
IRE/CTVM19	označení linie buněk derivovaných z embrya <i>Ixodes ricinus</i>
kDa	kilodalton
m. n. m.	metrů nad mořem
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNAz	<i>N</i> -Azidoacetyl- <i>D</i> -Mannosamin
MT	Malpigické trubice
NCAM	„neural cell adhesion molecules“
OV	ovária
PBS	"phosphate buffered saline"
RT	"room temperature" pokojová teplota
SDS	sodiumdodecylsulfát
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
ST	střevo
SŽ	slinné žlázy
TCE	trichloretanol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyletan-1,2-diamin
TF	"tissue factor" tkáňový faktor
TF/fVIIa	komplex tkáňového faktoru a faktoru VIIa
TFPI	"tissue factor pathway inhibitor" inhibitor tkáňového faktoru

THPTA	"3,3',3''-(4,4',4''-(Nitrilotris(methylene))tris(1H-1,2,3-triazole-4,1-diyl))tris(propan-1-ol)"
TPB	"tryptose phosphate broth"
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UDP-GlcNAc	uridin-difosfát- <i>N</i> -Acetylglukosamin
vWF	von Willebrandův faktor
WB	"Western blot"

## 9 Citovaná literatura

1. Bowman AS, Nuttall PA (2008) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press.
2. Oliver JH (1989) Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, 397–430.
3. Sonenshine DE, Roe RM (2014) Biology of ticks Volume 1. Oxford University Press.
4. Daniel M (1993) Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in Central Europe. *Acarologia* 34, 105–113.
5. Daniel M, Danielová V, Kriz B, Jirsa A, Nozicka J (2003) Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 327–8.
6. Daniel M, Materna J, Honig V, Grubhoffer L (2009) Vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne pathogens in the northern moravian mountains correlated with climate warming (Jeseniky MTS Czech Republic). *Cent. Eur. J. Public Health* 17, 139–145.
7. Baêta BA, Ribeiro CC, Teixeira RC, Cabezas-Cruz A, Passos LM, Zwegarth E, Fonseca A (2015) Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 141–145.
8. Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PH, León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150–6.
9. Jongejan F, Uilenberg G (1994) Ticks and control methods. *Rev. Sci. Tech.* 13, 1201–26.
10. Kim TK, Tirloni L, Pinto AF, Moresco J, Yates JR, da Silva Vaz I, Mulenga A (2016) *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004323.

11. Rizzoli A, Rosà R, Mantelli B, Pecchioli E, Hauffe H, Tagliapietra V, Beninati T, Neteler M, Genchi C (2014) *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs. *Parassitologia* 46, 119–22.
12. de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan K M, Sonenshine DE (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13, 6938–46.
13. Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS (2008) Surveillance for Lyme disease - United States, 1992–2006. *MMWR Surveill. Summ.* 57, 1–9.
14. Piesman J (1989) Transmission of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Exp. Appl. Acarol.* 7, 71–80.
15. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME (2009) *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* 40, 7.
16. Anderson BE, Sims KG, Olson JG, Childs JE, Piesman JF, Happ CM, Maupin GO, Johnson BJ (1993) *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 239–44.
17. Payne RC, Scott JM (1982) Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* 14, 75–80.
18. Kleine-Tebbe J, Herold D, Dautel H, Vater G, Heinatz A, Schroder I, Haut A, Mittag M, Lange I, Rytter M, Hausteiner UF (1999) The pigeon tick (*Argas reflexus*): Severe allergic bite reactions in humans. *Zentralbl Bakteriol.* 289, 754–755
19. Miadonna A, Tedeschi A, Leggieri E, Falagiani P, Nazzari M, Manzoni M, Zanussi C (1982) Anaphylactic shock caused by allergy to the venom of *Argas reflexus*. *Ann. Allergy* 49, 293–4.
20. Kleine-Tebbe J, Heinatz A, Gräser I, Dautel H, Hansen GN, Kespohl S, Rihs HP, Raulf-Heimsoth M, Vater G, Rytter M, Hausteiner UF (2006) Bites of the European pigeon tick (*Argas reflexus*): Risk of IgE-mediated sensitizations and anaphylactic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 190–195.
21. Gothe R, Neitz AWH (1991) Tick paralysis: pathogenesis and etiology. *Adv. Dis. Vec. Res.* 8, 177-204.

22. Stone BF, Uren MF, Neish AL, Morrison JJ (1986) Toxoid stimulation in dogs of high titres of neutralising antibodies against holocyclotoxin, the paralysing toxin of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus*. Aust. Vet. J. 63, 125–127.
23. Hall-Mendelin S, Craig SB, Hall RA, O'Donoghue P, Atwell RB, Tulsiani SM, Graham GC (2011) Tick paralysis in Australia caused by *Ixodes holocyclus* Neumann. Ann. Trop. Med. Parasitol. 105, 95–106.
24. Grattan-Smith PJ, Morris JG, Johnston HM, Yiannikas C, Malik R, Russell R, Ouvrier RA (1997) Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. Brain 120, 1975–87.
25. Obenchain FD, Oliver JH (1975) The heart and arterial circulatory system of ticks (Acari : Ixodoidea). J. Arachnol. 3, 57-74.
26. Nosek J, Rajcáni J, Kozuch O (1978) Reaction of the host to the tick bite III. The bite of viruliferous *Ixodes ricinus* female. Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A 242, 141–7.
27. Binnington KC, Kemp DH (1980) Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. Adv. Parasitol 18, 315–39.
28. Lavoipierre MM, Riek RF (1955) Observations on the feeding habits of argasid ticks and on the effect of their bites on laboratory animals, together with a note on the production of coxal fluid by several of the species studied. Ann. Trop. Med. Parasitol 49, 96–113.
29. Ribeiro JM (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annu. Rev. Entomol 32, 463–478.
30. Brown SJ, Worms MJ, Askenase PW (1983) *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. Exp. Parasitol 55, 111–120.
31. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 28, 403–413.
32. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry 30, 10363–10370.
33. Weiss HJ (1995) Flow-related platelet deposition on subendothelium. Thromb.

- Haemost. 74, 117–22.
34. Clemetson KJ (1995) Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* 74, 111–6.
  35. Ikeda Y, Handa M, Kamata T, Kawano K, Kawai Y, Watanabe K, Kawakami K, Sakai K, Fukuyama M, Itagaki I (1993) Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand factor binding to GP Ib in the initiation of shear-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 69, 496–502.
  36. Andrews RK, Fox JE (1991) Interaction of purified actin-binding protein with the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *J. Biol. Chem.* 266, 7144–7.
  37. Fox JE (1985) Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J. Clin. Invest.* 76, 1673–83.
  38. Fox JEB, Boyles JK, Berndt MC, Steffen PK, Anderson LK (1988) Identification of a membrane skeleton in platelets. *J. Cell Biol.* 106, 1525–1538.
  39. Wolberg AS (2007) Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 21, 131–142.
  40. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR (2002) Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1381–1389.
  41. Ribeiro JM (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4, 143–52.
  42. Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC (1995) Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 245–67.
  43. Ribeiro JM, Mather TN (1998) *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp. Parasitol.* 89, 213–21.
  44. Ribeiro JC, Evans PM, MacSwain JL, Sauer J (1992) *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol.* 74, 112–116.
  45. Bowman AS, Sauer JR, Zhu K, Dillwith JW (1995) Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol.*



- Biol. 25, 735–741.
46. Ribeiro JM, Makoul GT, Robinson DR (1988) *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. J. Parasitol. 74, 1068–9.
  47. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J. Exp. Med. 161, 332–44.
  48. Karczewski J, Endris R, Connolly TM (1994) Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. J. Biol. Chem. 269, 6702–6708.
  49. Francischetti IMB, Mather TN, Ribeiro JMC (2004) Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. Thromb. Haemost. 91, 886–898.
  50. Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC (2002) Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. Blood 15, 3602–12.
  51. Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, Cappello M, Fikrig E (2002) A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. Insect Mol. Biol. 11, 641–650.
  52. Mans BJ, Louw AI, Neitz AWH (2002) Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick, *Ornithodoros savignyi*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 821–828.
  53. Zhu K, Bowman AS, Brigham DL, Essenberg RC, Dillwith JW, Sauer JR (1997) Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). Exp. Parasitol. 87, 30–38.
  54. Koh CY, Kazimirova M, Trimnell A, Takac P, Labuda M, Nuttall PA, Kini RM (2007) Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical

- bont tick. J. Biol. Chem. 282, 29101-13.
55. Dodt J (1995) Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirudin zu Hirudinmimetica. Angew. Chemie 107, 948–962.
  56. Friedrich T, Kröger B, Bialojan S, Lemaire HG, Höffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J (1993) A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. J. Biol. Chem. 268, 16216–16222.
  57. Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000) Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. J. Biol. Chem. 275, 18717–23.
  58. Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI (1999) Tick histamine-binding proteins: Isolation, cloning, and three-dimensional structure. Mol. Cell 3, 661–671.
  59. Falus A. Histamine and inflammation (1994) Austin, TX: R.G. Landes Company.
  60. Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ (1997) Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3926–32.
  61. Sacchi L, Bigliardi E, Corona S, Beninati T, Lo N, Franceschi A (2004) A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. Tissue Cell 36, 43–53.
  62. Martin PAW, Schmidtman ET (1998) Isolation of aerobic microbes from *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), the vector of Lyme disease in the eastern United States. J. Econ. Entomol. 91, 964-8.
  63. Andreotti R, Pérez de León AA, Dowd SE, Guerrero FD, Bendele KG, Scoles GA (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. BMC Microbiol. 11, 6.
  64. Murrell A, Dobson SJ, Yang X, Lacey E, Barker SC (2003) A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. Parasitol. Res. 89, 326–34.
  65. Rahman MH, Rahman MM (1980) Occurrence of some bacterial isolates in ticks found in Madhupur Forest area. Bang. Vet. Jour. 14, 43–47.

66. Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF (2002) Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. *J. Med. Entomol.* 39, 809–13.
67. de la Fuente J, Blouin EF, Kocan KM (2003) Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 182–4.
68. Chris MC, Ramirez JL, Dimopoulos G (2011) Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* 10, 307–310.
69. Weiss B, Aksoy S (2011) Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends. Parasitol.* 27, 514–522.
70. Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J (2015) Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. 15, 58–71.
71. Agaisse H, Perrimon N (2004) The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198, 72–82.
72. Bina S, Zeidler M (2009) JAK/STAT Pathway Signalling in *Drosophila melanogaster*. A. Stephanou, Austin, Landes Bioscience.
73. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N (2000) The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* 19, 2598–2606.
74. Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B (2009) *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* 5, 200–11.
75. Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 285–302.
76. Pierce AE, Pierce MH (1956) A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae : Acarina) on the embryonated hen egg. *Aust. Vet. J.* 32, 144–146.
77. Kemp DH, Koudstaal D, Roberts JA, Kerr JD (1975) Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin.

- Parasitology 70, 243–54.
78. Waladde SM, Kemp DH, Rice MJ (1979) Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *Int. J. Parasitol.* 9, 89–95.
  79. Hokama Y, Lane RS, Howarth JA (1987) Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (acari: argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. *J. Med. Entomol.* 24, 319–323.
  80. Kröber T, Guerin PM (2007) *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends Parasitol.* 23, 445–9.
  81. Kröber T, Guerin P (2007) The tick blood meal: from a living animal or from a silicone membrane? *ALTEX* 24, 39–41.
  82. Kröber T, Guerin PM (2007) An *in vitro* feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Manag. Sci.* 63, 17–22.
  83. Taylor ME, Drickamer K (2011) *Introduction to glycobiology*. Oxford University Press.
  84. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (2009) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  85. Bause E (1983) Structural requirements of *N*-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 209, 331–6.
  86. Altmann F, Fabini G, Ahorn H, Wilson IB (2001) Genetic model organisms in the study of *N*-glycans. *Biochimie* 83, 703–712.
  87. North SJ, Koles K, Hembd C, Morris HR, Dell A, Panin VM, Haslam SM (2006) Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconj. J.* 23, 345–354.
  88. Haslam SM, Gems D, Morris HR, Dell A (2002) The glycomes of *Caenorhabditis elegans* and other model organisms. *Biochem. Soc. Symp.* 69, 117–34.
  89. Aoki K, Perlman M, Lim JM, Cantu R, Wells L, Tiemeyer M (2007) Dynamic developmental elaboration of n-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J. Biol. Chem.* 282, 9127–42.
  90. Cipollo JF, Awad AM, Costello CE, Hirschberg CB (2005) *N*-Glycans of

- Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. J. Biol. Chem. 280, 26063-72.
91. Gagneux P, Varki A (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. Glycobiology 9, 747-55.
  92. Bishop JR, Gagneux P (2007) Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes? Glycobiology 17, 23R-34R.
  93. Williams PJ, Wormald MR, Dwek RA, Rademacher TW, Parker GF, Roberts DR (1991) Characterisation of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. Biochim. Biophys. Acta. 1075, 146-53.
  94. Kerscher S, Albert S, Wucherpfennig D, Heisenberg M, Schneuwly S (1995) Molecular and genetic analysis of the *Drosophila* mas-1 (mannosidase-1) gene which encodes a glycoprotein processing alpha 1,2-mannosidase. Dev. Biol. 168, 613-26.
  95. Parker CG, Fessler LI, Nelson RE, Fessler JH (1995) *Drosophila* UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. EMBO J. 14, 1294-303.
  96. Stagljar I, Aebi M, te Heesen S (1995) PCR-mediated cloning and sequencing of the DmOST50 gene, a WBP1/AvOST50/OST48 homologue, from *Drosophila melanogaster*. Gene 158, 209-12.
  97. Fabini G, Freilinger A, Altmann F, Wilson IBH (2001) Identification of core alpha 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster*. Potential basis of the neural anti-horseradish peroxidase epitope. J. Biol. Chem. 276, 28058-28067.
  98. Patel RY, Balaji PV (2006) Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. Glycobiology 16, 108-116.
  99. Aoki K, Perlman M, Lim JM, 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.
  100. Cipollo JF, Costello CE, Hirschberg CB (2002) The fine structure of *Caenorhabditis*

- elegans* N-glycans. J. Biol. Chem. 277, 49143–57.
101. Natsuka S, Adachi J, Kawaguchi M, Nakakita S, Hase S, Ichikawa A, Ikura K (2002) Structural analysis of N-linked glycans in *Caenorhabditis elegans*. J. Biochem. 131, 807–13.
  102. Man P, Kovár V, Sterba J, Strohalm M, Kavan D, Kopáček P, Grubhoffer L, Havlíček V (2008) Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. Eur. J. Mass Spectrom. 14, 345–54.
  103. 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.
  104. Pedra JHF, Narasimhan S, Rendić D, DePonte K, Bell-Sakyi L, Wilson IBH, Fikrig E (2010) Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. Cell. Microbiol. 12, 1222–1234.
  105. Gabius HJ (2009) The sugar code: fundamentals of Glycosciences. Wiley-VHC, Weinheim.
  106. Lowe JB (1997) Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. Kidney Int. 51, 1418–1426.
  107. Solter D, Knowles BB (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 5565–9.
  108. Altmann F (2007) The role of protein glycosylation in allergy. Int. Arch. Allergy Immunol. 142, 99–115.
  109. Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G. (1989) Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. Eur. J. Biochem. 184, 249–54.
  110. Nordvall SL, Uhlin T, Einarsson R, Johansson SGO, Ohman S (1984) Bee keepers IgG and IgE antibody responses to bee venom studied by means of crossed radioimmuno-electrophoresis. Clin. Allergy 14, 341–350.
  111. Kubelka V, Altmann F, Staudacher E, Tretter V, März L, Hård K, Kamerling JP,

- Vliegenthart JF (1993) Primary structures of the *N*-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2. *Eur. J. Biochem.* 213, 1193–1204.
112. Angata T, Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102, 439–470.
113. Livingston BD, Paulson JC (1993) Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 268, 11504–11507.
114. Paulson JC, Paulson JC (1995) The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* 270, 1497–1500.
115. Geremia RA, Harduin-Lepers A, Delannoy P (1997) Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology* 7, 5-7.
116. Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80, 129–164.
117. Fearon DT (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 1971–5.
118. Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ (1978) Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2416–20.
119. Varki A, Gagneux P (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36.
120. Collins BE, Blixt O, DeSieno AR, Bovin N, Marth JD, Paulson JC (2004) Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6104–9.
121. Sherblom AP, Bharathan S, Hall PJ, Smagula RM, Moody CE, Anderson GW. (1988) Bovine serum sialic acid: age-related changes in type and content. *Int. J. Biochem.* 20, 1177–83.
122. Spiro RG (1960) Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation,

- chemical composition, and physiochemical properties. *J. Biol. Chem.* 235, 2860–9.
123. Harvey H, Swords WE, Apicella MA (2001) The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic neisseria and haemophilus. *J. Autoimmun.* 16, 257–262.
  124. Roggentin P, Schauer R, Hoyer LL, Vimr E (1993) The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol. Microbiol.* 9, 915–921.
  125. Taylor G (1996) Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 830–837.
  126. Karlsson K (1998) Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. 29, 1–11.
  127. Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 132–153.
  128. Vimr E, Lichtensteiger C (2002) To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol.* 10, 254–257.
  129. Vogel U, Frosch M (1999) Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* 32, 1133–1139.
  130. Telang S, Vimr E, Mahoney JR, Law I, Lundqvist-Gustafsson H, Qian M, Eaton JW (2001) Strain-specific iron-dependent virulence in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 184, 159–165.
  131. Corfield T (1992) Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* 2, 509–21.
  132. Vimr E, Lichtensteiger C, Steenbergen S (2000) Sialic acid metabolism's dual function in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 36, 1113–1123.
  133. Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE (2000) Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29, 25–38.
  134. Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Andrade AFB (1998) Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 167–72.



135. Nagamune K, Acosta-Serrano A, Uemura H, Brun R, Kunz-Renggli C, Maeda Y, Ferguson MAJ, Kinoshita T (2004) Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in Tsetse fly vectors. *J. Exp. Med* 5600, 1445–1450.
136. Bouchet V, Hood DW, Li J, Brisson JR, Randle GA, Martin A, Li Z, Goldstein R, Schweda EK, Pelton SI, Richards JC, Moxon ER (2003) Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8898–903.
137. Welburn SC, Maudlin I (1999) Tsetse-trypanosome interactions: rites of passage. *Parasitol. Today* 15, 399–403.
138. Ruepp S, Furger A, Kurath U, Renggli CK, Hemphill A, Brun R, Roditi I (1997) Survival of *Trypanosoma brucei* in the Tsetse fly is enhanced by the expression of specific forms of procyclin. *J. Cell Biol.* 137, 1369–79.
139. Vickerman K, Tetley L, Hendry KA, Turner CM (1988) Biology of African trypanosomes in the Tsetse fly. *Biol. Cell* 64, 109–19.
140. Roditi I, Liniger M (2002) Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends Microbiol.* 10, 128–34.
141. Colli W (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 7, 1257–64.
142. Pontes de Carvalho LC, Tomlinson S, Vandekerckhove F, Bienen EJ, Clarkson AB, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V (1993) Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J. Exp. Med.* 177, 465–74.
143. Montagna G, Cremona ML, Paris G, Amaya MF, Buschiazzo A, Alzari PM, Frasch AC (2002) The trans-sialidase from the african trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 269, 2941–50.
144. Scanlon KL, Diven WF, Glew RH (1989) Purification and properties of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase. *Enzyme* 41, 143–50.
145. Shakhnovich EA, King SJ, Weiser JN (2002) Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria*

- meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect. Immun.* 70, 7161–4.
146. Vimr ER, Troy FA (1985) Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (nan) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164, 845–53.
  147. Vimr ER, Troy FA (1985) Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of *N*-acetylneuraminase pyruvate-lyase. *J. Bacteriol.* 164, 854–60.
  148. Plumbridge J, Vimr E (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmannosamine, and *N*-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 47–54.
  149. Byers HL, Homer KA, Beighton D (1996) Utilization of sialic acid by viridans streptococci. *J. Dent. Res.* 75, 1564–71.
  150. Macfadyen LP, Redfield RJ (1996) Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. *Res. Microbiol.* 147, 541–51
  151. Gee GV, Dugan AS, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ (2006) The role of sialic acid in human polyomavirus infections. *Glycoconj. J.* 23, 19–26.
  152. Isa P, Arias CF, López S (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37.
  153. Vancová M, Zacharovová K, Grubhoffer L, Nebesárová J (2006) Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *J. Parasitol.* 92, 431–40.
  154. Vancova M, Sterba J, Dupejova J, Simonova Z, Nebesarova J, Novotny MV, Grubhoffer L (2012) Uptake and incorporation of sialic acid by the tick *Ixodes ricinus*. *J. Insect Physiol.* 58, 1277–1287.
  155. Sterba J, Vancova M, Sterbova J, Bell-Sakyi L, Grubhoffer L (2014) The majority of sialylated glycoproteins in adult *Ixodes ricinus* ticks originate in the host, not the tick. *Carbohydr. Res.* 389, 93–99.
  156. Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256, 673–5.
  157. Koles K, Irvine KD, Panin VM (2003) Functional characterization of *Drosophila*

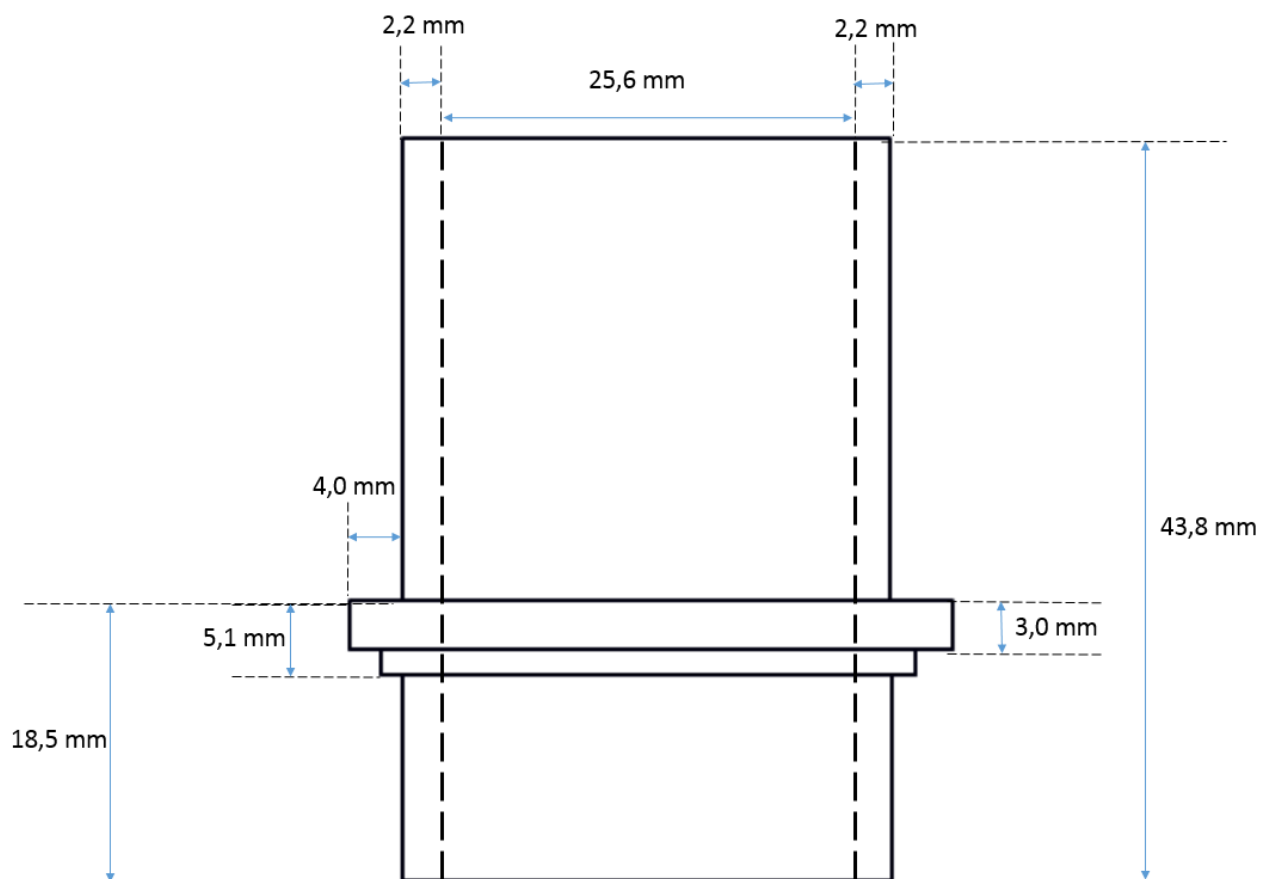
- sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 279, 4346–4357.
158. Repnikova E, Koles K, Nakamura M, Pitts J, Li H, Ambavane A, Zoran MJ, Panin VM (2010) Sialyltransferase regulates nervous system function in *Drosophila*. *J Neurosci* 30, 6466–76.
  159. Lahann J (2009) Click chemistry for biotechnology and materials science. John Wiley & Sons, Ltd.
  160. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* 67, 3057–64.
  161. Hong V, Presolski SI, Ma C, Finn MG (2009) Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 9879–83.
  162. Hein JE, Fokin VV (2010) Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1302–15.
  163. Hotha S, Kashyap S (2006) Click chemistry inspired synthesis of pseudo-oligosaccharides and amino acid glycoconjugates. *J. Org. Chem.* 71, 364–7.
  164. Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR (2004) A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15046–7.
  165. Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM (2006) Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9482–7.
  166. Dieterich DC, Lee JJ, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM (2007) Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat. Protoc.* 2, 532–40.
  167. Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F (2007) Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 23, 450–457.
  168. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ.

- Biophotonics Int. 11, 36–42.
169. Presolski SI, Hong VP, Finn MG (2011) Copper-catalyzed azide-alkyne Click chemistry for bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 3, 153–162.
  170. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
  171. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4.
  172. Wickramasekara S, Bunikis J, Wysocki V, Barbour AG (2008) Identification of residual blood proteins in ticks by mass spectrometry proteomics. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1273-75.
  173. Pilatte Y, Bignon J, Lambré CR (1993) Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3, 201–218.
  174. Neves AA, Stöckmann H, Harmston RR, Pryor HJ, Alam IS, Ireland-Zecchini H, Lewis DY, Lyons SK, Leeper FJ, Brindle KM (2011) Imaging sialylated tumor cell glycans *in vivo*. *FASEB J.* 25, 2528–37.
  175. Prescher JA, Bertozzi CR (2006) Chemical Technologies for Probing Glycans. *Cell* 126, 851–854.
  176. Du J, Meledeo MA, Wang Z, Khanna HS, Paruchuri VD, Yarema KJ (2009) Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology* 19, 1382–1401.
  177. Jacobs CL, Yarema KJ, Mahal LK, Nauman DA, Charters NW, Bertozzi CR (2000) Metabolic labeling of glycoproteins with chemical tags through unnatural sialic acid biosynthesis. *Methods Enzymol.* 327, 260-75.
  178. Schnaar RL (2004) Glycolipid-mediated cell–cell recognition in inflammation and nerve regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 163–172.
  179. Wang B, Brand-Miller J (2003) The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 1351–1369.
  180. Breen KC, Georgopoulou N (2003) The role of protein phosphorylation in  $\alpha$ 2,6(N)-

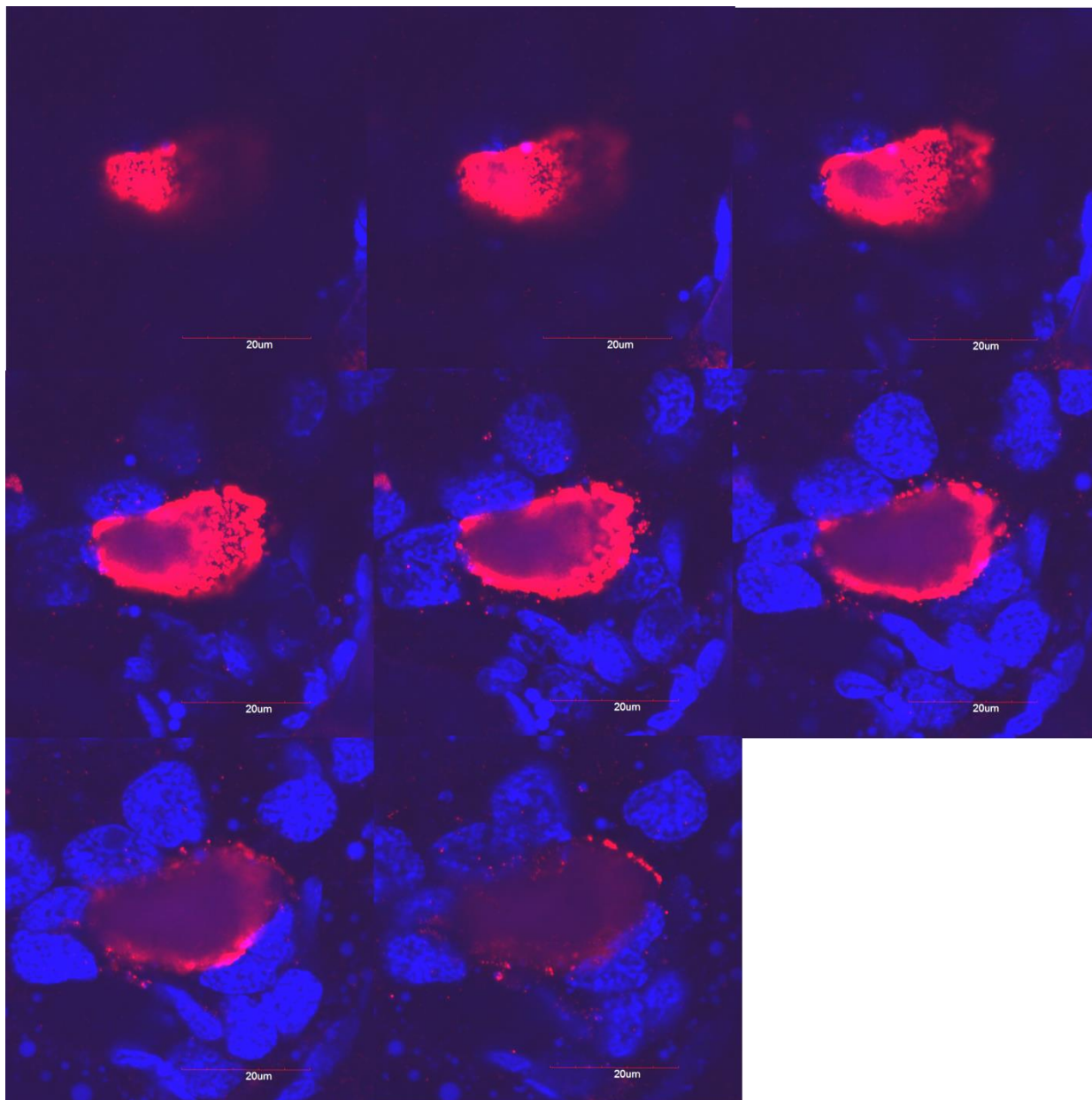
- sialyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 32–35.
181. Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F(2007) Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 23, 450–457.
  182. Gahmberg CG, Andersson LC (1977) Selective radioactive labeling of cell surface sialoglycoproteins by periodate-tritiated borohydride. *J. Biol. Chem.* 252, 5888–5894.

## 10 Přílohy

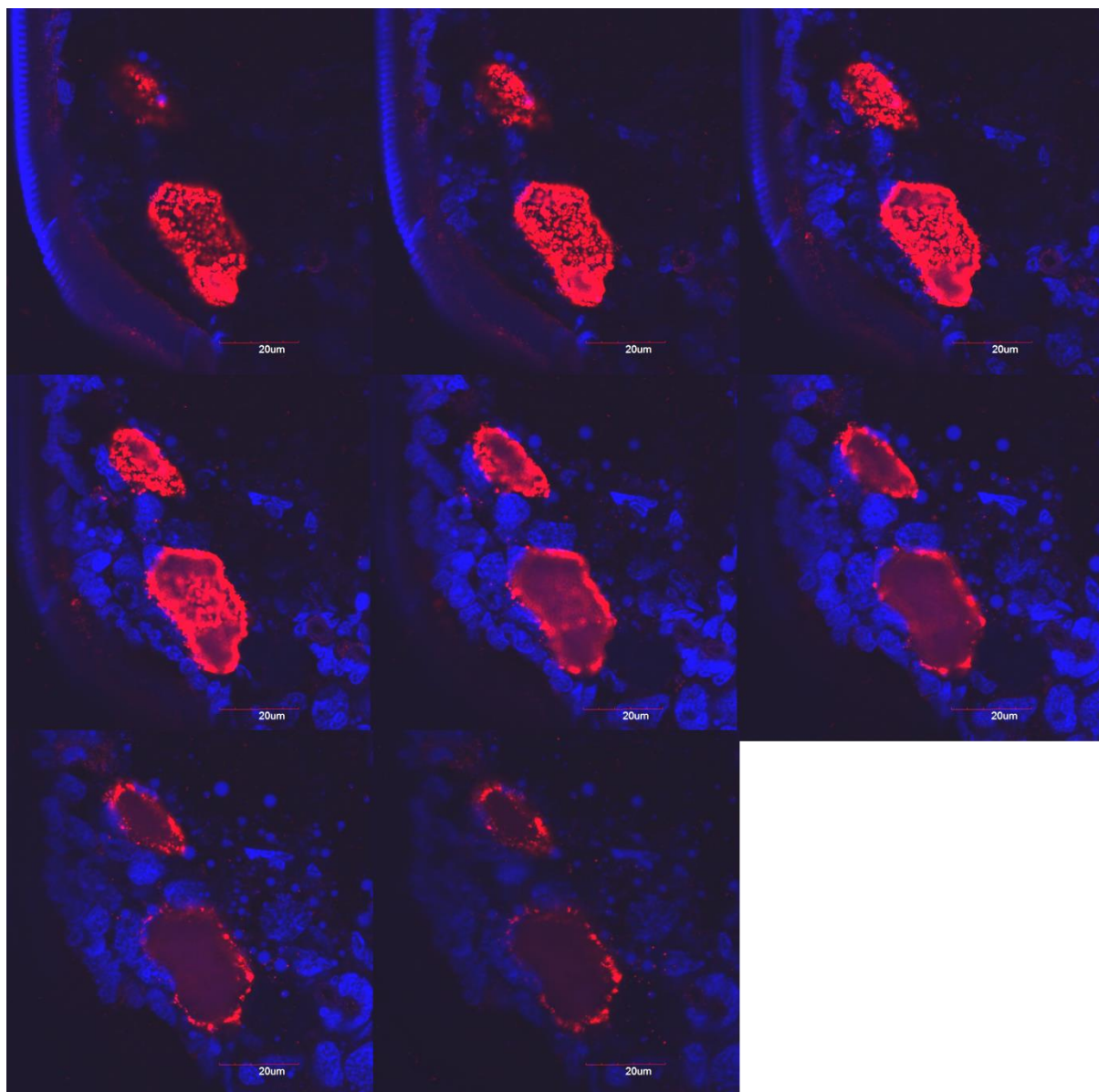
**Příloha1:** Schéma krmítka použitého pro *in vitro* feeding.



**Příloha 2:** Detail struktury larvy *I. ricinus* obsahující metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny. Proostření přibližně po 0,50  $\mu\text{m}$ . Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

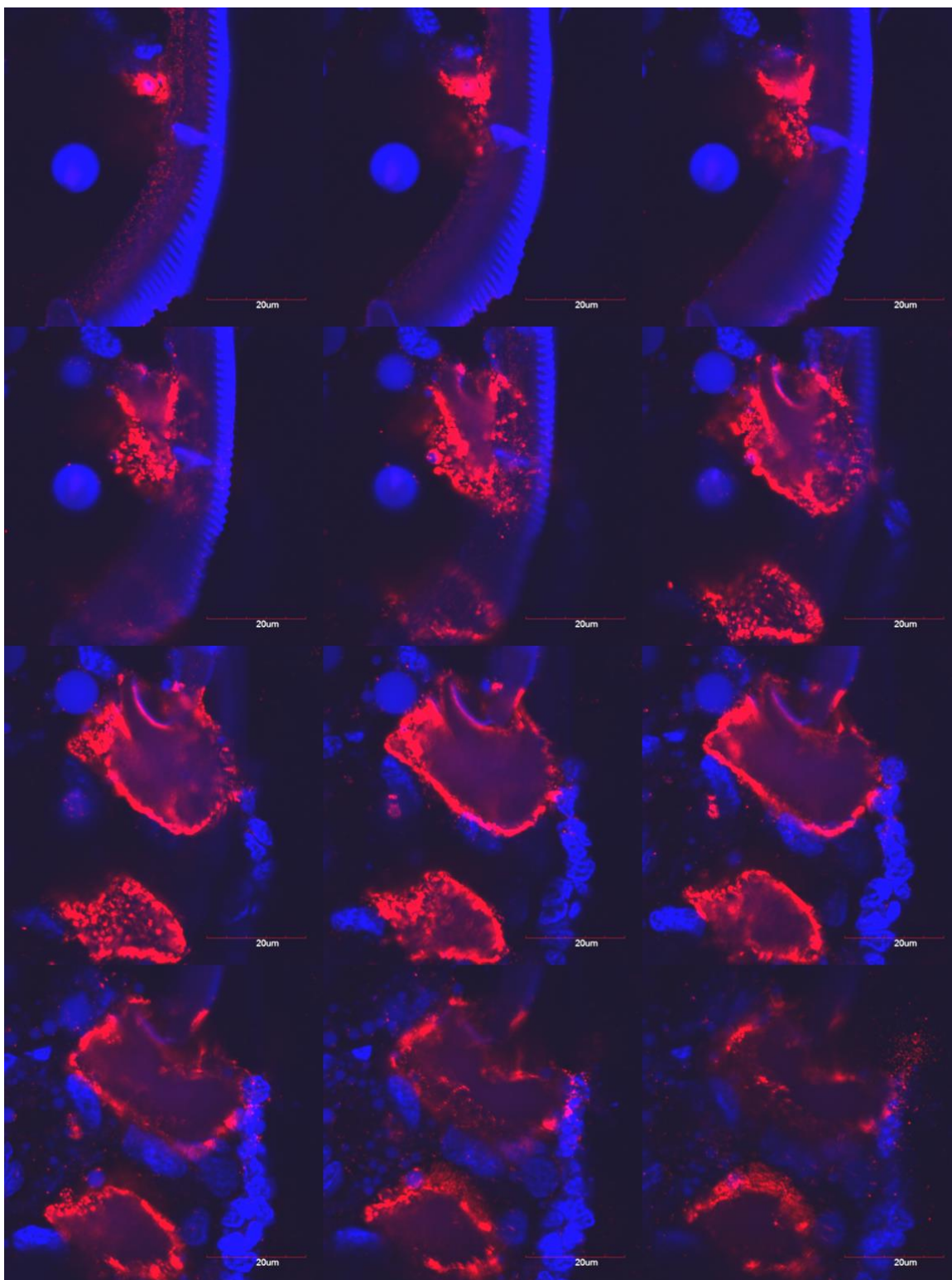


**Příloha 3:** Detail struktur larvy *I. ricinus* obsahujících metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny. Proostření přibližně po 0,50  $\mu\text{m}$ . Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

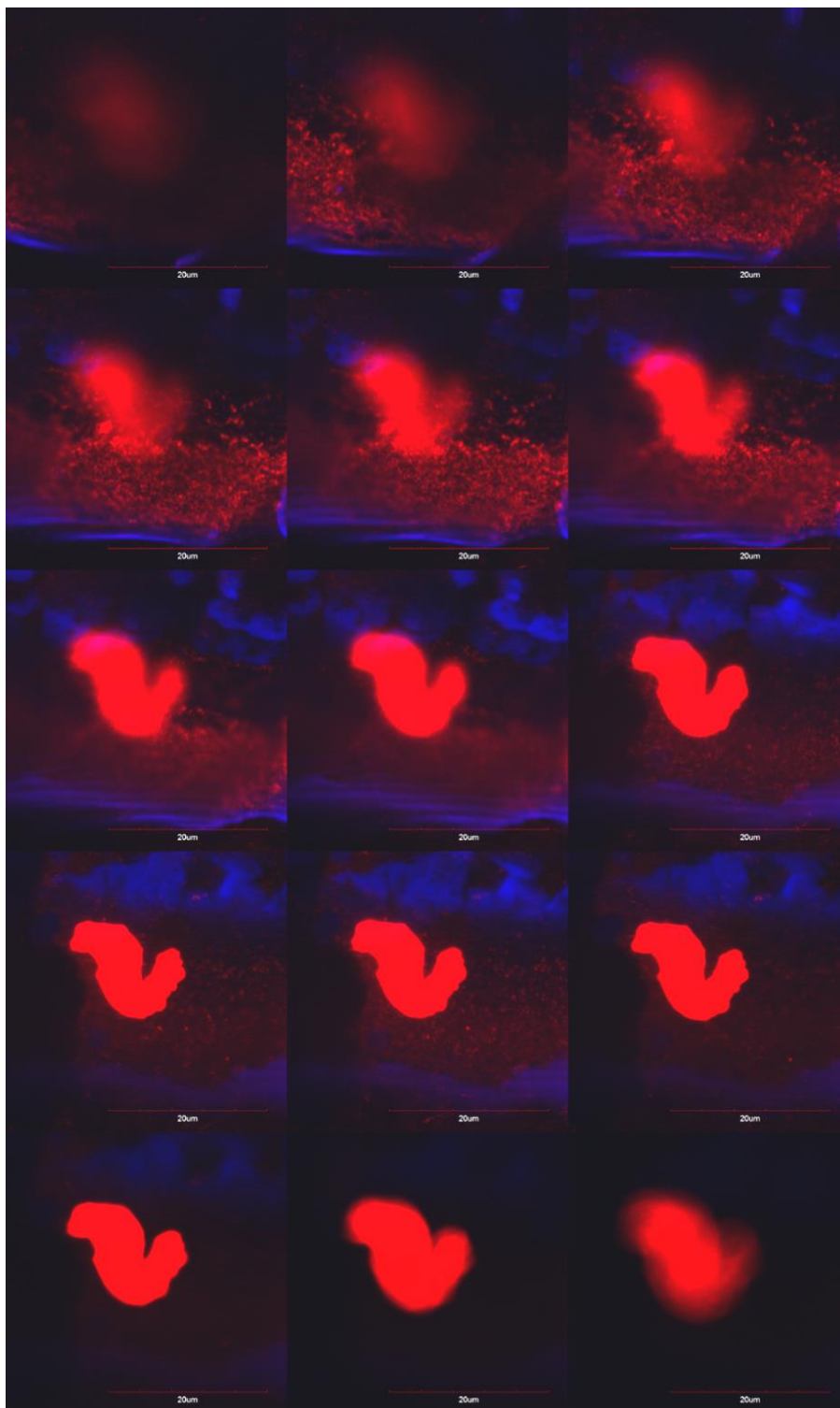




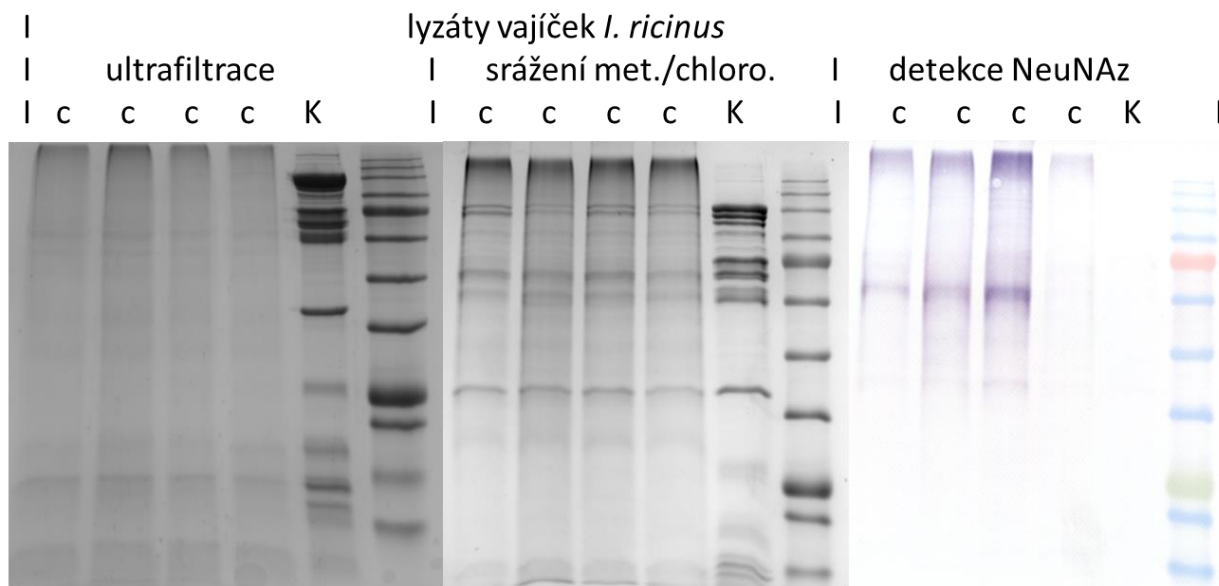
**Příloha 4:** Detail struktur larvy *I. ricinus* obsahujících metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny. Proostření přibližně po 0,33  $\mu\text{m}$ . Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Měřítko 20  $\mu\text{m}$ .



**Příloha 5:** Detail struktury larvy *I. ricinus* obsahující metabolicky vytvořené sialované glykoproteiny. Proostření přibližně po 0,26  $\mu\text{m}$ . Červená: NeuNAz, detekce DyLight 549. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .



**Příloha 6:** Ukázka vlivu srážení proteinů a ultracentrifugace po Click reakci na migraci proteinů v gelu při SDS-PAGE. C = lyzáty vajíček na které byla aplikována Click reakce a následně byly sráženy proteiny pomocí metanolu chloroformu, či ultrafiltrace. K = kontrolní vzorek, lyzát vajíček který nebyl podroben Click reakci, tedy ani srážení, či ultracentrifugaci.



**Příloha 7:** Struktura molekul použitých pro značení séra. A = Alexa Fluor® 488 Hydroxylamin, B = Fluorescein-5-Thiosemicarbazid, C = Alexa Fluor® 488 Sulfodichlorophenol Ester, D = Fluorescein-5-Isothiokyanát. Převzato z protokolů výrobce Thermo Fisher Scientific jednotlivým chemikáliím, dotupné online <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>.

