

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



## **Alergenogenní epitopy u klíšťat**

Bakalářská práce

**Hana Pejšová**

Vedoucí práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitelka specialista: RNDr. Jarmila Štěrbová

České Budějovice 2018

**Pejšová, H., 2018:** Alergenogenní epitopy u klíšťat. [Allergenogenic epitopes in ticks, BSc. Thesis, in Czech] 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

In this study we focused on detection of galactose-alpha-1,3-galactose ( $\alpha$ Gal epitope) as to determine the proteins which carry this glycan in ticks. Affinity chromatography with magnetic beads was used to purify the proteins from tick cell lines. The proteins obtained were visualized by SDS-PAGE and western blotting. Purified proteins were then identified using mass spectrometry. Fluorescence microscopy was also used to detect  $\alpha$ Gal as well as another allergenogenic epitope, the core  $\alpha$ -1,3-fucose, in ticks cells.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání 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.

České Budějovice 17.4.2018

.....

Hana Pejšová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem z laboratoře, kteří mi kdy byli ochotni poradit nebo podat pomocnou ruku. Největší dík patří mému vedoucímu Jánovi Štěrbovi za jeho trpělivost a rady, kdykoli bylo potřeba. Byla pro mě skvělá zkušenost pracovat ve vaší laboratoři v tak přátelském kolektivu. Dále bych ráda poděkovala své rodině, protože bez nich by tato práce nikdy nevznikla.

## Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	2
2.1	Klíšťata .....	2
2.1.1	Ixodes .....	2
2.2	Glykosylace .....	3
2.2.1	N-glykosylace.....	4
2.2.2	O-glykosylace.....	6
2.3	Glykany u členovců .....	6
2.4	Glykosylace u klíšťat .....	7
2.5	Cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) .....	8
2.5.1	$\alpha$ Gal epitop .....	8
2.6	Metody detekce glykanů .....	11
2.6.1	Hmotnostní spektrometrie .....	11
2.6.2	Schiffovo barvení .....	12
2.6.3	Radioaktivní značení .....	12
2.6.4	SDS-PAGE a imunoblotting nebo lektinoblotting .....	13
3	MATERIÁLY A METODY.....	14
3.1	Materiál a chemikálie.....	14
3.1.1	Afinitní chromatografie za použití magnetických kuliček .....	14
3.1.2	Srážení proteinů a BCA Assay .....	14
3.1.3	SDS-PAGE .....	14
3.1.4	Barvení gelů.....	15
3.1.5	Western blotting .....	15
3.1.6	Značení klíštěcích buněk pro fluorescenční mikroskopii .....	15
3.1.7	Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii.....	16

3.2	Metody .....	17
3.2.1	Afinitní chromatografie za použití magnetických kuliček .....	17
3.2.2	Srážení proteinů a BCA Assay .....	17
3.2.3	Polyakrylamidová gelová elektroforéza .....	18
3.2.4	Barvení gelů.....	19
3.2.5	Western Blotting.....	19
3.2.6	Fluorescenční mikroskopie.....	20
3.2.7	Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii.....	21
4	VÝSLEDKY.....	23
5	DISKUZE.....	29
6	ZÁVĚR.....	31
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....	32

# 1 ÚVOD

Klíšťata, patřící do kmene členovců, se řadí mezi významné přenašeče řady infekčních chorob. Přenášejí široké spektrum patogenů včetně virů, bakterií a prvků (Fuente, 2008). Jejich jediným zdrojem potravy je krev, přičemž se krmí na savcích, plazech a ptácích. Mezi nemoci přenášenými klíšťaty se zahrnuje především Lymeská borelióza, klíšťová encefalitida, ehrlichioza, horečka Skalistých hor, Marseillská horečka, lidská granulocytární anaplazmóza a spousta dalších (Sonenshine, 1993).

Klíšťata však nejsou nebezpečná jen kvůli patogenům, které přenáší. Jejich sliny obsahují farmakologicky aktivní látky, které mají pro člověka mnoho nebezpečných vlastností. Můžeme zde najít látky zabraňující vazokonstrikci, látky, které působí protizánětlivě, protisrážlivě a podobně. Některé antigenní determinanty jsou schopny v hostiteli vyvolat imunitní reakci. V nedávné době se ve světě rozšiřuje unikátní fenomén zvaný jako „red meat allergy“, v překladu alergie na červené maso. V mnoha případech jde o závažnou alergickou reakci primárně na glykoepitop zvaný  $\alpha$ Gal (galaktóza- $\alpha$ 1,3-galaktóza). Ve studiích věnujících se této alergii bylo dokázáno, že její výskyt souvisí s výskytem klíštěte amerického (*Amblyomma americanum*) ve Spojených státech amerických a klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v Evropě (Commins et al., 2011).

Cílem mé bakalářské práce bylo detekovat jeden z alergenogenních glykoepitopů – tzv.  $\alpha$ Gal epitop, vyskytující se u klíšťat, a následně identifikovat a purifikovat proteiny, které tento epitop nesou.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Klíšťata

Klíště obecné (*I. ricinus*) je členovec patřící do podkmenu klepítkatců. Tento podkmen zahrnuje tři třídy: hrotnatce (Merostomata), nohatky (Pycnogonida) a pavoukovce (Arachnida). Pavoukovci jsou nejpočetnější skupinou klepítkatců a jejich zástupci obývají v porovnání s dalším dvěma třídami v tomto podkmenu nejen vodní prostředí ale i souš.

Pavoukovci zahrnují několik řádů: pavouci, bičnatci, bičovci, roztoči, roztočovci, krátkochvosti, sekáči, solifugy, štírci, štířenky a štíři. Roztoči (Acari) se od ostatních řádů liší především tím, že se neživí pouze dravým způsobem, ale hlavně paraziticky a saprofyticky. Běžně dosahují menšího vzrůstu (80  $\mu\text{m}$  – 1 mm), ale některé druhy jsou schopné dorůst až 2 cm. Mezi podřády roztočů řadíme sametkovce, čmelíkovce, zákožkovce a klíšťata.

Klíšťat bylo popsáno více než 900 druhů a dělí se do třech čeledí: Ixodidae (klíšťata, angl. hard ticks), Argasidae (klíšťáci, angl. soft ticks) a Nuttallielidae. Hlavními znaky klíšťat jsou zploštělé tělo, 4 páry končetin (3 páry při larválním vývojovém stupni) a chobotek (hypostom; Sonenshine, 1993).

Jsou to krevsající paraziti, kteří si krmí na různých obratlovcích, aby dokončili svůj vývoj. Životní cyklus klíšťat se skládá ze čtyř stádií: vajíčko, larva, nymfa a dospělec, přičemž každé toto stádium se živí sáním krve. Každé stádium se zpravidla krmí na jiném hostiteli a mění se na další stádium. Dospělec se poté krmí a v případě samic zvětšuje svou velikost až stonásobně, dokud není připravena klást vajíčka. Samci většinou nesají, k hostiteli se přichycují jenom ke spáření se samicí (Sonenshine, 1993).

#### 2.1.1 *Ixodes*

V porovnání s čeledí Argasidae je vývojový cyklus Ixodidae zkrácen na jendonymfální stadium. U některých druhů je vývoj urychlen ještě více tím, že již dále nemění svého hostitele, ale dokončují svůj životní cyklus na tom samém. Jejich vývojový cyklus je tříhostitelský a zahrnuje drobné savce, ptáky, vysokou zvěř a dobytek. Člověk je ve skutečnosti pouze náhodný hostitel (Fuente, 2008). Samice Ixodidae se krmí pouze jednou za svůj život, kladou vajíčka a umírají (Sonenshine, 1993).

Na přichycení na hostitele čekají na stéblech trav někdy až tak dlouho, dokud nezahynou. Pro přichycení hledají vhodné místo, nejlépe s jemnou a tenkou pokožkou jako je například za ušima a v podpaží. K přichycení použijí chelicery, kterými pokožku nařiznou a vsunou hypostom. Jsou schopna se na hostiteli krmit minuty, hodiny až dny. K tomu jim napomáhají farmakologicky aktivní látky, které jsou sekretovány ze slinných žláz v průběhu sání.

Třída Ixodidae se dále dělí na metastriate a prostriate. Metastriate (klíšťata, která mají anální rýhu za řitním otvorem) mají hypostom kratší, ale jejich slinné žlázy produkují množství sekretu, který má vlastnosti cementu a zajišťuje pevné přichycení klíšťete k hostiteli. Oproti tomu Prostriate (klíšťata, která mají anální rýhu před řitním otvorem) k přichycení k hostiteli využívají především delší a silnější hypostom.

Kromě rozšiřování nebezpečných onemocnění, ke kterému dochází při tomto náhodném přichycení klíšťete na člověka, i samotné kousnutí může vyvolat závažné toxické a alergické reakce (až paralýzu) vzhledem k molekulám, které obsahují klíšťecí sliny (Bowman & Nuttall, 2008).

## 2.2 Glykosylace

Většina biologicky aktivních cukrů se vyskytuje ve formě polysacharidů (př. celulóza, chitin, glykogen) nebo jako komplex (glykolipidy, glykopeptidy, glykoproteiny). Glykosylace patří mezi posttranslační (i kotranslační) modifikace proteinů (Demchenko, 2008).

Společně s dalšími typy (metylací, fosforylací, acetylací, sulfatací a dalšími) jde o přirozený proces v buňkách, který zvyšuje diverzitu proteinů. Je to jedna z nejpodstatnějších posttranslačních modifikací u eukaryotických buněk, jelikož proteiny konjugované glykany hrají roli v důležitých biologických a fyziologických procesech jako jsou regulační funkce, buněčná komunikace, genová exprese, buněčná imunita, růst a vývoj.

Glykosylace byla nejvíce studovaná v rámci eukaryotických organismů, ale poslední dobou je kladen důraz také na studie bakteriálních glykanů. Glykosylace zajišťuje správné složení proteinů a možnost jejich degradace při špatném složení. Dále zajišťuje přesné směřování proteinů do jejich intracelulárních i extracelulárních míst určení, mění náchylnost k degradaci, modulaci imunologických vlastností a vazbu lektinů (2009, Robert. V. Stick, Spencer J. Williams).



Při glykosylaci dochází k navázání řetězce glykanů na proteiny v endoplasmatickém retikulu a následné úpravě těchto řetězců v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. V závislosti na velikosti a typu připojení glykanu dělíme glykosylované proteiny do dvou skupin, glykoproteiny a proteoglykany. Sacharidová část u proteoglykanů je větší, tvořená opakujícími se podjednotkami disacharidů. Naproti tomu glykoproteiny obsahují zejména větvené oligosacharidy. Bylo popsáno pět typů glykosylace, lišících se typem vazby, jímž jsou glykany vázány na proteiny, z nichž nejvýznamnější je *N*- a *O*-typ.

Monosacharidy jsou to, co zajišťuje proteinům velkou diverzitu, jelikož je možné tvořit nespočet kombinací mezi sacharidovými jednotkami, které se mohou vázat v rozdílném množství a variacích. Větší rozmanitosti je možné dosáhnout ještě kovalentní vazbou sulfátu, fosfátu, acetylu nebo metylu na glykan. Zároveň je glykosylace jakéhokoli proteinu závislá na buňce, tkáni anebo organismu, ve kterém probíhá (Lis & Sharon, 1993).

Glykany jsou významnou součástí vnějších stran buněk, kde vytváří vrstvu, která zajišťuje mnoho významných procesů. Mezi funkce glykanů jakožto vnější vrstva buněčné membrány patří zprostředkování interakcí mezi buňkami a extracelulární matrix a zajišťování imunologických interakcí (Corfield & Berry, 2015). Termín glykoepitop je používán pro upřesnění sacharidové části, která je rozpoznávána buďto protilátkou nebo proteiny vázající glykany (glycan-binding proteins).

### 2.2.1 *N*-glykosylace

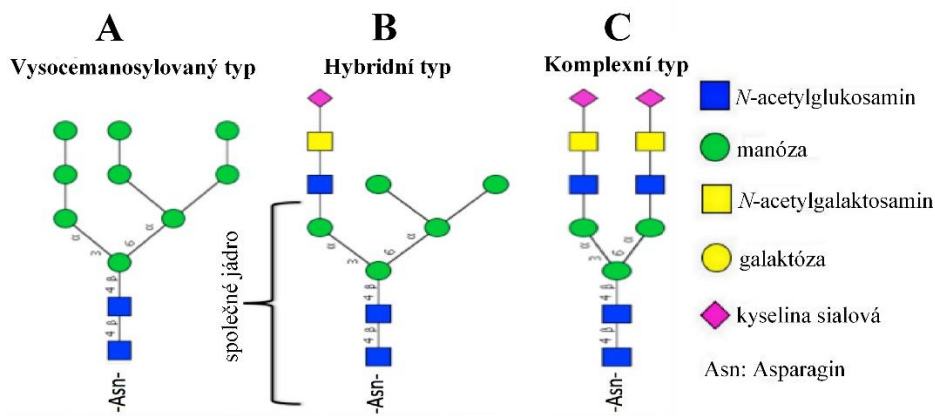
*N*-glykosylace je obecně nejrozšířenější typ glykosylací. Dochází při ní k napojení glykanu k amidu asparaginových zbytků příslušného polypeptidu. *N*-glykosylace probíhá v endoplazmatickém retikulu, správně navázané glykoproteiny poté dozrávají v Golgiho aparátu a jsou následně většinou transportovány do plazmatické membrány, kde se rozhodne o jejich dalším osudu. *N*-glykany mají schopnost ovlivňovat jak správné složení výsledného glykoproteinu, tak i jeho funkci a aktivitu.

Momentu, kdy je určitý glykan navázan na asparagin, předchází několik kroků zahrnující vazbu daného oligosacharidu na lipid a tvorbu prekurzoru na membráně endoplazmatického retikula. Polyisoprenoid, sloužící k transportu takových glykanů, se nazývá dolichol (Aebi, 2013). Glykan je poté navázan na asparagin v konzervované sekvenci

Asn-Xxx-Ser/Thr polypeptidického řetězce, kde Xxx může být jakákoli aminokyselina kromě prolinu (Taylor. & Drickamer, 2006).

Všechny *N*-glykany mají společné jádro, které je tvořené *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc), který se pojí na asparagin, další GlcNAc a třemi manózami. Na toto trimanosylové jádro se dále v závislosti na funkci glykosidáz a glykosyltransferáz v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu váží další sacharidové jednotky, popř. jsou odštěpovány a podle výsledného složení dělíme *N*-glykany na tři typy: vysoce manosylovaný typ, hybridní typ a komplexní typ (Breitling & Aebi, 2013).

Vysoce manosylovaný typ neboli oligomanózový typ je z těchto tří nejjednodušší, jde o typ *N*-glykanů, na jehož trimanosylové jádro se váží pouze další manózy (Obr. 1A). Hybridní typ vzniká, pokud se na jedno z ramen naváže jiná sacharidová jednotka (Obr. 1B). Nejsložitější z těchto tří je komplexní typ, při kterém dochází k vazbě odlišných sacharidových jednotek na manózy *N*-glykanového jádra. U komplexních sacharidů jsme schopni nalézt množství sacharidů pojíící se na manózy (fukóza, galaktóza, GlcNAc, *N*-acetylgalaktosamin – GalNAc, kyselina sialová) (Obr. 1C). Rozmanitost vazeb u komplexních *N*-glykanů zaručuje tomuto typu širokou diverzitu.



Obrázek 1: Typy *N*-glykanů: A) vysoce manosylovaný typ, B) hybridní typ, C) komplexní typ; převzato z Higel, Seidl, Sörgel, & Friess (2016).

### 2.2.2 *O-glykosylace*

Oproti *N-glykanům* jsou *O-glykany* relativně malé (většinou 3-6 monosacharidových jednotek) a jejich výskyt je o dost menší.

*O-glykosylace* je proces navázání určitého glykanu na sekvenci polypeptidického řetězce na jakoukoli aminokyselinu obsahující hydroxylovou skupinu. Většinou se váží na threoninový nebo serotoninový zbytek, v menšině také na tyrosin (Spiro, 2002). *O-glykany* se váží na protein přes *N-acetylgalaktosamin* (GalNAc) za pomoci *N-acetylgalaktosaminyltransferázy*, která zajišťuje transport GalNAc z UDP-GalNAc k hydroxyly určitého Ser nebo Thr. Následovně enzymatické reakce pomocí specifických transferáz prodlužují vzniklý řetězec a tvoří jádrové (středové) struktury podobně jako u *N-glykanů*, které prodlužují řetězec a mohou být dále modifikovány sialylací, sulfatací, acetylací, fukosylací nebo vazbou polyaktosaminu.

U *O-glykosylace* přes GalNAc je možné jádra rozdělit do 8 strukturních typů, které mohou být dále upravovány. Pokud k dalším změnám už nedojde, vytvoří se Tn-antigen (pouze u určitých rakovinných buněk.) Většina *O-glykanů* nemá žádný specifický konzervovaný základ jako je to u *N-glykanů* (Van Den Steen et al., 1998).

Jeden z nejčastějších *O-glykanů* je tzv. mucinový typ, který byl pojmenován po prvním glykoproteinu tohoto typu, který byl objeven. Obsahuje vazbu tvořenou *N-acetylgalaktosaminem*. Jsou známé hlavně pro svou schopnost tvořit gely (Spiro, 2002).

Dalšími možnostmi *O-glykosylace* jsou vazby glykanu přes jiný sacharid než GalNAc, proteoglykanový typ (vazba proteoglykanů přes  $\beta$ -xylózu), *O-manosylový* typ (vazba glykanu přes manózu), *O-fukosylace* (vazba přes fukózu), *O-glukosylace* (vazba přes glukózu; Van Den Steen et al., 1998).

## 2.3 Glykany u členovců

Glykany byly studovány u rozsáhlé řady členovců, ale nejvíce výsledků bylo dosaženo u modelového organismu *Drosophila melanogaster*. U hlavních tříd glykanů byla nalezena podobnost s obratlovci.

Nejprve bylo myšleno, že *N-glykany* u *D. melanogaster* a dalších druhů hmyzu, které jsou součástí všech životních cyklů členovců, jsou výhradně typu oligomanózy a paucimanózy (*N-glykany* obsahující několik manóz), ale díky novým analytickým technikám bylo zjištěno,

že hybridní a komplexní glykany (př. sialované, suflatované a glukuronylované) tvoří až desetinu *N*-glykanů. Fukóza vázaná na proximální GlcNAc jádra *N*-glykanů se u *D. melanogaster* vyskytuje jak ve vazbě  $\alpha$ -1,3, tak i  $\alpha$ -1,6 zatímco u obratlovců se vyskytuje téměř výhradně ve vazbě  $\alpha$ -1,6 (Wiederschain, 2009).

U hmyzu se *O*-glykany pojí vazbou na serinové a threoninové zbytky u vylučovaných, membránových a mimobuněčných proteinů. Nacházejí se zde strukturálně jednoduché monosacharidy (GalNAc, manóza, glukóza, fukóza) i modifikované glykosaminoglykanové řetězce (Wiederschain, 2009).

## 2.4 Glykosylace u klíšťat

O glykosylaci u klíšťat bylo zatím zjištěno poměrně málo v porovnání například s jinými druhy hmyzu, a hlavně s modelovým organismem jako je *D. melanogaster*. Nejrozšířenější metodami, které byly u klíšťat využívány k studiu glykosylace je značení lektiny a hmotnostní spektrometrie.

Ve studii, která se zabývala detekcí glykoproteinů v Malphigických trubicích, ve střevech, slinných žlázách, reprodukčních orgánech, pokožce, mozku, larvách a *ampulla recti* u klíšťáka *Argas polonicus* za použití široké škály lektinů, bylo detekováno velké množství glykoproteinů. Ve tkáních byl sledován protein o velikosti 305 kDa, který je pro všechny tkáně společný.

Přítomnost a množství antigenních glykoproteinů obsažených ve slinných žlázách a dalších tkáních se liší mezi vývojovými cykly a v průběhu procesu sání. Výsledkem studie bylo zjištění, že glykoproteiny u *A. polonicus* jsou více *N*-glykosylované, ale je zde i mnoho *O*-linked glykanů (Grubhoffer & Dusbábek, 1991). Toto zjištění podporují i studie Buttler a Hughes (1980) a Grubhoffer a Mařha (1990), které dospěly ke stejným výsledkům u dalších druhů členovců.

Glykany mohou u klíšťat hrát významnou roli jako imunogenní epitopy a tím způsobovat reakce u hostitele, stejně tak, jako být součástí důležitých buněčných receptorů (Uhlíř et al., 1994).

## 2.5 Cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs)

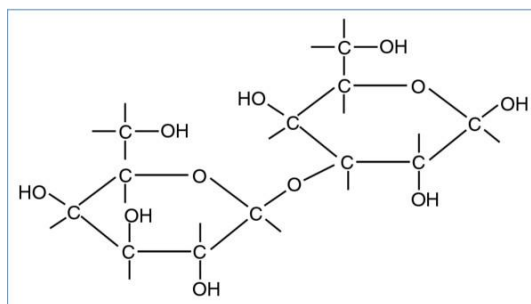
Jedná se o glykanovou část glykoproteinů, která je schopna vyvolávat zkřížené (cross-reactive) imunologické odpovědi. Ty vznikají, pokud IgE protilátky reagují na antigeny, které se liší od původního imunogenu, ale mají právě společný glykan. CCD se nevyskytují u savců, jde o reakci protilátek proti rostlinným a hmyzím glykanům (Commins & Platts-Mills, 2009). CCD jsou schopné vázat IgE protilátky například proti pylu, včelímu jedu, různým potravinovým alergenům, jako je lepek a sója, jak bylo zjištěno ve studii Yokoi a spol. (2017).

Struktura CCD byla identifikována jako oligomanózní typ *N*-glykosidického sacharidového řetězce obsahujícího  $\beta$ 1,2-xylózy a core- $\alpha$ -1,3-fukózy. V některých případech není imunitní odpověď na CCD závažná, pouze s minimální klinickými symptomy. Dochází sice k tvorbě IgE protilátek, ale vlivem pouze jednoho vazebného místa pro protilátku, které většina CCD-glykoproteinů nabízí, nedochází k tvorbě křížové vazby mezi CCD a anti-CCD specifickými IgE protilátkami na membráně mastocytů. Tím je inhibována jejich degranulace a uvolnění farmakologicky aktivních látek (př. histaminu; Yokoi et al., 2017).

Nejvýznamnějšími CCD jsou core- $\alpha$ -1,3-fukóza,  $\beta$ 1,2-xylóza a  $\alpha$ Gal epitop. Dále se budu podrobněji věnovat pouze  $\alpha$ Gal epitopu.

### 2.5.1 $\alpha$ Gal epitop

Galaktóza- $\alpha$ -1,3-galaktóza ( $\alpha$ Gal) je glykan vyskytující se u savců a kočkodanovitých, ne u primátů a člověka. Jeho nepřítomnost je dána absencí genu pro expresi  $\alpha$ -galaktosyl-1,3-galaktosyltransferázy ( $\alpha$ 1,3GT) u těchto savců, který jinak zajišťuje tvorbu  $\alpha$ Gal. Absence exprese tohoto enzymu je způsobena deleční mutací, která nastala zhruba před 28 miliony let (Macher & Galili, 2008).



**Obrázek 2:** Struktura  $\alpha$ Gal epitopu (Saleh et al., 2012).

$\alpha$ Gal epitop je možné najít u řady glykolipidů a glykoproteinů. Výskyt jeho exprese se u různých druhů liší. Například u krav a králíků mnoho studií potvrdilo přítomnost tohoto epitopu na glykolipidech červených krvinek, ledvin, thymu i gangliosidech. U krav, prasat a psů je možné  $\alpha$ Gal nalézt jako součást hormonu thyroglobulinu, u myší na povrchu nádorových a lymfatických buněk. Stejně tak se  $\alpha$ Gal hojně vyskytuje ve strukturách buněčných membrán ve formě různých glykokonjugátů (Huai et al., 2016).

U lidí jsou imunokompetentní jedinci přirozeně schopni tvořit IgG protilátky proti  $\alpha$ Gal, kvůli kterým dochází často k odmítnutí orgánů při xenotransplantacích, čímž se stával tento druh transplantace zdravé prasečí tkáně lidem nemožným. Anti- $\alpha$ Gal protilátky tvoří až 1 % všech cirkulujících protilátek v těle. Ovšem v poslední době bylo možné problém s anti- $\alpha$ Gal protilátkami vyřešit díky „knock-out“ prasatům, která byla speciálně vyšlechtěná tak, aby byl jejich gen pro  $\alpha$ 1,3GT inaktivován (Macher & Galili, 2008).

Sám o sobě je  $\alpha$ Gal epitop velice významnou biologickou komponentou. V poslední době bylo totiž zjištěno, že zároveň hraje i negativní roli jako spouštěč alergie na červené maso. V mnoha studiích bylo dokázáno, že výskyt tohoto fenoménu má co dočinění s výskytem určitého druhu klíšťat především ve Spojených státech amerických, Austrálii, Evropě a částech Asie (Steinke et al., 2016).

### 2.5.1.1 Alergie na červené maso (red meat allergy)

Jedná se o stav, kdy byla u lidí sledovaná alergická reakce po požití červeného masa, jako je vepřové, hovězí, jehněčí apod. Zjištění, co vlastně způsobuje tuto reakci, předcházelo několik pozorování.

Zaprvé bylo pozorováno, že u lidí dochází ke kožním alergickým reakcím při styku s kočičím alergenem. Později bylo zjištěno, že jsou tyto reakce podmíněny odpovědí imunitního systému na oligosacharid, který se nachází na IgE protilátkách proti kočičímu alergenem. (Commins et al., 2011)

Zadruhé bylo sledováno, že monoklonální protilátka zvaná cetuximab, která je podávána pacientům s kolorektálním karcinomem a s krčními či mozkovými nádory, vyvolává u některých těchto pacientů hypersensitivní reakce (Saleh et al., 2012). Všechna tato sledování propojilo pozorování zvláštního fenoménu, kdy určití pacienti trpěli vážnými až fatálními alergickými reakcemi po požití červeného masa. Jak se ukázalo, dochází k nim v rámci útoku imunitního systému proti glykanu  $\alpha$ Gal v rámci tvorby IgE protilátek. Rozvoj těchto protilátek vůči  $\alpha$ Gal byl spojen s výskytem klíštěcího kousnutí, ve většině případů klíštěte amerického (*A. americanum*). Nejvíce případů bylo sledováno ve Spojených státech amerických v regionech, kde se klíště americké vyskytuje. Pacienty trpícími alergií na červené maso jsme však schopni najít i v Austrálii, kde je za ni podezříváno klíště pacifické (*I. holocyclus*). V rámci Evropy (především Španělsko a Švédsko) alergii způsobuje pravděpodobně klíště obecné (*I. ricinus*), i když pro to neexistují žádné přímé důkazy (Apostolovic et al., 2016; Saleh et al., 2012).

Co se týče mechanismu vzniku alergie, dochází při styku antigen prezentujících buněk s  $\alpha$ Gal k aktivaci Th2 buněk a vlivem interleukinů k tvorbě IgE B buňkami. Toto způsobí aktivaci mastocytů, eosinofilii a celou kaskádu reakcí indukovanou IgE protilátkami jako je kopřivka, angioedém, hypotenze až anafylaktický šok. Toto všechno je podobné jako u ostatních alergických reakcí na potraviny, co je ale zvláštní na alergii na červené maso je to, že nástup symptomů přichází o dost déle. U normálních potravinových alergií se symptomy projeví zpravidla do 1 hodiny, u alergie na červené maso je to kolem 3-7 hodin po požití alergenem. Mechanismus toho, proč se symptomy projeví až s několika hodinovým zpožděním je stále neznámý. Jedno z možných vysvětlení podali Commins a spol (2011), kteří navrhuji, že by to mohlo být způsobeno časem potřebným na strávení červeného masa v trávicím traktu.  $\alpha$ Gal se hojně vyskytuje na glykolipidech a glykoproteinech, jejichž trávení ve střevech trvá delší dobu (Saleh et al., 2012).

V několika případech byla zjištěna spojitost i s reakcí na kravské a kozí mléko, kdy pacienti s touto alergií jsou nuceni vyřadit z jídelníčku jak červené maso, tak i mléčné výrobky

(Kennedy et al., 2013). Dobrou zprávou pro pacienty diagnostikované alergií na červené maso je zjištění, že drůbež a ryby žádné reakce nespouští.

## **2.6 Metody detekce glykanů**

Metod detekce glykanů je mnoho, ve většině případů se detekují pomocí chemických reakcí s jednotlivými monosacharidy, značením radioaktivními nebo chemicky reaktivními monosacharidy a nejvíce s použitím specifických lektinů a protilátek.

### **2.6.1 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je stále častěji využívaná metoda, která slouží k zjištění chemických struktur širokého spektra vzorků, hmotnosti a stanovení elementárního složení v elektrickém nebo magnetickém poli. Obecně se v hmotnostní spektrometrii pracuje s poměrem náboje a hmotnosti daného fragmentu/iontu. Proteiny se ve většině případů identifikují až po jejich rozštěpení proteázou, například trypsinem (Rappsilber et al., 2007). Existuje několik typů hmotnostní spektrometrie, zaměřím se pouze na typ MALDI-TOF/TOF MS, který je v práci zahrnut.

MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) je analytická ionizační metoda, při které je využito laserového záření. Kombinuje se s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight), který měří dobu průletu, a tak určuje rychlost částic. Touto technikou je možné zjistit molekulové hmotnosti, prostorové uspořádání a další detailní charakterizace molekul. Slouží k identifikaci DNA, RNA, proteinů a peptidů, glykolipidů a glykoproteinů, polysacharidů a různých dalších biomolekul.

Princip MALDI je založen na krystalizující matici (většinou aromatického charakteru) přidané ke vzorku, která zajišťuje absorpci světla určité vlnové délky, brání fragmentaci molekul a zajišťuje šetrnou ionizaci molekul vzorku (Rappsilber et al., 2007). V prvním kroku je vzorek smíchan s matricí na vhodném nosiči (nerezová destička) a je ozářen laserem velmi krátký časový úsek v rozmezí nanosekund. Matrice energii laserového paprsku absorbuje, čímž dochází k její desorpci a odpařování. Odpařující se částice matrice s sebou strhávají molekuly vzorku a převádějí je do plynného skupenství. V druhém kroku dochází k ionizaci vzorku molekulami matrice přenosem protonu. Ionty vygenerované MALDI následně



prochází trubicí detektoru letu, jehož princip závisí na detekci doby letu iontu mezi iontovým zdrojem a detektorem (Carbonnelle et al., 2011).

### 2.6.2 *Schiffovo barvení*

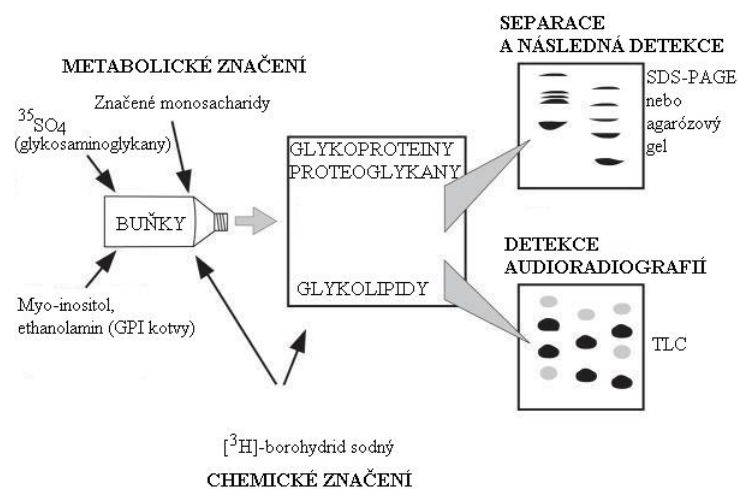
Jedna z nejzákladnějších metod detekce glykanů zahrnuje oxidaci vicinální hydroxylové skupiny jodistanem, po které následuje Schiffovo barvení (Wiederschain, 2009).

Jde o chemickou analytickou metodu, která je schopna prokázat přítomnost aldehydů a ketonů pomocí Schiffova činidla. Toto činidlo je tvořeno vodným roztokem barviva fuchsinu či pararosanilinu, ke kterému je přidán hydrogensířičitan nebo siřičitan. Pararosanilin či fuchsin mají růžové zbarvení, které se po přidání činidla jako je hydrogensířičitan či siřičitan odbarví. Principem tohoto testu je zářivě červeně-růžové zbarvení, které opět vznikne, když činidlo v roztoku chemicky reaguje s aldehydem či ketonem (Hardonk & Van Duijn, 1964).

Různé typy Schiffových činidel jsou používány i pro značení tkání, kdy mluvíme o detekci sacharidů, které obsahují aldehydovou skupinu. Je možné využít barvení i pro detekci DNA, v takovém případě o činidle mluvíme jako o Feulgenově reagentu. Obdobné reakce lze pak použít i pro reakci cukrů s jinými molekulami, které slouží k detekci glykanů/glykoproteinů jako např. činidla obsahující hydroxylaminovou skupinu (aminooxybiotin; Sterba et al., 2014).

### 2.6.3 *Radioaktivní značení*

Metoda detekce glykanů za využití radioaktivních struktur. Metabolické značení za pomoci inkubace buněk s monosacharidem obsahujícím [ $^3\text{H}$ ] nebo [ $^{14}\text{C}$ ] je schopné detekovat jakýkoliv glykokonjugát, do kterého je daný monosacharid buňkami zabudován. K detekci glykosaminoglykanů se používá  $^{35}\text{SO}_4$  a značený myo-inositol nebo ethanolamin k detekci GPI (glykofosfatidylinositol) kotev. Takto radioaktivně značené glykokonjugáty je poté možné separovat pomocí SDS-PAGE, pokud se jedná o glykoproteiny nebo proteoglykany, nebo TLC, pokud se jedná o glykolipidy (Obr. 3).



**Obrázek 3:** Znázornění možného značení při detekci glykanů; převzato z Wiederschain (2009).

#### 2.6.4 SDS-PAGE a imunoblotting nebo lektinoblotting

Jde o kombinaci dvou laboratorních metod – elektroforézy a následné vizualizaci, kterou předchází mezistupeň, který nazýváme blotting. Pomocí blottingu je možné detekovat DNA, RNA, proteiny a glykoproteiny (Bartůňková, 2005).

SDS-PAGE je separační metoda, která slouží pro separaci proteinů v elektrickém poli za použití polyakrylamidového gelu. Při detekci glykanů je nutno nejdříve rozdělit proteiny ve vzorku podle této metody a následně separovaný gel přenést na nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu elektroblotem. Poté je membrána inkubována s lektiny (v případě lektinoblottingu) nebo protilátkami (v případě imunoblottingu) specifickými pro daný glykan a vzniklé proužky na membráně následně vizualizovány pomocí vyvíjejícího roztoku (daný podle konjugátu použitého při imunoblotu, př. alkalická fosfatáza; Wiederschain, 2009).

Lektiny jsou proteiny, které jsou schopné se vázat na specifické sacharidové struktury, ať už ve volné podobě nebo vázané na proteiny, lipidy apod. V přírodě se nacházejí téměř všude, u živočichů i u rostlin. Většinou obsahují dvě a více vazebných míst pro sacharidové jednotky. Vazby, které vznikají mezi lektiny a sacharidy jsou relativně slabé, avšak dokáží se vázat na určitý glykan v celé škále ostatních a jejich vazba na takový glykan je vysoce afinitní. Proto se antiglykanové protilátky a lektiny používají k detekci glykanů velmi rozšířeně.

## 3 MATERIÁLY A METODY

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 *Afinitní chromatografie za použití magnetických kuliček*

Magnetické kuličky: PureProteome™ Streptavidin Magnetic Beads (Merck Millipore)

1x PBS pH 7,4: 0,137 M NaCl, 2,68 mM KCl, 2,57 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PBS)

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

Halt™ Inhibitory proteáz (100x) (Thermo Fisher Scientific)

Biotinylated *Griffonia simplicifolia* Lectin I (GSL I) isolectin B4 (Vector Laboratories) (GSL B4)

#### 3.1.2 *Srážení proteinů a BCA Assay*

Metanol

Chloroform

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

10% SDS (dodecylsírán sodný)

#### 3.1.3 *SDS-PAGE*

30 % Akrylamid/bisakrylamid (Rotiphorese® Gel 30 směs akrylamidu a bis-akrylamidu 37,5:1, Carl Roth)

10% APS: 10% persíran amonný

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, SERVA)

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

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

4x redukující pufr: 0,2% bromfenolová modř, 40% glycerol, 8% SDS, 0,2M Tris, pH 6,8, 100 mM dithiothreitol

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

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

### 3.1.4 *Barvení gelů*

Blue Silver Coomassie: 10% kyselina fosforečná, 10% síran amonný, 20% metanol, 0,12

Coomassie G-250

Kyselina fosforečná

Etanol

Kyselina octová

Thiosíran sodný

Uhličitan sodný

Dusičnan stříbrný

Formaldehyd

### 3.1.5 *Western blotting*

Metanol

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

PBS, PBST

5% sušené mléko v PBST (pH 7,4)

Blot-QuickBlocker™ (G-Biosciences)

Biotinylated *Griffonia Simplicifolia* Lectin I (GSL I) isolectin B4

Goat Anti-Biotin (Vector Laboratories)

Alkaline Phosphatase Anti-Goat IgG (Vector Laboratories)

Vyvíjecí roztok: 1x BCIP/NBT, 100 mM Tris pH 9,5, 0,1 M NaCl a 10 mM MgCl<sub>2</sub>

PVDF membrána: polyvinyliden difluorid (GE Healthcare)

### 3.1.6 *Značení klíčících buněk pro fluorescenční mikroskopii*

PBS

Fixační roztok: 4% paraformaldehyd v PBS

Permeabilizační roztok: 0,25% Triton X-100 v PBS

Chlorid amonný

Blokovací roztok: 3% BSA (Bovine serum albumin) v PBS

1% BSA v PBS

Biotinylated *Lens culinaris* Agglutinin (Vector Laboratories) (LCA)

Biotinylated *Griffonia Simplicifolia* Lectin I (GSL I) isolectin B4  
Rabbit Anti-Peroxidase, Horseradish (US Biological) (anti-HRP)  
Streptavidin DyLight® 549 (Vector Laboratories): ředění 1:1000 v 1% BSA v PBS pH 7,4  
Streptavidin DyLight® 488 (Vector Laboratories): ředění 1:1000 v 1% BSA v PBS pH 7,4  
VECTASHIELD® Mounting Medium s DAPI (Vector Laboratories)  
Klíštěcí buněčné linie IRE 11 a IRE/CTVM-20

### ***3.1.7 Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii***

0,1 M hydrogenuhličitan amonný  
25mM TCEP  
330 mM jodacetamid  
330 mM DTT (Dithiothreitol, Life Sciences)  
Sequencing Grade Modified Trypsin (1:50, Promega)  
Metanol  
Isopropanol  
Kyselina mravenčí  
Octan amonný  
Acetonitril (ACN)  
Kyselina trifluoroctová (TFA)  
CHCH matrice ( $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Afinitní chromatografie za použití magnetických kuliček

Pro purifikaci proteinů nesoucích  $\alpha$ Gal epitop z lyzátů klíčících buněk bylo využito afinitní chromatografie s využitím biotinylovaného lektinu GSL I B4 a magnetických kuliček se streptavidinem.

Do dvou mikrozkušavek bylo ze suspenze magnetických kuliček odebráno 100  $\mu$ l (označená „lektin“) a 50  $\mu$ l, suspenze („kontrola“). Kuličky byly třikrát promyty 1 ml PBS tak, že mikrozkušavky byly vždy vortexovány několik sekund, poté umístěny do magnetického stojánku a ze zkumavek byl opatrně odebrán supernatant tak, aby pelet zůstal netknutý. Obdobně probíhalo každé promytí kuliček.

Po promývání bylo do zkumavky „lektin“ přidáno 5  $\mu$ l biotinylovaného GSL I B4 ve 200  $\mu$ l PBS a do zkumavky „kontrola“ 5  $\mu$ l PBS. Po promíchání byly zkumavky inkubovány 30 minut na rotátoru. Po inkubaci s lektinem byly kuličky zbaveny přebytečného roztoku a znovu byly třikrát promyty 1 ml PBS. Dále byly kuličky inkubovány s 200  $\mu$ l vzorku (obsah proteinů 50  $\mu$ g) v PBS a přidavkem 2  $\mu$ l inhibitorů proteáz 1 hodinu na rotátoru.

Následovně byly zkumavky zbaveny supernatantu, který byl přenesen do nových zkumavek označených jako FT („flow-through“). Poté byly vzorky 3x promyty 1 ml PBS, přičemž supernatant byl uchován v nových mikrozkušavkách jako W1-W3 („wash“). Nakonec byly magnetické kuličky promyty 3x 1 ml PBST a znovu z nich byl vždy odebrán supernatant do mikrozkušavek popsaných jako W4-W6. Kuličky byly po přidání 10  $\mu$ l PBS a 0,1  $\mu$ l inhibitorů proteáz a uloženy do mrazáku (-80 °C) pro následnou separaci proteinů pomocí SDS-PAGE a identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Roztoky FT a W1-W6 byly také uchovávány v mrazáku pro následné srážení proteinů a měření koncentrací.

### 3.2.2 Srážení proteinů a BCA Assay

U všech frakcí z purifikace byla provedena precipitace proteinů za účelem jejich zakoncentrování. U FT frakcí bylo pro srážení použito 100  $\mu$ l, jelikož jejich objem získaný z purifikace byl nižší a obsah proteinů vyšší, a z frakcí W bylo použito pro srážení 200  $\mu$ l. Poté byly ke každému vzorku přidány postupně všechny reagentie a po každém kroku byla směs pečlivě zvortexována. Na každých 100  $\mu$ l bylo přidáno 400  $\mu$ l metanolu, 100  $\mu$ l chloroformu a 300  $\mu$ l destilované vody. Následovala centrifugace po dobu 3 minut na

maximální otáčky, po které vzniklo v mikrozkuvkách viditelné rozhraní, ve kterém se nacházely proteiny, a proto bylo důležité odebrat pouze vrchní vrstvu.

Po tomto kroku bylo na každých 100  $\mu\text{l}$  znovu přidáno dalších 400  $\mu\text{l}$  metanolu, směs byla zvortexována a centrifugována po dobu 10 minut na maximální otáčky. Po centrifugaci byl odebrán všechnen supernatant tak, aby v mikrozkuvce zůstal pouze pelet sražených proteinů na dně, který byl vysušen při laboratorní teplotě. Pelety byly rozpuštěny ve 30  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru (4% SDS v PBS s inhibitory proteáz.) Výsledná směs byla pečlivě zvortexována a 10 minut sonikována v sonikační lázni.

V zakoncentrovaných vzorcích z afinitní chromatografie byla zjištěna koncentrace proteinů pomocí BCA. Do 96-jamkového panelu pro BCA Assay bylo napipetováno vždy 5  $\mu\text{l}$  vzorků získaných ze srážení spolu s 20  $\mu\text{l}$  destilované vody, a 25  $\mu\text{l}$  standardů. Následně bylo ke vzorkům přidáno 200  $\mu\text{l}$  reakční směsi. Panel byl 30 minut inkubován při 37°C. Koncentrace byla měřena zařízením

### 3.2.3 *Polyakrylamidová gelová elektroforéza*

Pro separaci proteinů dle jejich molekulové velikosti byla použita polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE). Pro separaci byl použit separační gel obsahující 12 % akrylamid/bisakrylamid, 0,1 % APS, 0,375 M Tris-base (pH 8,8) a 0,04 % TEMED. Zaostřovací gel obsahoval 5 % akrylamidu/bisakrylamidu, 0,25 M Tris-base (pH 6,8, 0,1 % SDS) 0,1 % APS a 0,01 % TEMED.

Vzorky pro elektroforetickou separaci byly smíchány s 4x redukujícím vzorkovým pufrům s DTT a 10 minut zahřívány při 70 °C. Kuličky byly také smíchány s 4x redukujícím pufrům, hodinu inkubovány, zahřáty při 60 °C a zcentrifugovány. Pro elektroforetickou separaci byl použit pouze supernatant. Elektroforéza byla prováděna v sestavené aparatuře Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) s využitím 1x elektrodového pufru. Na každý gel byl do jedné jamky nanesen proteinový marker.

Elektroforéza byla nejprve prováděna při 100 V a po vstupu vzorků do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla zastavena, když čelo vzorků dosáhlo konce gelu a celá elektroforéza probíhala přibližně 1 hodinu a 45 minut. Po dokončení separace byly gely použity pro western blotting, případně nabarveny Blue Silver Coomassie a následně stříbrem.

### 3.2.4 *Barvení gelů*

#### a) Blue Silver Coomassie

Polyakrylamidové gely byly fixovány 20 minut v 50% ethanolu s 2% kyselinou fosforečnou, promyty destilovanou vodou a následně přeneseny do barvicího roztoku Blue Silver Coomassie přes noc. Následně byly gely opláchnuté v destilované vodě a po dostatečném odbarvení pozadí byly foceny dokumentačním zařízením (G:BOX Chemi XX6, Syngene).

#### b) Barvení stříbrem

Gely byly promyty destilovanou vodou následně vloženy do fixačního roztoku (30% ethanol, 20% kyselina octová) po dobu 30 minut na třepačce. Po fixaci byly gely 2x promyty promývacím roztokem (20% ethanol) po dobu 10 minut a 2x destilovanou vodou. Následně byly gely vloženy do senzitivizačního roztoku (0,005% thiosíran sodný) na 30 minut ve tmě na třepačce. Po senzitivizaci byly gely 2x promyty v destilované vodě po 5 minutách a vloženy do barvicího roztoku (0,1% dusičnan stříbrný) na 20 minut ve tmě bez třepání. Nakonec byly gely zběžně propláchnuté destilovanou vodou a vloženy do vyvolávacího roztoku (3% uhličitan sodný, 0,005% formaldehyd, 0,025% thiosíran sodný) a ručně protřepávány, dokud nedošlo k dostatečnému obarvení proteinových proužků. Poté se gely vložily do roztoku 5% kyseliny octové, která zastavila vyvolávání. Na závěr byly gely promyty v destilované vodě a foceny dokumentačním zařízením.

### 3.2.5 *Western Blotting*

Proteiny separované SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF membránu v blotovací aparatuře (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad) s využitím 1x blotovacího pufru. Blotování probíhalo 30 minut při 25 V. Po dokončení přenosu byla membrána omyta destilovanou vodou, zalita 10 ml blokovacího roztoku (5% BLOT-QuickBlocker v PBS) a inkubována buďto 1 hodinu při laboratorní teplotě nebo při 4 °C přes noc.

Po tomto kroku byla membrána 3x promyta PBST 5-10 minut a poté inkubována jednu hodinu s biotinylovaným lektinem GSL B4 (v 5% BLOT-QuickBlocker v PBST v ředění 1:1000). Poté byla membrána znovu 3x promyta PBST a 1 hodinu inkubována s goat Anti-Biotin protilátkou v 5% BLOT-QuickBlocker v PBST v ředění 1:1000.



Následovně byla membrána znovu 3x promyta PBST a inkubována 1 hodinu s Anti-Goat IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou v 5% BLOT-QuickBlockeru v PBST (1:1000). Nakonec byla membrána znovu promyta a nechána vyvíjet ve vyvíječím roztoku, dokud nebylo možné identifikovat viditelné proužky. Poté byla membrána promyta v destilované vodě a nechána uschnout.

### 3.2.6 *Fluorescenční mikroskopie*

K přípravě buněk pro fluorescenční mikroskopii byly vybrány buňky klíčecích linií IRE 11 a IRE/CTVM 20. Lyzáty buněk byly po každé inkubaci centrifugovány 3 minuty při 1500 otáčkách. Pelet buněk v mikrozkuvkách byl promyt 1 ml PBS a následovně 1 hodinu fixován 4% paraformaldehydem v PBS při laboratorní teplotě.

Poté byly buňky permeabilizovány 1 ml permeabilizačního roztoku po dobu 15 minut. Poté byly buňky promyty 1% BSA po dobu 10 minut a blokovány 1 hodinu v roztoku 50 mM NH<sub>4</sub>Cl v 3% BSA a promývány 10 minut v PBS. Po tomto kroku byly buněčné suspenze rozsuspendovány v 1 ml PBS, rozděleny do čtyř mikrozkuvek po 250 µl a buňky byly v každé protilátce anebo lektinu inkubovány 1 hodinu v 1% BSA/PBS, ve všech případech ředění 1:1000 (Tab. 1).

Po inkubaci s primární protilátkou byly buňky 3x promývány 1 ml 1% BSA/PBS 10 minut a inkubovány v roztoku fluorescenčně značené sekundární protilátky anebo lektinu (Tab 1.) v 1% BSA/PBS po 1 hodinu ve tmě. Následující kroky již probíhaly při ztlumeném světle. Nakonec byly vzorky 3x promyty 1% BSA/PBS po dobu 10 minut.

**Tabulka I.:** Značení buněk protilátkou anebo lektinem pro fluorescenční mikroskopii.

Primární protilátka či lektin	GSLB4	LCA	Anti-HRP	Kontrola
Sekundární protilátka	DyLight® 549 Streptavidin	DyLight® 549 Streptavidin	DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG	DyLight® 549 Streptavidin

Pro finální přípravu vzorků k fluorescenční mikroskopii byly vzorky fixovány na podložní sklíčko za pomoci Cyto-System Bio-Seal (Hettich). Buněčná suspenze v 1x PBS byla

napipetována do komůrek po 200  $\mu$ l. Ty byly následovně pevně uzavřeny a centrifugovány při 4000 otáčkách 10 minut.

Po skončení centrifugace byl z podložního skla odstraněn přebytek roztoku, buňky byly usušeny při pokojové teplotě, zakápnuty kapkou mountovacího média Vectashield s obsahem DAPI a zakryty krycím sklíčkem. Krycí sklo bylo k podložnímu zabezpečeno pomocí laku na nehty. Takto připravené a zafixované buňky pro fluorescenční mikroskopii byly uloženy při 4 °C.

### 3.2.7 *Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii*

PBS, ve kterém byly magnetické kuličky po afinitní chromatografii ponechány, bylo vyměněno za 20  $\mu$ l 0,1 M hydrogenuhličitanu amonného. Následně byly kuličky redukovány 45 minut přidáním 5  $\mu$ l 25 mM TCEP a alkylovány 5  $\mu$ l 330 mM jodacetamidem 25 minut ve tmě. Výsledné množství bylo inkubováno s 5  $\mu$ l 330 mM DTT 10 minut při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno 165  $\mu$ l hydrogenuhličitanu amonného a trypsin (1:50). Vše bylo společně inkubováno přes noc při 37 °C, aby trypsin mohl naštěpit proteiny.

Kuličky byly následně centrifugovány a k supernatantu, odebraného do nové mikrozkušavky, bylo přidáno 10  $\mu$ l kyseliny mravenčí. Výsledný roztok byl rozdělen na dvě části, z nichž jedna byla využita pro separaci pomocí C<sub>18</sub>-SCX StageTip a druhá pro separaci peptidů ve zvyšujícím se gradientu acetonitrilu v mikrokolonce.

#### 3.2.7.1 *Fracionace a odsolení s využitím StageTips*

K tomuto kroku byly potřeba připravit dvě StageTips s C<sub>18</sub>-SCX sorbenty šetrně natlačenými ve špičce a 16 mikrozkušavek. Takto připravené špičky byly vloženy do mikrozkušavky. Po každém kroku (přidání pufru) byly špičky centrifugovány 2 minuty při 1500 otáčkách nebo tak dlouho, dokud se špička nevyprázdnila (Rappsilber et al., 2007).

Pufry potřebné k frakcionaci a odsolování:

**Pufř 1** (0,5% kyselina mravenčí)

**Pufř 2** (0,5% kyselina mravenčí, 80% acetonitril)

**Pufř 3** (50mM octan amonný, 0,5% kyselina mravenčí, 20% acetonitril)

**Pufř 4** (150 mM octan amonný, 0,5 kyselina mravenčí, 20% acetonitril)

**Pufř 5** (300 mM octan amonný, 0,5 kyselina mravenčí, 20% acetonitril)

**Pufř 6** (500 mM octan amonný, 0,5% kyselina mravenčí, 20% acetonitril)

Následně bylo k sorbentu přidáno 40  $\mu$ l metanolu, poté 40  $\mu$ l pufru 2, 40  $\mu$ l pufru 1, 40  $\mu$ l pufru 6. a nakonec 40  $\mu$ l pufru 1. Poté bylo zvlášť do špiček přidáno 100  $\mu$ l supernatantu z magnetických kuliček konjugovaných s lektinem a 100  $\mu$ l supernatantu z magnetických kuliček kontroly a získaný eluát byl při centrifugaci při 700 otáčkách po 4 minuty stočen do mikrozkušavek označených FT (flow-through). Poté byly špičky promyty 40  $\mu$ l pufru 1 a 40  $\mu$ l pufru 2. Nakonec následovala frakcionace, kdy byly špičky promyty 40  $\mu$ l pufru 3 a získaný eluát byl přenesen do zkumavky označené FT0.

C<sub>18</sub>-SCX špička byla promyta 40  $\mu$ l pufru 2 k přenesení peptidů z C<sub>18</sub> sorbentu na SCX sorbent. Následovně byly peptidy eluovány pomocí pufrů 3-6 a jednotlivé frakce byly sbírány do vlastních mikrozkušavek. Ke všem frakcím bylo přidáno 120  $\mu$ l pufru 1 ke snížení koncentrace acetonitrilu. Pro odsolení frakcí bylo připraveno 8 StageTips, obsahující pouze sorbent C<sub>18</sub>, a vloženo do mikrozkušavek. Ty byly dvakrát promyty 50  $\mu$ l isopropanolu a dvakrát 50  $\mu$ l 5 % kyseliny mravenčí. Frakce byly naneseny na C<sub>18</sub> StageTips, které byly pak promyty 40  $\mu$ l pufru 1. Posledním krokem byla eluce 20  $\mu$ l pufru 2, která byla opakována a jímána do stejné mikrozkušavky,

Tyto frakce byly následně vysušeny vakuem (Speed-Vac, Labconco), rozpuštěny ve 20  $\mu$ l 0,1 % TFA a použity pro analýzu na MALDI-TOF/TOF.

### 3.2.7.2 2. *Separace peptidů ve zvyšujícím se gradientu acetonitrilu v mikrokolonce*

Nejdříve byla připravena mikrokolonka (FEP trubička, fluorovaný ethylen-propylen), do které byl vložen skleněný disk a SGE mikrostríkačkou přidány C18 disky (stacionární fáze). Mikrokolonka byla promyta 10  $\mu$ l 80% acetonitrilu. Následně bylo do mikrostríkačky nabráno postupně 5  $\mu$ l 0,1 % TFA, 20  $\mu$ l vzorku (v případě pre-frakcionovaných vzorků 5  $\mu$ l) a znovu 5  $\mu$ l 0,1 % TFA. Poté byl konec stríkačky vložen do mikrokolonky a celá mikrostríkačka připevněna do stojanu. Nahoru bylo položeno příslušné závaží tak, aby vzorek postupně protekl mikrokolonkou.

Po přidání vzorku byl vytvořen mikrogradient, kdy do mikrostríkačky bylo postupně nabráno 8  $\mu$ l 80% ACN, 2  $\mu$ l 50% ACN, 2  $\mu$ l 32% ACN, 2  $\mu$ l 24% ACN, 2  $\mu$ l 16% ACN, 2  $\mu$ l 8% ACN a 2  $\mu$ l 2% ACN. Poté byl konec stríkačky znovu vložen do mikrokolonky a mikrostríkačka upevněna a zatížena závažími ve stojanu. Eluát z mikrokolonky byl po 0,5  $\mu$ l odebírán na destičku pro MALDI (Franc et al., 2012). Nakonec bylo ke každé kapce přidáno 0,5  $\mu$ l CHCH matrice. Pečlivě zaschnuté vzorky byly měřeny hmotnostním spektrometrem Autoflex Speed (Bruker).

## 4 VÝSLEDKY

Při prvních pokusech o detekci proteinů, získaných z afinitní chromatografie pomocí SDS-PAGE a jejich následovné značení docházelo k neuspokojivým výsledkům. V prvních pokusech jsme nebyli schopni detekovat skoro žádné proteiny, proto bylo rozhodnuto změnit značení na trojitě. Poté byla každá membrána značena systémem:

1. biotinylovaný GSL B4
2. protilátka goat Anti-biotin
3. protilátka Anti-Goat IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou.

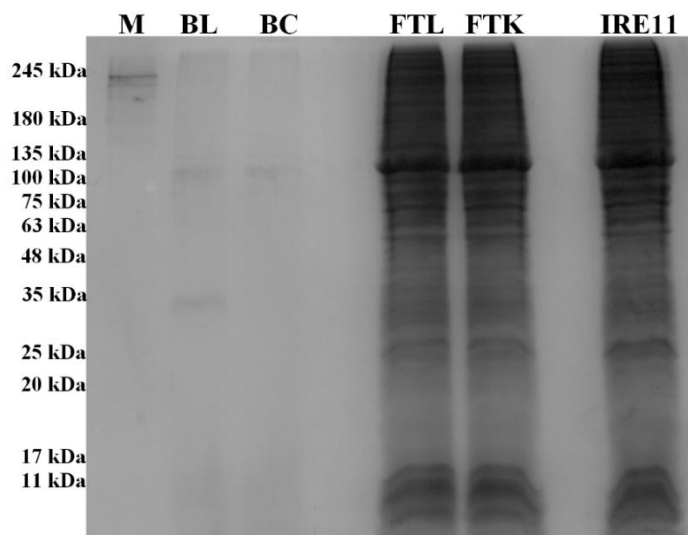
Při měření koncentrací proteinů ve frakcích získaných z afinitní chromatografie docházelo k získání jen velmi nízkých koncentrací a následně slabému signálu jak na gelech, tak membránách, proto se koncentrace proteinu ve vzorku IRE 11, se kterým byly kuličky inkubovány, zvýšila z 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  na 1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  a koncentrace lektinu byla změněna na 1:500 místo 1:1000 k dosažení co nejlepšího signálu.

Signály byly po provedení změny koncentrace stále nízké, což se dalo očekávat, vzhledem k nízkým koncentracím z frakcí, které byly změřeny po provedení po afinitní chromatografie (Tab. II.), ale již jsme byli schopni proužky jasně detekovat.

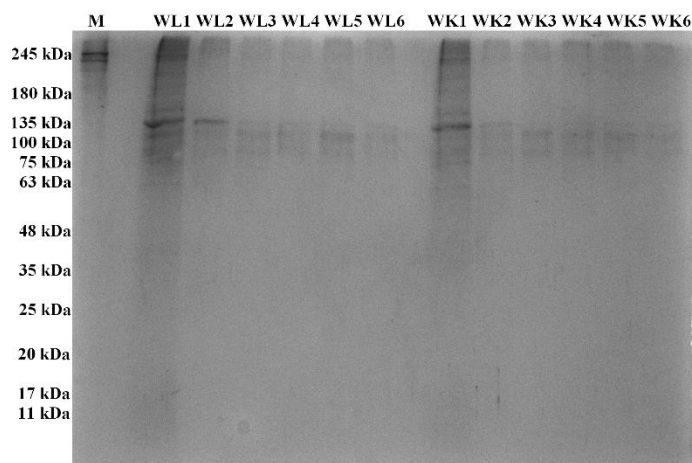
**Tabulka II:** Koncentrace zjištěné pomocí BCA Assay z frakcí získaných purifikací proteinů za použití afinitní chromatografie s využitím magnetických kuliček.

	Koncentrace $\mu\text{g}/\text{ml}$		Koncentrace $\mu\text{g}/\text{ml}$
Flow-through lektin	487,7	Flow-through kontrola	516,9
Wash 1 lektin	60,0	Wash 1 kontrola	28,5
Wash 2 lektin	6,2	Wash 2 kontrola	3,8
Wash 3 lektin	1,5	Wash 3 kontrola	4,6
Wash 4 lektin	4,6	Wash 4 kontrola	0,8
Wash 5 lektin	13,1	Wash 5 kontrola	6,2
Wash 6 lektin	3,1	Wash 6 kontrola	3,8

Frakce získané z afinitní chromatografie byly následovně vysráženy, nanесeny na gel a elektroforeticky separovány. Gely byly obarveny Blue Silver Coomassie (Obr. 4 a 5).



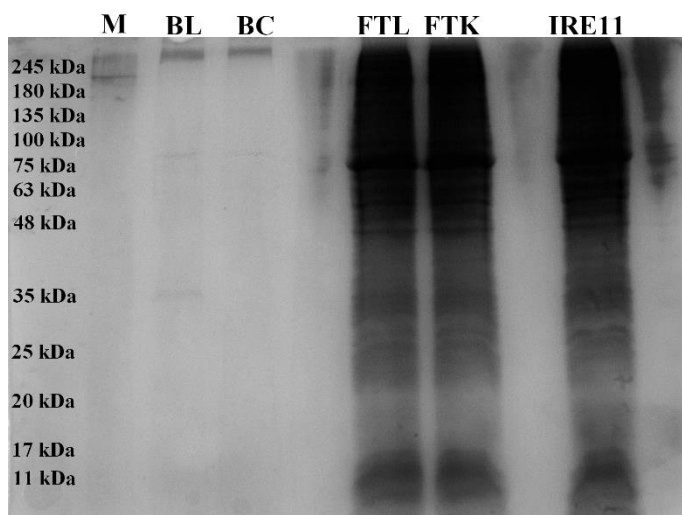
**Obrázek 4:** Proteiny separované pomocí SDS-PAGE barvené Blue Silver Coomassie. M – marker, BL – purifikované proteiny na kuličkách s navázaným biotinylovaným GSL-B4, BC – kontrola kuličky, FTL – flow-through vzorku po použití kuliček s biotinylovaným GSL B4, FTK – flow-through kontroly, IRE 11 – lyzát klíčecích buněk IRE 11 ( $c= 1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ).



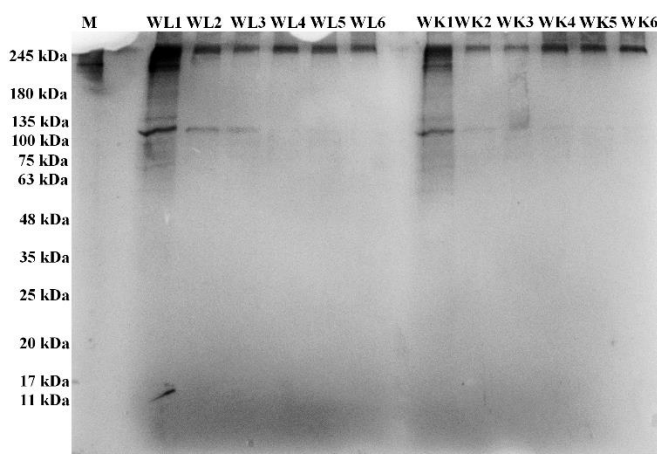
**Obrázek 5:** Proteiny separované pomocí SDS-PAGE barvené Blue Silver Coomassie. M – marker, WL1 – wash kuliček s biotinylovaným GSL B4 po promytí 1. 1x PBS, WL2 – po 2. 1x PBS, WL3 – po 3. 1x PBS, WL4 – wash kuliček s biotinylovaným GSL B4 po promytí 1. PBST, WL5 – po 2. PBST, WL6 – po 3. PBST, WK1 – wash kuliček kontroly po promytí 1. 1x PBS, WK2 – po 2. 1x PBS, WK3 – po 3. 1x PBS, WK4 – wash kuliček kontroly po promytí 1. PBST, WK5 – po 2. PBST, WK6 – po 3. PBST.

U proteinů barvených pomocí Blue Silver Coomassie byl u frakcí BL a BC pouze slabý signál, a proto bylo rozhodnuto, že purifikované proteiny nebudou z gelu vyřezávány pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Místo toho byly použity přímo magnetické kuličky s imobilizovanými proteiny.

Po vyfocení gelů obarvených Blue Silver Coomassie byly gely ještě nabarveny stříbrem pro získání silnějšího signálu (Obr. 6 a 7).

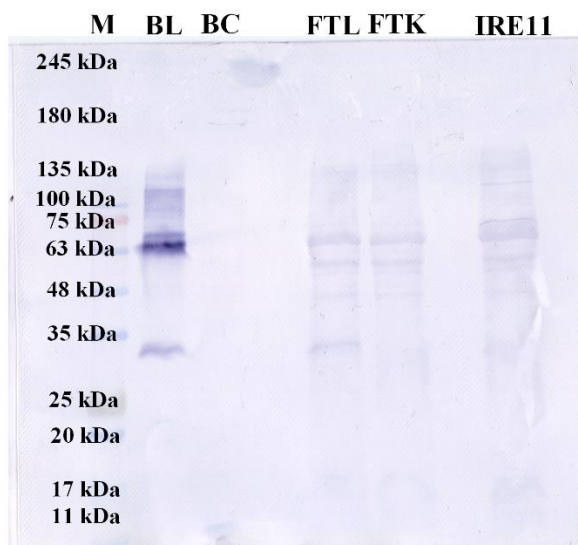


**Obrázek 6:** Proteiny separované pomocí SDS-PAGE barvené stříbrem. M – marker, BL – purifikované proteiny na kuličkách s navázaným biotinylovaným GSL B4, BC – kontrola vzorku kuliček kontroly, FTL – flow-through vzorku po použití kuliček s biotinylovaným GSL B4, FTK – flow-through kontroly, IRE 11 – lyzát klíštěcích buněk IRE 11 ( $c= 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).



**Obrázek 7:** Proteiny separované pomocí SDS-PAGE barvené stříbrem. M – marker, WL1 – wash kuliček s biotinylovaným GSL B4 po promytí 1. 1x PBS, WL2 – po 2. 1x PBS, WL3 – po 3. 1x PBS, WL4 – wash kuliček s biotinylovaným GSL B4 po promytí 1. PBST, WL5 – po 2. PBST, WL6 – po 3. PBST, WK1 – wash kuliček kontroly po promytí 1. 1x PBS, WK2 – po 2. 1x PBS, WK3 – po 3. 1x PBS, WK4 – wash kuliček kontroly po promytí 1. PBST, WK5 – po 2. PBST, WK6 – po 3. PBST.

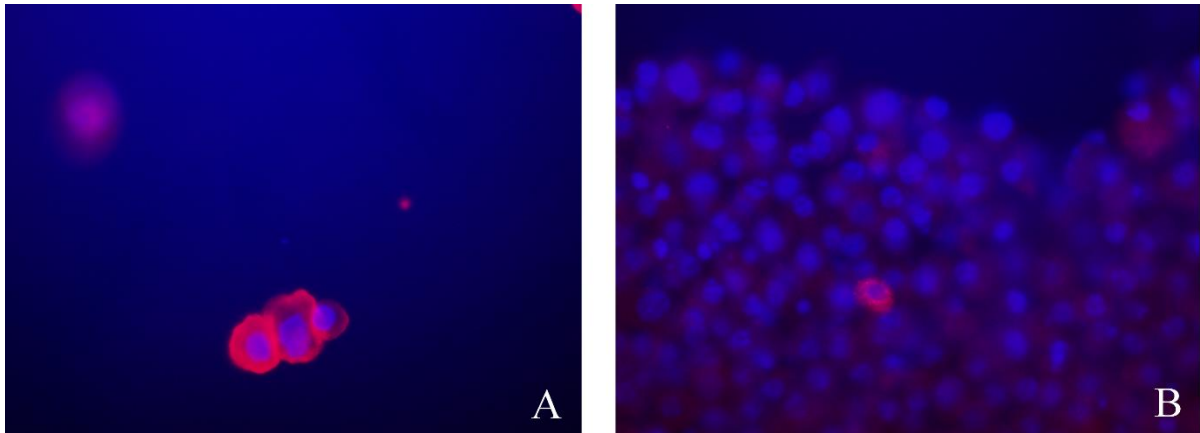
Proteiny byly přenesené elektroblotem na PVDF membránu, která byla následně značená biotinylovaným GSL B4 (1:500), goat Anti-biotin protilátkou (1:1000) a Anti-Goat IgG protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000) (Obr. 8).



**Obrázek 8:** Detekce proteinů s využitím trojího značení: biotinylovaný GSL B4, goat Anti-Biotin protilátka a Anti-Goat protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou. M – marker, BL – purifikované proteiny na kuličkách s navázaným biotinylovaným GSL B4, BC – kontrola kuličky, FTL – flow-through vzorku po použití kuliček s biotinylovaným GSL B4, FTK – flow-through kontroly, IRE 11 – lyzát klíččích buněk IRE 11 ( $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

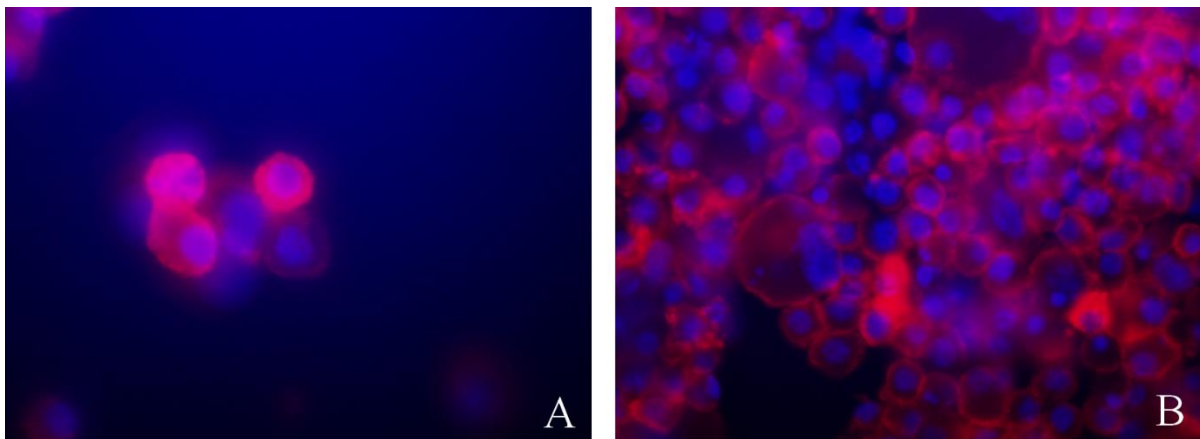
Na membráně je detekovatelný protein o přibližné velikosti 100kDa, což značí protein nesoucí  $\alpha\text{Gal}$  epitop, na který se navázal GSL I B4 lektin, jehož velikost je 114 kDa Při detekci proteinů pomocí westernu blotu u promývaných frakcí („wash“) získaných z afinitní chromatografie došlo vzhledem k nízkým koncentracím jen k velmi slabému signálu na membráně, a proto není výsledek v této práci zahrnut.

Při sledování buněk fluorescenčním mikroskopem jsme byli schopni detekovat  $\alpha\text{Gal}$  epitop v buněčných strukturách.



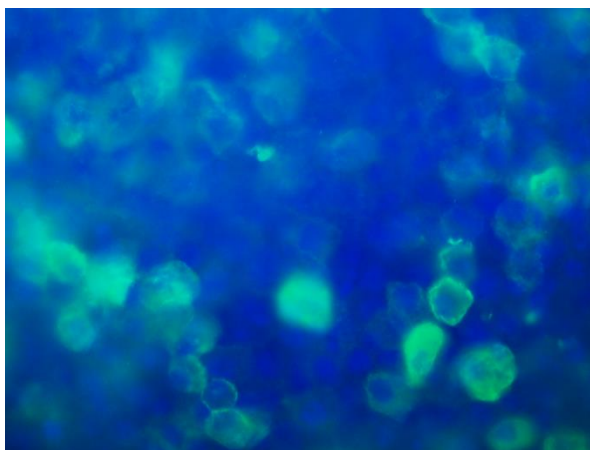
**Obrázek 9:**  $\alpha$ Gal detekovaný v buňkách IRE 11 pomocí fluorescenční mikroskopie se značením biotinylovaným GSL B4 biotinem a DyLight® 549 Streptavidinem. Červená – DyLight® 549 Streptavidin, modrá – DAPI (značení DNA v jádře) A: přiblížení 600x, B: přiblížení 400x.

Pro porovnání jsme použili i protilátky a lektiny k detekci core  $\alpha$ -1,3-fukózy.



**Obrázek 10:** Core  $\alpha$ -1,3-fukóza detekovaná v buňkách IRE 11 pomocí fluorescenční mikroskopie se značením biotinylovaným LCA a DyLight® 549 Streptavidinem. Červená – DyLight® 549 Streptavidin, modrá – DAPI (značení DNA v jádře) A: přiblížení 600x, B: přiblížení 400x.





**Obrázek 11:** Core  $\alpha$ -1,3-fukóza detekovaná v buňkách IRE 11 pomocí fluorescenční mikroskopie se značením Anti-HRP a DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG. Zelená - DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG, modrá – DAPI (značení DNA v jádře), přiblížení 600x.

Množství detekované core  $\alpha$ -1,3-fukózy je značně větší, než u  $\alpha$ Gal, jelikož core  $\alpha$ -1,3-fukózu jsme byli schopni sledovat v téměř všech buňkách.  $\alpha$ Gal se oproti tomu vyskytuje v menším množství pouze u několika buněk z celé populace. Z výsledků je patrné, že se tyto dva epitopy vyskytují především ve formě membránových proteinů a jejich funkcí je komunikace s ostatními buňkami a exkrece. Podobných výsledků bylo dosaženo u klíčící buněčné linie IRE/CTVM-20.

Při identifikaci purifikovaných proteinů zachycených na magnetických kuličkách hmotnostní spektrometrií bohužel jsme nezískali žádné prokazatelné výsledky, pravděpodobně vzhledem k nízkým koncentracím. Jediný proteinem, který jsme byli schopni identifikovat, byl streptavidin, se kterým byly magnetické kuličky konjugovány. Výsledek proto není v práci zahrnut.

## 5 DISKUZE

V mé bakalářské práci bylo cílem detekovat  $\alpha$ Gal epitopy v klíčcích buněk. Tento typ epitopu byl zvolen kvůli současnému fenoménu zvaný alergie na červené maso, který způsobuje (Commins et al., 2016). Normálně se  $\alpha$ Gal vyskytuje jako antigenní determinanta červených krvinek u všech savců kromě primátů a opic čeledi kočkodanovitých. V nedávných letech si  $\alpha$ Gal epitop získal určitou slávu, a proto je na místě, aby bylo zjištěno, čím je alergie na červené maso zapříčiněna a na jakém principu vlastně funguje. Alergie se vyskytuje v regionech, ve kterých se vyskytuje klíště *I. ricinus* (Evropa), *A. americanum* (Spojené státy americké) a *I. holocyclus* (Austrálie; Saleh et al., 2012).

Pro detekci  $\alpha$ Gal byly vybrány lyzáty buněčných linií z klíštěte *I. ricinus*, u kterého byl již tento glykan objeven v jeho trávicím traktu (Hamsten et al., 2013). Nejdříve byly proteiny purifikovány afinitní chromatografií s použitím magnetických kuliček a biotinylovaného lektinu GSL B4. Biotin, jako značka na lektinu, je hojně využíván pro svou stabilitu a interakce s avidiny a streptavidiny. GSL B4 se specificky váže právě na  $\alpha$ Gal a byl využit i pro následnou vizualizaci glykoproteinů nesoucí tento glykan (<https://vectorlabs.com/biotinylated-gsl-i-isolectin-b4.html>).

Získané frakce proteinů byly nanášeny na polyakrylamidový gel a elektroforeticky separovány pomocí SDS-PAGE. Takto separované proteiny byly přeneseny blotem na PVDF membránu a následně značené. Nejdříve byly proteiny značené biotinylovaným GSL B4, poté byla membrána inkubovaná s goat Anti-biotin protilátkou a nakonec Anti-Goat IgG protilátkou, která byla konjugovaná s alkalickou fosfatázou a po přidání vyvíjejícího roztoku zajistila viditelný signál.

Kvůli problémům s detekcí byl pokus několikrát upravován a optimalizován. Byla změněna koncentrace lyzátu ve vzorku IRE 11, se kterým byly kuličky inkubovány. Z původních 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  byla koncentrace zvýšena na 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Spolu s tímto byla upravena koncentrace GSL B4, se kterým byla inkubována PVDF membrána, z 1:1000 na 1:500 a všechny ostatní koncentrace zůstaly stejné. Po této změně již byla detekce o dost snazší, z čehož můžeme usoudit, že u klíšťat, resp. u používaných klíčcích buněčných linií, není velké množství proteinů nesoucí  $\alpha$ Gal epitop a proto je nutné použít vyšší koncentrace k jejich detekci. Přítomnost  $\alpha$ Gal epitopu v liniích z klíštěte *I. ricinus* tedy byla prokázána a je to první průkaz tohoto epitopu v liniích IRE.

U frakcí z průběhu purifikace vzorků bylo na membráně dosaženo stále slabých signálů, což bylo pravděpodobně zapříčiněno nízkými koncentracemi proteinů ve frakcích. Jasně detekovatelné proužky proteinů nesoucích  $\alpha$ Gal epitop už ale byly viditelné u frakcí z magnetických kuliček a ve flow-through, stejně jako v lyzátu buněk klíštěcí buněčné linie IRE 11. Vzhledem k tomu, že jsme si ověřili přítomnost glykoproteinů nesoucích  $\alpha$ Gal epitop na kuličkách, byly tyto kuličky použity pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Druhým způsobem detekce  $\alpha$ Gal, který byl v této práci zahrnut, je fluorescenční mikroskopie. Lyzáty buněk IRE/CTVM-20 a IRE 11 byly značeny biotinylovaným GSL B4 a následně DyLight® 549 Streptavidinem, fixovány na sklíčko pomocí Cyto-System Bio-Seal (Hettich) a zakápnuty mountovacím médiem Vectashield s DAPI. Takto značené buňky byly sledovány fluorescenčním mikroskopem. Buňky značené biotinylovaným GSL B4 a následně DyLight® 549 Streptavidinem byly dobře viditelné a spolu s DAPI, které značí DNA v jádře, jsme byli schopni identifikovat nespočet buněk, jejichž strukturních součástí byl  $\alpha$ Gal epitop.

Pro porovnání jsme naznačili buňky IRE 11 a IRE/CTVM-20 pro detekci dalšího CCD, core  $\alpha$ -1,3-fukózy, kterou se nám podařilo vizualizovat značením LCA, následně DyLight® 549 Streptavidin a Anti-HRP, následně DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG. Oba tyto glykoepitopy jsme byli schopni detekovat v membránových strukturách, což značí a potvrzuje, že jsou součástí membránových proteinů a zajišťují komunikaci mezi buňkami a exkreci (Huai et al., 2016; Vancová & Nebesářová, 2015).

Glykoproteiny obsahující  $\alpha$ Gal epitop jsou původcem alergie na červené maso. Výskyt této alergie byl pozorován v regionech výskytu klíštěte amerického (*A. americanum*) a klíštěte obecného (*I. ricinus*), což značí, že alergie je indukována právě klíšťaty (Saleh et al., 2012). Při klíštěcím kousnutí se tyto glykoproteiny mohou dostat skrze sliny vpuštěné do těla hostitele, který nabyde na tento glykan intoleranci a jeho imunitní systém začne s produkcí IgE protilátek po následném vystavení tomuto epitopu. Celý princip toho, jak je alergie způsobována, nebyl ještě v současnosti plně objasněn.

Alergie na červené maso může v některých případech doprovázet závažný anafylaktický šok přicházející až několik hodin po pozření, který dotyčného ohrožuje na zdraví. Proto je velmi důležité být při diagnóze obezřetní (Commins et al., 2016). Zároveň je podstatné dále pokračovat ve výzkumu  $\alpha$ Gal epitopu a mechanismu, kterým je tato alergie indukována.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce byla detekce alergogenních glykoepitopů z lyzátů klíštěcích buněk *I. ricinus*, zvaných  $\alpha$ Gal epitop. Proteiny obsahující tento epitop z klíštěcí linie IRE 11 byly purifikovány metodou afinitní chromatografie za využití magnetických kuliček a lektinu GSL I B4 a následně identifikovány za využití biochemických metod (SDS-PAGE, lektinoblot). Druhou částí této práce byla detekce glykoproteinů nesoucí  $\alpha$ Gal epitop v buněčných strukturách s využitím fluorescenční mikroskopie, která potvrdila jeho přítomnost v buněčných membránách.

Vizualizací purifikovaných proteinů z klíštěcích buněk pomocí SDS-PAGE a imunoblotu bylo potvrzeno, že se v těchto buňkách opravdu nacházejí proteiny nesoucí tento epitop. Značením pomocí lektinů a protilátek a následnou vizualizací s použitím fluorescenčního mikroskopu byla potvrzena přítomnost  $\alpha$ Gal epitopu v buňkách *I. ricinus*.

Posledním krokem práce byla identifikace proteinů nesoucí  $\alpha$ Gal epitop pomocí hmotnostní spektrometrie, která byla provedena, ale nedošlo k žádným prokazatelným výsledkům, pravděpodobně vzhledem k nízkým koncentracím. Přestože jsme byli schopni potvrdit přítomnost proteinů nesoucích  $\alpha$ Gal epitop, nedokázali jsme dosud tyto proteiny dále charakterizovat.

## 7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Aebi, M. (2013). *N*-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430–2437.
- Apostolovic, D., Tran, T. A. T., Starkhammar, M., Sánchez-Vidaurre, S., Hamsten, C., & Van Hage, M. (2016). The red meat allergy syndrome in Sweden. *Allergo Journal*. 25(2), 29–34 (2016).
- Bartůňková, J., & Paulík, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005
- Bowman, A. S., & Nuttall, P. A. (2008). *Ticks: Biology, disease and control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Breitling, J., & Aebi, M. (2013). *N*-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), 1–15.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., ... Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. 44, 104–109.
- Commins, S. P., James, H. R., Kelly, L. A., Pochan, S. L., Workman, L. J., Perzanowski, M. S., ... Platts-Mills, T. A. E. (2011). The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- $\alpha$ -1,3-galactose. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1286–1293.
- Commins, S. P., Jerath, M. R., Cox, K., Erickson, L. D., & Platts-Mills, T. (2016). Delayed anaphylaxis to alpha-gal, an oligosaccharide in mammalian meat. *Allergology International*, 65(1), 16–20.
- Commins, S. P., & Platts-Mills, T. A. E. (2009). Anaphylaxis syndromes related to a new mammalian cross-reactive carbohydrate determinant. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4), 652–657.
- Corfield, A.P., and Berry, M. (2015). Glycan variation and evolution in the Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(7), 351-359.
- Demchenko, A. V. (2008). *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*.
- Franc, V., Šebela, M., Řehulka, P., Končítíková, R., Lenobel, R., Madzak, C., & Kopečný, D. (2012). Analysis of *N*-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a

- manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*. 75(13), 4027–4037.
- Fuente, J. de la. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience, Volume*(13), 6938.
- Grubhoffer, L., & Dusbábek, F. (1991). Lectin binding analysis of *Argas polonicus* tissue glycoproteins. *Veterinary Parasitology*, 38(2–3), 235–247.
- Hamsten, C., Starkhammar, M., Tran, T. A. T., Johansson, M., Bengtsson, U., Ahlén, G., ... Van Hage, M. (2013). Identification of galactose- $\alpha$ -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus*; Possible relationship with red meat allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 68(4), 549–552.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., & Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 100, 94–100.
- Huai, G., Qi, P., Yang, H., & Wang, Y. (2016). Characteristics of  $\alpha$ -Gal epitope, anti-Gal antibody,  $\alpha$ 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1), 11–20.
- Kennedy, J. L., Stallings, A. P., Platts-Mills, T. A. E., Oliveira, W. M., Workman, L., James, H. R., ... Commins, S. P. (2013). Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose and delayed anaphylaxis, angioedema, and urticaria in children. *Pediatrics*, 131(5), e1545–e1552.
- Lis, H., & Sharon, N. (1993). Protein glycosylation: Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry*. 218, 1–27.
- Macher, B. A., & Galili, U. (2008). The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(2), 75–88.
- Rappsilber, J., Mann, M., & Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*. 2, 1896–1906.
- Saleh, H., Embry, S., Nauli, A., Atyia, S., & Krishnaswamy, G. (2012). Anaphylactic reactions to oligosaccharides in red meat: A syndrome in evolution. *Clinical and Molecular Allergy*, 10(1), 5.
- Sonenshine, D. E. (1993). Biology of Ticks. In *Biology of Ticks Volume II*.

- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12, 43R–56R.
- Steinke, J. W., Platts-mills, T. A. E., & Commins, S. P. (2016). HHS Public Access. *J Allergy Clin Immunol*, 135(3), 589–597.
- 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. *Carbohydrate Research*, 389, 93-99.
- Taylor, M.E. & Drickamer, K. (2006). Introduction to Glycobiology. *Oxford University Press*.
- Uhlíř, J., Grubhoffer, L., Borský, I., & Dusbábek, F. (1994). Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8(2), 141–150.
- Van Den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 151–208
- Vancová, M., & Nebesářová, J. (2015). Correlative fluorescence and scanning electron microscopy of labelled core fucosylated glycans using cryosections mounted on carbon-patterned glass slides. *PLoS ONE*, 10(12), e0145034.
- Wiederschain, G. Y. (2009). Essentials of glycobiology. *Biochemistry (Moscow)*, 74(9), 1056–1056.
- Yokoi, H., Yoshitake, H., Matsumoto, Y., Kawada, M., Takato, Y., Shinagawa, K., ... Saito, K. (2017). Involvement of cross-reactive carbohydrate determinants-specific IgE in pollen allergy testing. *Asia Pacific Allergy*, 7(1), 29.

### **Elektronické zdroje**

<https://vectorlabs.com/biotinylated-gsl-i-isolectin-b4.html>