

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká Fakulta



**Hemlipoglykoprotein z hemolymfy klíštěte
Dermacentor marginatus: purifikace a biochemická
charakterizace**

Diplomová práce

Bc. Jarmila Dupejová

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

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba PřF JU

RNDr. Marie Vancová, PhD PaÚ, BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice
2010

Dupejová, J, 2010: Hemlipoglykoprotein z hemolymfy klišťete *Dermacentor marginatus*: purifikace a biochemická charakterizace. [Hemlipoglycoprotein from the *Dermacentor marginatus* hemolymph: purification and biochemical characterization. Mgr. Thesis, in Czech] – 63 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of the study is the purification and characterization of hemelipoglycoprotein, a carrier protein from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus*. The protein was characterized by biochemical methods with emphasis on its glycosylation and native molecular weight, and examining its carbohydrate-binding specificity.

Tato práce byla financována granty:

Grantová Agentura ČR 524/08/1509, 206/09/1782; Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 6007665801, LC 06009; Grantová agentura AVČR KJB600960906, Studentská grantová agentura PřF JU SGA2009/017.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - 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 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.

17.12.2010

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům Prof. Liborovi Grubhofferovi za možnost vytvořit vlastní vědeckou práci, za cenné rady a čas, který mi věnoval; Jankovi Štěrbovi děkuji za ochotu pomoci a poradit, kdykoli bylo potřeba a za pevné nervy při konzultacích. V neposlední řadě děkuji Marušce Vancové a Lence Bučinské za pomoc s přípravou orgánů.

Všem členům laboratoře rovněž děkuji za příjemnou a přátelskou atmosféru v laboratoři.

Mé velké díky patří také rodině a přátelům za podporu, lásku a možnost studovat a Janíkovi, bez kterého by tahle práce asi vůbec ani nevznikla.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Klíšťata – jejich základní charakteristika	3
3.1.1 Systematický přehled	3
3.1.2 Životní cyklus čeledi Ixodidae	4
3.1.3 Klíšťata jako škůdci a přenašeči	5
3.1.4 Hemolymfa klíšťat	5
3.1.5 Proteiny hemolymfy	6
3.1.5.1 Makroglobuliny	6
3.1.5.2 Antimikrobiální proteiny	7
3.1.5.3 Lektiny	7
3.1.5.4 Vitellogeniny/vitelliny	8
3.1.5.5 DvCP a HeLp	8
3.1.6 Střevo klíšťat	9
3.1.7 Trávení krve, skladování a recyklace hemu	10
3.1.8 Dermacentor marginatus	10
3.2 Imunita členovců	11
3.2.1 Imunitní systém klíšťat	12
3.2.1.1 Buněčná imunita	13
3.2.1.2 Humorální imunita	14
3.3 Glykosylace	16
3.3.1 Základní charakteristika a funkce glykanů	16
3.3.2 Glykosylace a glykany bezobratlých	17
3.3.3 Glykosylace a glykany klíšťat	18
4 Materiál a metody	19
4.1 Materiál	19
4.1.1 Klíšťata	19
4.1.2. Roztoky a pufrý	19
4.1.3 Kity	20
4.2 Metody	21
4.2.1 Příprava plasmy	21
4.2.2 Příprava polyklonálního séra	22
4.2.2.1 Protilátky proti hemaglutinační aktivitě	22
4.2.2.2 Protilátky proti HLGP	22
4.2.3 Elektroforetické metody	23
4.2.3.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	23
4.2.3.2 2D elektroforéza: Blue Native-PAGE/Tricine-SDS-PAGE	24
4.2.3.3 Blue Native PAGE (BN-PAGE)	24
4.2.3.4 Gelová elektroforéza (Tricine SDS-PAGE)	25
4.2.4 Elektroeluce (EE)	25
4.2.5 Enzymatická deglykosylace	26
4.2.6 Blotovací metody	26
4.2.6.1 Imunobloting	27

4.2.6.2 Detekce glykoproteinů	27
4.2.6.3 Lektinobloting	27
4.2.7 Imunoprecipitace	28
4.2.8 Hemaglutinace	28
4.2.9 Rezonance povrchového plazmonu ('Surface Plasmon Resonance', SPR)	29
4.2.10 Hmotnostní spektrometrie ('Mass Spectrometry', MS)	29
4.2.10.1 Permetylace N-glykanů na pevné fázi	29
4.2.10.2 Hmotnostní spektrometrie	29
5 Výsledky	31
5.1 Detekce a identifikace HLGP v plasmě <i>D. marginatus</i>	31
5.2 Izolace HLGP	33
5.3 Biochemická charakterizace HLGP	34
5.3.1 Blue Native-PAGE/SDS-PAGE	34
5.3.2 Glykosylace, charakterizace glykanů	35
5.4 Hmotnostní spektrometrie	36
5.5 Schopnost vázat sacharidy	40
5.6 Detekce HLGP v tkáních	42
6 Diskuze	44
7 Závěr	49
8 Seznam použitých zkratk	50
9 Citace	51

1. ÚVOD

Transportní proteiny klíšťat jsou schopny vázat, přenášet, případně ukládat hem pocházející z krve hostitele. U některých transportních proteinů byla potvrzena i antioxidační role, přesto ale přesná funkce transportních proteinů není plně známá. Obecně platí, že tyto proteiny jsou přítomny zejména v hemolymfě samic a jsou určené především k transportu hemu.

Některé transportní proteiny pro hem byly nalezeny i u samců klíšťat *Boophilus microplus* či *Dermacentor variabilis*, kteří sají na hostiteli jen párkrát za život a v mnohem menším rozsahu než samice. Nemusí tedy zpracovávat velké množství hemu, přesto je zastoupení transportních proteinů pro hem v hemolymfě samic i samců přibližně stejné. Některé transportní proteiny se nacházejí také ve slinných žlázách, kde však hem z potravy není uvolňován.

Přestože proteiny přenášející hem patří mezi největší proteiny klíštěcí plasmy (cca 250 kDa), váží relativně malé množství hemu (v jednom případě dva hemy na molekulu proteinu). Uvedené poznatky naznačují, že transportní proteiny pro hem mají i další funkce.

Hlavním cílem diplomové práce byla biochemická charakterizace transportního proteinu hemlipoglykoproteinu (HLGP) z klíštěte *Dermacentor marginatus*, která odhalila možnost dalších funkcí HLGP než jenom transport a ukládání hemu.

2. CÍLE PRÁCE

- izolace a purifikace hemlipoglykoproteinů z klíštěte *Dermacentor marginatus*
- příprava specifických protilátek proti hemlipoglykoproteinům z *D. marginatus*
- strukturní a funkční charakterizace hemlipoglykoproteinů z *D. marginatus*

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Klíšťata – jejich základní charakteristika

3.1.1 Systematický přehled

Klíšťata jsou početnou skupinou roztočů, která patří do podkmenu klepítkatci (*Chelicerata*). *Chelicerata* se dělí na dvě třídy: *Merostomata* a *Arachnida*. Skupina *Merostomata* zahrnuje především mořské klepítkatce, např. ostrorepy nebo vymřelé zástupce řádu *Eurypterida*. Ostrorepové jsou hojně používáni jako modelové organismy pro studium molekulových a buněčných faktorů přirozené imunity.

Třída *Arachnida* zahrnuje několik řádů (štíři, bičovci, krabovci, pavouci, štírci, solifugy) včetně řádu roztoči (*Acari*). Zástupci roztočů obývají suchozemské, mořské i sladkovodní habitaty, jsou detritofágní, draví nebo parazitičtí. Parazitičtí roztoči škodí hostiteli jak přímým sáním, tak i přenosem původců různých infekčních onemocnění.

Klíšťata (podřád *Ixodida*) se řadí mezi roztoče (*Acari*) a dělí se do tří čeledí: *Argasidae* (např. rod *Otobius*, *Argas*, *Ornithodoros*, *Antricola* ...), *Ixodidae* (*Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* ...) a *Nuttalliellidae* (jediný rod *Nuttalliella*), které se liší v ontogenezi, fyziologii i životní strategii. Do podřádu *Ixodida* patří celkem 907 známých druhů, z toho čeleď *Argasidae* má 186 druhů a čeleď *Ixodidae* 720 druhů.

Čeleď *Argasidae* je charakteristická kožovitým tělním pokryvem a absencí tvrdého štítu na hřbetní straně. Tyto klíšťata žijí většinou v hnízdech svých hostitelů, sají opakovaně a po malých dávkách. Nemají fixní počet nymfálních stádií, který závisí především na množství dostupné potravy.

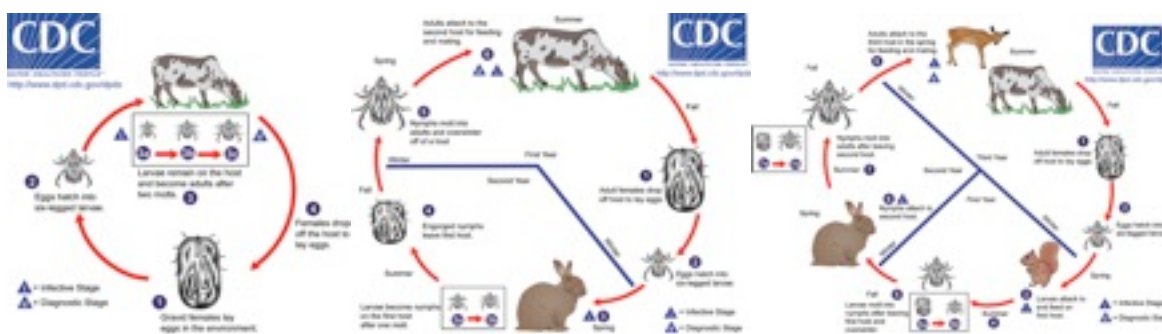
Zástupci čeledi *Ixodidae* mají na hřbetní straně skutum (tvrdý štítek), jež vykazuje zřetelný sexuální dimorfismus - u samců pokrývá celé tělo, u nenasátých samic sahá do jeho poloviny nebo do jedné třetiny. Gnathosoma (část klíšťe zahrnující jeho ústní a sací ústrojí) vyčnívá z obrysu těla a jeho součástí je hypostom, který pomáhá klíšťeti udržet se během sání na hostiteli.

3.1.2 Životní cyklus čeledi *Ixodidae*

Klíšťata mají tři vývojová stádia - larvu, nymfu a dospělé. Jejich životní cyklus se však může lišit u různých druhů v závislosti podle jejich šancí na kontakt s odpovídajícím hostitelem, který zajistí jejich přežití.

I přes různý počet hostitelů (1-3) u čeledi *Ixodidae* platí, že ve vývojovém cyklu následuje po larválním stádiu pouze jedno stádium nymfální a dále finální stádium dospělé. Typický je pro ně tříhostitelský cyklus, ale některé odvozenější druhy mají cyklus dvojhositelský (některé druhy rodů *Hyalomma* a *Rhipicephalus*) nebo jednohostitelský (některé druhy rodu *Boophilus*).

Klíšťata, která mají jednohostitelský cyklus, zůstávají na jednom hostiteli přes všechna tři vývojová stadia. Nasáté dospělé samice pak opouští hostitele a snáší vajíčka. Klíšťata s dvojhositelským cyklem zůstávají na prvním hostiteli ve stádiu larvy a nymfy. Po nasátí se nymfa pouští hostitele, mění se v dospělé a hledá finálního hostitele. Tříhostitelský cyklus má většina tvrdých klíšťat. Tyto klíšťata opouští hostitele po každém sání a následuje přeměna na další stádium. Všechny tyto typy životních cyklů klíšťat mají společné, že stádium nasátého dospělé je závěrečné, tj. po naklazení jedné snůšky vajíček samice umírá, samec umírá po kopulaci také.



Obrázek 1. Znázornění životní strategie klíšťat. Zleva: životní cyklus jednohostitelského, dvojhositelského a tříhostitelského klíštěte.

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Frames/S-Z/Ticks/body_Ticks_page1.htm#Life%20Cycle

3.1.3 Klíšťata jako škůdci a přenašeči

Klíšťata patří mezi krevsající ektoparazity, kteří napadají savce, ptáky a příležitostně plazy a obojživelníky. Mezi členovci jsou klíšťata přenašeči největšího množství patogenů včetně virů, bakterií, hub a prvoků (Pagel Van Zee *et al.*, 2007; Jongejan a Uilenberg, 2004) a hned po komárech jsou nejnebezpečnějšími vektory závažných onemocnění lidí i zvířat.

Mezi nejznámější a nejnebezpečnější přenášené patogeny patří virus klíšťové encefalitidy nebo spirochéty *Borrelia burgdorferi* s.l.. Virus klíšťové encefalitidy i bakterie z komplexu *B. burgdorferi* běžně infikují lesní zvířata a z posledních průzkumů vyplývá, že se počty infikovaných pacientů těmito dvěma chorobami za poslední léta zvyšují v ČR. Zatímco proti klíšťové encefalitidě je k dispozici účinné očkování, (humánní) vakcína proti Lymské borelióze zatím na trhu není a léčba je možná pouze podáním velkého množství antibiotik. Kromě Lymské boreliózy a klíšťové encefalitidy mohou klíšťata přenášet i další patogeny způsobující např. horečku skalistých hor, Q horečku, tularemii, erlichiozy, apod (shrnuto v Bowman *et al.*, 2008).

Klíšťata různých rodů, např. *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* a *Boophilus* napadají nejen člověka, ale také hospodářská zvířata a způsobují u nich onemocnění jako je anaplasmóza, babesióza, theilerióza a řada dalších. Některá klíšťata (*I. holocyclus*, *D. andersoni*) mohou poškozovat hostitele pouhým sáním, konkrétně vylučováním silných toxinů ve slinách. Tyto toxiny způsobují paralýzu jehňat, kůzlat a telat, výjimečně psů a člověka (Stone *et al.*, 1989; Muth, 1945).

3.1.4 Hemolymfa klíšťat

Klíštěcí hemolymfa je komplexní tekutina, která má mnoho funkcí. Je tvořena plasmou a hemocyty a slouží především k transportu různých molekul napříč klíštěcím tělem, jako jsou hormony, nutriční molekuly nebo chemické intermediáty metabolismu. Hemolymfa působí také jako opora pro různé tkáně a osmoticky vyrovnané vnitřní prostředí se správnou hladinou iontů. Kromě vody, sacharidů, anorganických solí, lipidů a aminokyselin se v ní vyskytují také složky zapojené do srážení hemolymfy, proteiny, některé pigmenty, různé enzymy a hormony a molekuly cizího původu (Sonenshine, 1991).

3.1.5 Proteiny hemolymfy

Podstatnou součástí hemolymfy jsou proteiny, které tvoří většinou složku z rozpustných molekul přítomných v plasmě. Mezi studované proteiny patří především proteiny spojené s reprodukcí a vývojem a proteiny účastnící se imunitních odpovědí.

K nejlépe prostudovaným proteinům patří vitellogeniny, které cirkulují v hemolymfě jako prekurzory žlutkového proteinu vajíčka (Vn) (Thompson *et al.*, 2005). Vitellogenin/vitellin byl identifikován a charakterizován např. u *O. moubata* a *O. parkeri*, *D. variabilis* a *I. scapularis*. Obsah sacharidů a lipidů, ale také aminokyselinové složení těchto proteinů je u klíšťat podobné jako u hmyzu.

Dalšími proteiny vyskytujícími se ve velkém množství v hemolymfě jsou transportní proteiny tzv. 'carrier proteiny' (CP), resp. hemlipoproteiny (HeLp). Nachází se v homogenátech vajíček, larev a nymf, v hemolymfě samic i samců, a dále např. ve slinných žlázách, tukovém tělese a v koxální tekutině měkkých klíšťat. Bylo prokázáno, že některé ze studovaných hemlipoproteinů (DvCP, HeLp) se účastní trávení krve a po průchodu hemu do hemocoelu ho váží a skladují (Gudderra *et al.* 2001; Maya-Monteiro *et al.* 2000).

3.1.5.1 Makroglobuliny

Makroglobuliny, konkrétně rodina α -2-makroglobulinových (α 2M) inhibitorů proteáz, tvoří další proteinovou složku hemolymfy. Jako první představitel této rodiny u terrestrických bezobratlých byl v plasmě *O. moubata* identifikován TAM - klíštěcí α -makroglobulin (tick α -2-macroglobulin) (Kopáček *et al.*, 2000). Jedná se o glykoprotein, který vykazuje sekvenční podobnost s α 2M z amerického ostrorepa *Limulus polyphemus*. Obecně α 2M slouží jako univerzální inhibitor proti různým skupinám proteáz bezobratlých (Hoffmann *et al.*, 1999) a stejná funkce se předpokládá i u proteinu TAM. Tento závěr podporují i poznatky z charakterizace dalšího α -2-makroglobulinu IrAM-An z klíštěte *I. ricinus* (Burešová *et al.*, 2009).

IrAM-An má schopnost podílet se resp. spouštět fagocytózu bakterie *Chryseobacterium indologenes* skrz interakci tohoto makroglobulinu s proteázou patogena, přičemž tento proces je spojen s buněčnou imunitní odpovědí (Burešová *et al.*, 2009).

3.1.5.2 Antimikrobiální proteiny

Antimikrobiální peptidy/proteiny jsou malé molekuly, které se obecně u členovců vyznačují antimikrobiální aktivitou především proti G⁺ bakteriím; některé izoformy inhibují také G⁻ bakterie, houby a protozoa (Nakajima *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2007). Tyto proteiny tvoří důležitou složkou humorální imunity, a proto jsou detailně popsány v kapitole Humorální imunita.

3.1.5.3 Lektiny

Lektiny tvoří další významnou složku hemolymfy, protože se pravděpodobně účastní procesů přirozené imunity. První lektiny klíš'at byly nalezeny v hemolymfě měkkých klíš'at *O. tartakovskii*, *O. papilipes* a *A. polonicus* (Grubhoffer a Mařha, 1991). Další lektiny se nachází v hemolymfě, střevu a slinných žlázách u různých klíš'at (Kuhn *et al.*, 1996; Grubhoffer a Kovář, 1998; Kovář *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007). Tyto proteiny vykazují obecně afinitu k sialové kyselině a N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc), ale specificky váží i další sacharidy a pravděpodobně interagují také s glykosylovanými strukturami přenášených patogenů.

U epidemiologicky významných klíš'at bylo dosud popsáno několik lektinů ze skupiny fibrinogenu podobných proteinů (FReP) : Ixoderin A a B (*I. ricinus*), Dorin M a OMFREP (*O. moubata*), Ixoderin A-like (*I. scapularis*) a Amblyomin (*A. americanum*). Tyto proteiny byly identifikovány pouze na základě cDNA sekvencí, kromě Dorinu M; ten je zatím jediným purifikovaným a plně charakterizovaným lektinem z výše uvedených (Kovář *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2005, 2006; Man *et al.*, 2008). Srovnání sekvencí OMFREPU, Dorinu M a Ixoderinu A s Tachylektiny 5A a 5B *T. tridentatus* ukázalo, že jejich fibrinogenu podobné domény jsou blízce příbuzné (Rego *et al.*, 2005), a proto se předpokládá, že klíš'teční lektiny/proteiny FReP mohou hrát roli při rozpoznávání patogenů a jejich přenosu (Rego *et al.*, 2005, 2006; Kovář *et al.*, 2000). Lektiny OMFREP a Ixoderin A vykazují rovněž vysokou sekvenci homologii s fikoliny savců a některých bezobratlých. U těch byla také účast fikolinů v obranných procesech přirozené imunity potvrzena.

3.1.5.4 Vitellogeniny/vitelliny

Vitellogeniny a vitelliny jsou jednou z nejlépe prostudovaných skupin proteinů hemolymfy. Vitellogenin (Vg) je velký multimerický žlutkový prekurzor vitellinu (Vn), který váže hem a má anitioxidační schopnosti (Logullo *et al.*, 2002). Vg z *D. variabilis* je složen ze dvou proteinů Vg-A a Vg-B velkých 330 kDa a 320 kDa a je tvořen sedmi podjednotkami o velikostech v rozmezí 22-215 kDa (Sullivan *et al.*, 1999). Vitellogenin z *I. scapularis* obsahuje osm podjednotek s molekulovými velikostmi 48-145 kDa (James a Oliver, 1999b). Po nasátí krve hostitele je vitellogenin syntetizován během vitellogeneze tukovým tělesem klíštěte a následně uvolněn do hemolymfy, odkud je pak absorbován vyvíjejícím se oocytem jako vitellin (Rosell a Coons, 1992; James a Oliver, 1996, 1999a; Taylor a Chinzei, 2001).

U klíšťat bylo dosud charakterizováno několik vitelogeninů, např. z klíšťáka *O. moubata* (Taylor a Chinzei, 2001) a z klíšťat *D. variabilis* (Rosel a Coons, 1992) a *I. scapularis* (James a Oliver, 1997).

3.1.5.5 DvCP a HeLp

Mezi převládající proteiny hemolymfy patří hemlipoglyko-transportní proteiny (CP), které byly zatím studovány hlavně u dvou druhů klíšťat, *D. variabilis* (Gudderra *et al.*, 2001) a *R. microplus* (Maya-Monteiro *et al.*, 2000). CP jsou přítomny v plasmě dospělých samic i samců klíšťat a v některých tkáních. Jelikož klíšťata nedokáží syntetizovat vlastní hem (Braz *et al.*, 1999), role hemlipoglyko-transportních proteinů spočívá především ve vázání, transportu a skladování hemu při trávení nasáté krve z hostitele.

Transportní protein izolovaný z *B. microplus* (HeLp) má molekulovou velikost asi 354 kDa a skládá se ze dvou podjednotek velkých 103 a 92 kDa. V hemolyfě se vyskytuje v koncentraci 50 mg/ml, čímž se řadí k proteinům s největším zastoupením v hemolymfě. Jeho molekula obsahuje sacharidy (3 % (w/w)) a lipidy (33 %) a váže hem v poměru dva moly hemu na jeden mol nativního HeLp. Hlavní sacharidovou složkou je manóza, která tvoří asi 90 % ze všech sacharidů přítomných v HeLp. Kromě neutrálních lipidů a fosfolipidů obsahuje HeLp především estery cholesterolu a cholesterol oleát.

HeLp váže hem v hemolymfě a značení HeLp izotopem železa ^{55}Fe ukázalo, že se hem dostává do ovárií během oogeneze (Maya-Monteiro *et al.*, 2000). Protože je HeLp hlavní proteinovou složkou hemolymfy i nenasátých samic a samců, je pravděpodobné, že má kromě transportu hemu a jeho skladování i jiné funkce.

Bylo prokázáno, že samotný hem vyvolává oxidaci fosfatidylcholinových liposomů výrazně více než HeLp prostřednictvím jeho navázaného hemu. Po přidání volného hemu k HeLp redukoval tento protein oxidaci liposomů, a to až do dosažení poměru hem: HeLp 6:1 (Maya-Monteiro *et al.*, 2004). Maya-Monteiro a kolektiv (2004) tedy potvrdili, že HeLp může inhibovat oxidaci liposomů, což chrání klišťecí tkáň a dále to, že jako antioxidanty fungují pravděpodobně cholesteroly HeLp.

Další charakterizovaný hemlipoglyko-transportní protein (DvCP), který byl nalezen v hemolymfě *D. variabilis*, vykazuje velkou sekvenční podobnost s HeLp (Gudderra *et al.*, 2002a, 2002b; Maya-Monteiro *et al.*, 2004). DvCP má molekulovou velikost 210 kDa a skládá se ze dvou podjednotek velkých 98 kDa a 92 kDa. Molekula DvCP stejně jako molekula HeLp obsahuje sacharidy a lipidy. U nasátých a částečně nasátých klišťat byl potvrzen v tukovém tělese, slinných žlázách, ováriích a ve svalové tkáni, nicméně v největším množství se vyskytuje v plasmě; u částečně nasátých samic je zvýšená produkce ještě ve slinných žlázách.

Hemlipoglykoprotein byl dále nalezen u *O. parkeri*, ale byl pouze částečně charakterizován stejnými metodami a se stejnými výsledky jako v případě DvCP (Gudderra *et al.*, 2001, 2002a).

3.1.6 Střevo klišťat

Střevo je jedním z nejdůležitějších orgánů klišťete, protože v něm dochází ke zpracování nasáté krve a k interakcím přenášených patogenů s imunitním systémem klišťete. Skládá se z centrálního žaludku, jeho četných výběžků a střeva. Centrální žaludek se napojuje na malé střevo, které vede odpadní látky do zadního střeva klišťete (rektálního vaku). Tam dochází k jejich akumulaci spolu s produkty Malpigických trubic a následnému vyloučení ven z klišťete análním otvorem. Střevo je uniformní po celém povrchu a jeho stěna je tvořena jednou vrstvou epiteliálních buněk spočívajících na bazální lamině. V epitelu jsou přítomny tři typy buněk - kmenové buňky, sekreční buňky a trávicí buňky.

Povrch lumenu střeva je plný mikrovilů a je pokryt peritrofickou matrix, která chrání střevní buňky před poškozením.

3.1.7 Trávení krve, skladování a recyklace hemu

Klíšťata jsou obligátní ektoparazité savců, ptáků a plazů, jejichž jediným zdrojem potravy je krev hostitele. Krev představuje bohatý zdroj proteinů pro přeměnu na vyšší stádia, například pro vitelogenezi nebo pro produkci vajíček.

Po přichycení na hostitele klíště nasává pomocí faryngeálních pump krev, která se přes jícn dostává do střeva, kde začíná trávení. Během prvních hodin po přichycení klíštěte však ještě nedochází k přijímání ani trávení potravy, protože klíště nejprve upevňuje své přichycení k hostiteli pomocí vylučování různých látek, např. cementu ze slinných žláz. V další fázi, která trvá několik dní, klíště pozvolna saje krev a začíná ji trávit.

U dospělých samic dochází k rychlému sání, kdy samice během 12-32 hodin přijme obrovské množství krve a zvětší několikanásobně svůj objem. V této fázi se zpomaluje trávení krve a pokračuje až poté, co samice opouští hostitele a následuje kladení vajíček.

Samotné trávení krve začíná u klíšťat ve střevě a je spouštěno lýzou hostitelských erytrocytů serinovými proteázami (Miyoshi *et al.*, 2007). Intracelulární trávení probíhá v sekundárních lysosomech ve střevních trávicích buňkách, které vznikají fúzí primárních lysosomů a endosomů.

Hemoglobin uvolněný z erytrocytů se v lysosomech rozpadá a uvolněný hem je shromažďován a skladován v hemosomech (Lara *et al.*, 2003), které se shromažďují podél bazální laminy. Hem je dále přenesen do hemocoelu/hemolymfy, kde je vázán hemlipoglyko-transportním proteinem (Gudderra *et al.*, 2001; Maya-Monteiro *et al.*, 2000) nebo vitellogeninem během vitelogeneze (Thompson *et al.*, 2007). Trávicí buňky s hemosomy jsou pak uvolněny z bazální laminy a jsou nahrazeny buňkami pocházejícími ze společné linie střevních kmenových buněk (Coons *et al.*, 1986). Dosud ale není známo, jestli klíšťata dokáží zpracovat a znovu použít železo vázané v hemu.

3.1.8 *Dermacentor marginatus*

Klíšťata rodu *Dermacentor* patří do čeledi *Ixodidae* a na celém světě jich je známo 31 druhů. V Evropě žijí dva z nich, a to *D. reticulatus* a *D. marginatus*.

Dermacentor marginatus je klíště s tříhostitelským cyklem a je možné ho najít v mírných pásmech v lesích, na loukách a na pastvinách. Dospělé klíště saje především na zvěři, dobytku, psech a někdy na lidech. Vyskytuje se v hojném počtu; na jednom hostiteli bylo nalezeno až 200 jedinců (Baker, 1999; Hillyard, 1996).

Toto klíště je hlavním přenašečem bakterií rodu *Rickettsia* (Řeháček *et al.*, 1990; Beati *et al.*, 1993) a hraje druhotnou roli v přenosu viru omské hemoragické horečky (Nuttal a Labuda, 1994). *D. marginatus* může dále přenášet virus klíšťové encefalidity (Kožuch a Nosek, 1971), virus konžsko-krymské hemoragické horečky (Markeshin *et al.*, 1992), virus Bhandža (Hubálek *et al.*, 1988; Labuda *et al.*, 1997), virus West Nile (Hubálek a Halouzka, 1999), bakterie *Coxiella burnetii*, *R. sibirica*, *R. conorii*, *B. burgdorferi* (Smetanová *et al.*, 2006), *Francisella tularensis* (Hubálek *et al.*, 1990) a prvoky rodu *Babesia* (Pietrobelli *et al.*, 2007).



Obrázek 2: samice a samec klíštěte *Dermacentor marginatus*

3.2 Imunita členovců

Bezobratlí živočichové představují víc než 95 % živočišné říše a obývají všechny biotopy na světě. Proto se také setkávají s množstvím organismů, proti kterým se musí bránit. Jejich rozšíření a přežití tedy závisí právě na úspěšnosti, s jakou se brání invadujícím mikroorganismům a různým mnohobuněčným parazitům.

Bezobratlí živočichové postrádají specifickou adaptivní imunitu (klonální selekce lymfocytů, tvorba protilátek a imunologická paměť) a k obraně používají rychlou a nespecifickou přirozenou imunitu.

Obrana před invadujícími patogeny zahrnuje kromě mechanismů imunitního systému i tzv. fyzikální bariéry, např. kutikulu nebo epitel trávicího systému. Při pokusu patogena o průnik do těla hostitele je běžným jevem, že se do těchto bariér hostitele dostávají složky jeho přirozené imunity, které pak pomáhají udržet neprostupnost fyzikálních bariér pro patogeny.

V rámci bezobratlých živočichů je tato přirozená imunita studována hlavně u členovců, protože jejich zástupci jsou přenašeči medicínsky významných patogenů i modelovými organismy molekulární biologie. Zahrnuje dvě vzájemně se doplňující složky: buněčnou a humorální imunitu.

Buněčnou imunitu představují hemocyty, které specificky přibývají po infekci patogenem. Jejich klíčová úloha v obraně spočívá ve schopnosti patogeny, které infikují hostitele, fagocytovat – pohlcovat, odstraňovat je z oběhu hemolymfy a uzavírat ve specializovaných organelách (fagosom), nodulovat – tvořit s nimi hemocytární agregáty, nebo je enkapsulovat - uzavírat noduly nebo cizí mikroorganismy větší než hemocyty v několika vrstvách buněk (shrnutí v Taylor, 2006).

Humorální imunita doplňuje imunitu buněčnou a rozeznává invadující patogeny podle složek jejich povrchu (rozpoznávány jsou glykany, lipopolysacharidy, peptidoglykany, β -1,3-glukany a pod). Navázání buněčných receptorů rozpoznávajících motivy (PRRs, pattern recognition receptors, nacházející se např. na epiteliálních buňkách, granulocytech) na povrchové molekuly mikroorganismů vede k syntéze široké škály molekul (antimikrobiální peptidy, opsonizační faktory) a ke spuštění signálních kaskád (koagulace, aktivace reaktivních forem kyslíku – ROS, reactive oxygen species) zapojených v imunitě.

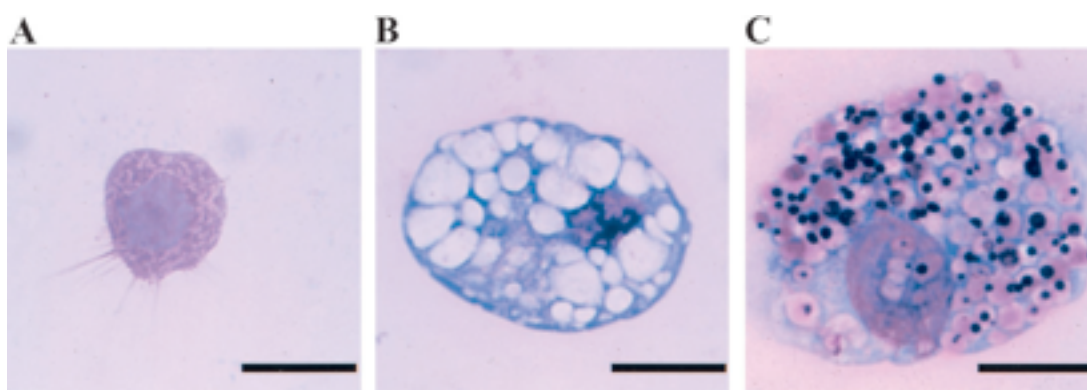
3.2.1 Imunitní systém klíš'at

Imunitní systém klíš'at je podobný imunitnímu systému ostatních bezobratlých a dovoluje klíš'ti bránit se napadání gram-pozitivními a gram-

negativními bakteriemi, viry a jinými organismy. Na napadení odpovídá imunitní systém klíštěte složkami buněčné a humorální imunity.

3.2.1.1 Buněčná imunita

Hemocyty bezobratlých jsou funkčním ekvivalentem imunitních buněk obratlovců a tvoří 50-60 % obsahu hemolymfy. Cirkulují v ní a zajišťují obranu proti vnikajícím patogenům (Sonenshine, 1993) tím, že se účastní procesů humorální (Ceraul *et al.*, 2003; Simser *et al.*, 2004) i buněčné imunity (Kryuchechnikov, 1991; Johns *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2001; Ceraul *et al.*, 2002).



Obrázek 3: Prohemocyt (A), plasmacyt (B) a granulocyt (C) z *Ornithodoros moubata*. Metanolem fixované stěry hemolymfy barvené Giemsou (bar 5 5 mm; magnification 1,0003). Inoue *et al.*, 2001

U klíšťat nalezneme tři základní typy hemocytů – granulocyty, plasmacyty a prohemocyty (Obr. 3, Inoue *et al.*, 2001; Kuhn a Haug, 1994); u klíšťáků pak navíc ještě čtvrtý typ podobající se sferulocytům hmyzu (Borovičková a Hypša, 2005; Kadota *et al.*, 2003). U plasmocytů s nízkým počtem granul a granulocytů *I. ricinus* a *O. moubata* byly pozorovány typické ultrastrukturní znaky indikující fagocytickou aktivitu (Borovičková a Hypša, 2005), a proto hrají pravděpodobně významnou roli v buněčné imunitě tvrdých i měkkých klíšťat. Kromě fagocytózy mohou hemocyty parazity nodulovat (tvořit s nimi hemocytární agregáty) nebo je enkapsulovat (Ceraul *et al.*, 2002).

Fagocytóza cizích těles je jednou z nejdůležitějších imunitních odpovědí u obratlovců i u bezobratlých. Samotný proces začíná rozpoznáním cizího tělesa, což aktivuje signální kaskádu, která řídí tvorbu fagosomu a pohlcení cizího tělesa

mechanismem závislým na polymeraci aktinu. Fagosom dozrává a mění se na fagolysosom. Tento proces je aktivován efektorovými molekulami, které současně zabíjí a/nebo enzymaticky degradují cizí tělesa (shrnutí v Lavine a Strand, 2002). Fagocytóza byla prokázána např. u hemocytů *H. dromedarii* (Bázliková *et al.*, 1984), *O. moubata* (Inoue *et al.*, 2001), *B. microplus* (Pereira *et al.*, 2001) a hemocytů klíšťat rodu *Ixodes* (Benach *et al.*, 1984; Burešová *et al.* 2009).

Nodulace je spouštěna po rozpoznání cizího tělesa, kdy hemocyty migrují k místu jeho výskytu a tvoří s ním mikroagregáty, které mohou adherovat k různým orgánům v hemocoelu. V průběhu nodulace se mikroagregáty zvětšují na velikost okolo 0,1 mm v průměru a tmavnou díky probíhající melanizaci (Miller a Stanley, 1998). Proces nodulace je znám u klíštěte *D. variabilis*, které tak reaguje například na inokulaci bakterie *E. coli* (Ceraul *et al.*, 2002).

Enkapsulace bývá u bezobratlých vyvolána profenoloxidázovým aktivačním systémem, který je složen z kaskády proteáz obsahující PRRs, serinové proteázy, jejich zymogeny a profenoloxidázový systém. Po iniciaci rozpoznáním bakteriálních LPS nebo peptidoglykanů začíná enkapsulace aktivací fenoloxidázy, která katalyzuje dva typy reakcí, jejichž výsledkem je vznik toxického *O*-chinonu, což je první krok biosyntézy volných agregátů melaninu (Sugumaran, 2002). Ten se shromažďuje okolo patogena, a pokračuje zhušťováním agregátů, dokud jimi není cizí těleso zcela obklopeno (Vey, 1993). Fenoloxidázová aktivita je intenzivně zkoumána, nicméně u klíšťat byla zatím prokázána pouze u *O. moubata* (Kadota *et al.*, 2002) a naopak vyvrácena u *A. americanum*, *D. variabilis*, a *I. scapularis* (Zhioua *et al.*, 1997).

3.2.1.2 Humorální imunita

Imunitní systém klíšťat reaguje na vnikající patogeny podle toho, jaké molekuly se nachází na jejich povrchu, a odpovídá na vniknutí především produkcí antimikrobiálních proteinů (shrnutí v Taylor, 2006).

Hlavní složkou imunitního systému klíšťat jsou antimikrobiální proteiny/peptidy. Po napadení klíštěte patogenem dochází ke spuštění jejich syntézy (v hemocytech, tukovém tělese, střevních buňkách), a i když se mohou v organismu živočicha vyskytovat konstantně, během infekce mikroorganismem se jejich koncentrace několikanásobně zvyšuje. Antimikrobiální proteiny/peptidy jsou

schopny působit na velké množství mikroorganismů, které mohou zabít nebo je neutralizovat. Mezi proteiny s antimikrobiální aktivitou se řadí mnoho typů molekul; za zmínku stojí např. lysozymy, defenziny nebo fragmenty hemoglobinu hostitele.

Lysozymy jsou proteiny vyskytující se u většiny živočichů. Tyto enzymy lyzují bakterie tak, že štěpí β -1,4 glykosidické vazby nacházející se mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetyl-glukosaminem, které jsou součástí peptidoglykanu buněčné stěny bakterií. První větší studie antimikrobiální aktivity klíštěcích lysozymů byla provedena na *Alveonasmus lahorensis*, *O. papillipes*, *O. moubata*, *H. asiaticum* a *I. persulcatus* (shrnuto v Podboronov, 1990). Další výzkumy ukázaly, že lysozymy se účastní imunitní odpovědi u klíšťáků (Kopáček *et al.*, 1999; Grunclová *et al.*, 2003) i klíšťat (Johns *et al.* 2000; Simser *et al.* 2004; Sonenshine *et al.*, 2005).

Defenziny jsou proteiny s antimikrobiální aktivitou proti G+ bakteriím, přičemž některé izoformy inhibují i G- bakterie, houby a protozoa (Nakajima *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2007). U klíšťat i klíšťáků byla popsána celá řada těchto proteinů a je zřejmé, že jejich exprese je u různých druhů lokalizována v různých tkáních a je většinou ovlivněna sáním nebo infekcí organismu. U klíšťáka *O. moubata* byly např. identifikovány 4 izoformy defenzinu a bylo prokázáno, že jejich exprese je indukována sáním hlavně ve střevě (Nakajima *et al.*, 2001, 2002a, 2002b, 2003). Defenzin nalezený u *D. variabilis* je exprimován a skladován v hemocytech a uvolňuje se do hemolymfy po stimulaci bakteriální infekcí (Ceraul *et al.*, 2003). Dále byly identifikovány preprodefenzinové geny z *O. papillipes* (izoformy A, B a D), *O. tartakovskyi* a *O. puertoricensis* (izoformy A a B), *O. rostratus* (izoforma A) a z *D. marginatus* a *D. reticulatus* (jedna izoforma) (Chrudimská *et al.*, 2009). Přestože u členovců i u klíšťat byla identifikována řada těchto proteinů, přesný mechanismus, jakým účinkují, není dosud znám.

Společně s krví se do střeva klíštěte mohou dostávat i patogeny, a protože v něm chybí proteolytické enzymy, je střevo vhodným prostředím pro množící se mikroorganismy. Nachází se tam ale proteiny s antimikrobiální aktivitou, díky kterým se klíště brání infekci. Kromě proteinů zmíněných výše přispívají k obraně klíštěte také fragmenty hemoglobinu pocházejícího z hostitele. U *Boophilus microplus* byl identifikován hovězí α -hemoglobinový fragment působící proti

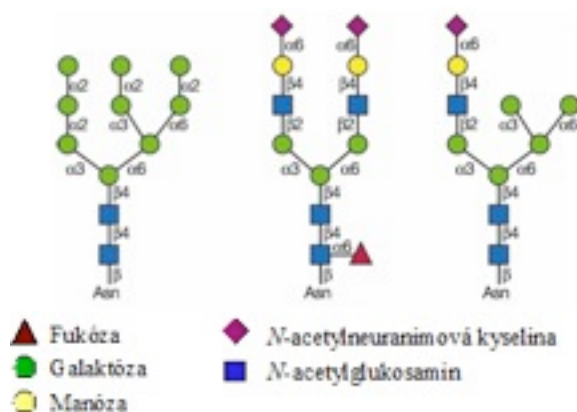
houbám a Gram-pozitivním bakteriím (Fogaca *et al.*, 1999), a u *D. variabilis* byly nalezeny králičí α , β a γ -hemoglobinové fragmenty s antimikrobiální aktivitou, která byla dokonce vyšší v porovnání s aktivitou klíštěcích defenzinů (Sonenshine *et al.*, 2005). I u zástupců klíšťáků (*O. moubata*) funguje obrana proti patogenům tímto mechanismem (Nakajima *et al.*, 2003b).

3.3 Glykosylace

3.3.1 Základní charakteristika a funkce glykanů

Glykosylace je jednou z nejběžnějších ko- a post-translačních modifikací proteinů. Některé právě translatované proteiny se dostávají do endoplasmatického retikula, kde může docházet k připojení glykanů (různě dlouhých postranních řetězců oligosacharidů) k molekule proteinu. Takto posttranslačně jsou upravovány například membránově vázané receptory, sekreční proteiny, nukleoproteiny a většina proteinů syntetizovaných v endoplasmatickém retikulu (shrnutí ve Varki *et al.*, 1999).

Glykany jsou připojovány dvěma základními způsoby a existují tedy dva základní typy: *N*- a *O*-glykosylace. *N*-glykany jsou vázány přes *N*-acetyl- β -D-glukosamin na amidový dusík v asparaginu. Pro tuto glykosylaci musí být přítomná signální sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr, kde Xxx může být jakákoli aminokyselina kromě Pro.



Obrázek 4: typy *N*-glykanů. Zleva: oligomanózové, komplexní a hybridní. Všechny *N*-glykany obsahují jádro $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch8>

O-glykany jsou vázány na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu, a to přes *N*-acetyl- α -D-galaktosamin. Pro *O*-glykany zatím žádná signální sekvence zjištěna nebyla (shrnutí ve Varki et al., 1999).

Biologické funkce glykanů jsou různé a zahrnují jak funkce málo významné, tak funkce nezbytné pro vývoj, růst, fungování nebo pro přežití organismu, který je syntetizuje. Funkce glykanů lze rozdělit na dvě kategorie, a to na strukturní a modulační vlastnosti glykanů a na specifické interakce glykanů s jinými molekulami. V některých případech se zdá, že glykosylace pouze vylepšuje primární funkci proteinu, než aby ji např. spouštěla nebo blokovala. Na druhou stranu ale tato vlastnost vytváří důležitou rozmanitost funkcí z omezeného souboru základních interakcí receptoru s ligandem (shrnutí ve Varki et al., 1999).

3.3.2 Glykosylace a glykany bezobratlých

V rámci skupiny bezobratlých jsou studovány především glykosylace hmyzu a modelových organismů (*D. melanogaster* nebo *C. elegans*). Už poměrně dlouho je známo, že *N*-glykany členovců mají vysoký obsah manózy (Altmann et al., 2001). V posledních letech byl díky využití analytických technik s vyšší citlivostí prokázán rovněž výskyt hybridních i komplexních *N*-glykanů v minoritním množství (10 % z celkového množství *N*-glykanů) (Aoki et al., 2007, Paschinger et al., 2006).

U *D. melanogaster* převládají *N*-glykany obsahující vysoký obsah manózy a paucimanózy, které mohou být fukosylovány na chitobiosovém jádře (dimer β -1,4-vázaných glukosaminových jednotek). Dále byly nalezeny hybridní, komplexní glykany se dvěma a třemi anténami s občasným výskytem α 2,6-vázané kyseliny sialové (North et al. 2006; Aoki et al., 2007). *N*-glykanový profil se během vývoje embrya *D. melanogaster* mění, což naznačuje, že během různých fází vývoje embrya existuje specifická regulace glykosylace i specifické role pro určité glykany (Aoki et al., 2007).

Nejčastěji zastoupenou skupinou glykanů *C. elegans* jsou stejně jako u *D. melanogaster* vysoce manosylované struktury, naopak v minoritním množství byly pozorovány menší hybridní (truncated hybrid) a komplexní glykany s jedním nebo dvěma HexNAc zbytky na pentasacharidovém jádře. Dále byly nalezeny unikátní vysoce fukosylované menší struktury, glykany bohaté na fosforylcholin a glykany s methylovými

skupinami napojenými na fukózu (Hanneman *et al.* 2006; Cipollo *et al.* 2005; Paschinger *et al.* 2008).

Složení glykanů u těchto nejvíce prostudovaných modelových organismů se značně liší od savčích *N*-glykanů, u kterých převládají hlavně vysoce sialované hybridní a komplexní glykany (Gagneux a Varki 1999).

O-glykany jsou u hmyzu přidávány na serin a threonin sekretovaných, membránových a intracelulárních proteinů. Strukturální složitost je různá v rozmezí od jednoduchých monosacharidů k modifikovaným glykosaminoglykanovým řetězcům a zdá se, že se jedná o zjednodušené verze savčích *O*-glykanů.

Glykany, resp. glykoproteiny bezobratlých mohou u lidí vyvolávat alergickou reakci (např. včelí jed, Tretter *et al.*, 1993), lektin-sacharidové interakce hrají hlavní roli při rozpoznávání parazitů (např. shrnuto v Fujita *et al.*, 2004), *O*-glykosylace zase mění aktivitu transkripčního faktoru u *D. melanogaster* (Kelly and Hart, 1989). Glykany prokazatelně hrají významnou roli v mnoha procesech, a proto je třeba jim věnovat více pozornosti než tomu bylo dosud.

3.3.3 Glykosylace a glykany klíšťat

I přes značné množství přibývajících poznatků o klíštěcím genomu a proteomu, informací o klíštěcích glykomech je stále minimum. U klíšťat byly zatím glykosylace/ glykany studovány pouze okrajově, s výjimkou plasmového lektinu Dorin M z *O. moubata* (Man *et al.*, 2008) a klíštěte *I. ricinus*, u kterého byl studován *N*-glykosialom (*N*-vázané glykany ze slin a slinných žláz) (Šterba *et al.*, v přípravě). U lektinu Dorin M byly po MS analýze objeveny glykany manóзовého typu a glykany s fukózou vázanou na jejich jádře (core-fukóza) (Man *et al.* 2008). Ve slinách a slinných žlázách *I. ricinus* byly detekovány kromě vysoce manosylovaných glykanů bez anebo s fukózou vázanou na jejich jádro také komplexní glykany s core-fukózou. Posledně jmenované glykany ve hmotnostních spektrech převládaly (55 %, Šterba *et al.*, v přípravě), což se liší od výsledků u *D. melanogaster* (kde tvořily pouze 13 % z všech pozorovaných).

Další informace o klíštěcích glykanech přinesly nepřímé analýzy pomocí lektinoblotů (Grubhoffer a Dusbábek, 1991; Kamwedo *et al.* 1993; Uhlíř *et al.* 1994; Vancová *et al.* 2006), které ale neposkytují dostatek informací ani o typu, ani o charakteru daného glykanu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Klíšťata

Klíšťata rodu *Dermacentor marginatus* byla získána z laboratorních chovů Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd, v.v.i. v Českých Budějovicích. Samice a samci po metamorfóze byli odděleni a chováni ve skleněných nádobkách ve vlhkém prostředí při 26 °C. Pro pokusy byly požíváni nasátí a nenasátí samci a samice. Klíšťata sála na laboratorních morčatech po dobu 6 dnů.

4.1.2. Roztoky a pufrы

Tabulka 1: Připravené roztoky a pufrы

PŘÍPRAVA PLASMY	Fyziologický roztok	0,15 M NaCl
PŘÍPRAVA POLYKLONÁLNÍHO SÉRA	PBS	14 mM NaCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,27 mM KCl, pH 7,4
GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE)	Elektrodotový pufr (5x)	0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 0,5% SDS
	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,05% CBB R-225 ve směsi methanol:kyselina octová:destilovaná voda (50:10:40)
	Odbarvovací roztok	methanol:kyselina octová:destilovaná voda (20:10:65)
	10% SDS	10% SDS v destilované vodě
	10% APS	10% APS v destilované vodě
	Gelový pufr (5x)	1,875 M Tris/HCl, pH = 8,8
	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (TRICINE-SDS-PAGE)	Anodový pufr (10x)
Katodový pufr (10x)		1 M Tris, 1 M Tricin, 1% SDS, pH = ~8,25
Gelový pufr (3x)		3 M Tris, 1 M HCl, 0,3% SDS, pH = ~8,45
Roztok AB-3		směs akrylamid-bisakrylamid 49,5%T, 3%C
1% SDS		1% SDS v katodovém pufru

BLUE NATIVE PAGE	Anodový pufr	25 mM Imidazol, pH = 7,0
	Katodový pufr B	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02% CBB G-250, pH = ~7,0
	Katodový pufr B/10	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,002% CBB G-250, pH = ~7,0
	Gelový pufr (3x)	75 mM Imidazol, pH = 7,0
	Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250	0,05% CBB R-250 ve směsi methanol:kyselina octová:destilovaná voda (50:10:40)
ELEKTROELUCE	Elektroeluční pufr	200 mM glycin, 25 mM Tris-HCl, 0,025% SDS, pH = 8,5
WESTERN BLOTING	Blotovací pufr	20% methanol, 25 mM Tris-base, 150 mM glycin
LEKTINOBLOTING	TBS	0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH = 7,5
	Pufr 1	TBS; 1 mM MnCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , pH = 7,5
	Pufr 2	0,1 M Tris, 0,05 mM MgCl ₂ , 0,1 mM CaCl ₂ , pH = 9,5
IMUNOBLOTING	PBS	14 mM NaCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,27 mM KCl, pH = 7,2
	5% mléko	5% odtučněné sušené mléko v PBS
	PBS-Tween 20	0,05% Tween 20 v PBS
	Vyvíjecí roztok	0,1 M Tris, 0,05 mM MgCl ₂ , 0,1 mM CaCl ₂ , pH = 9,5; NBT/BCIP solution
	Primární protilátky	králičí imunní sérum proti Dorinu M, myší imunní sérum proti HA D. <i>marginatus</i> , <i>I. ricinus</i> a proti HLGP (Laboratoř molekulární biologie vektorů a patogenů, PaÚ BC AVČR)
IMUNOPRECIPITACE	PBS	14 mM NaCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,27 mM KCl, pH = 7,2
	PBS-Tween	1% a 0,01% Tween-20 v PBS
HEMAGLUTINAČNÍ AKTIVITA	aglutinační pufr	20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH = 7,2
	2% suspenze myších erytrocytů	fyzilogický roztok
REZONANCE POVRCHOVÉHO PLASMONU	reakční pufr	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 TWEEN
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE		1 mM octan sodný
	matrice	2,5-dihydroxybenzoová kyselina 10mg/ml v 1 mM octanu sodném

4.1.3 Kity

Tabulka 2: Kity a chemikálie

PŘÍPRAVA PROTILÁTEK	Freundovo adjuvans (SERVA)
	Glycerol (CALBIOCHEM)
GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE)	Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	4x Vzorkový pufr + 0,8 M DTT (Fermentas)
	5x Vzorkový pufr (Fermentas)
	30% Akrylamid mix (Merck)
	TEMED (SERVA)
BN-PAGE	Glycerol (CALBIOCHEM)
	Ponceau S (Fluka)
IMUNOBLOTTING	Sekundární protilátka: kozí anti-myší IgG značená alkalickou fosfatázou (Vector Labs)
	Methanol (Merck)
DETEKCE GLYKOPROTEINŮ	DIG Glycan Detection Kit (ROCHE Applied Sciences)
LEKTINOBLOTTING	DIG Glycan Differentiation Kit (ROCHE Applied Sciences)
ENZYMATICKÁ DEGLYKOSYLACE	Endo H (New England Biolabs)
	PNGáza F (New England Biolabs)
	PNGáza A (Roche Applied Science)
	denaturační pufr (5% SDS, 0,4M DTT)
	0,5M fosforečnan sodný, pH=7,4
	0,5M citrát sodný pH=5,5
IMUNOPRECIPITACE	Magnetické kuličky Dynabeads (Invitrogen)
	Inhibitory proteáz (Thermo SCIENTIFIC)
	Eluční pufr (Pierce)
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	Methyljodid (Sigma-Aldrich)
	NaOH kuličky (Sigma-Aldrich)
	DMF (Sigma-Aldrich)
	chloroform (MERCK)

4.2 Metody

4.2.1 Příprava plasmy

Hemolymfa z nasátých a nenasátých samců a nasátých a nenasátých samic byla odebrána po odstřížení části přední končetiny klíštěte. Kapky hemolymfy byly sbírány do fyziologického roztoku obsahujícího inhibitory proteáz (Thermo Scientific) (hemolymfa

z asi 8 klíšťat do objemu 50 μ l). Po shromáždění hemolymfy ze všech klíšťat byly z roztoku odstraněny hemocyty centrifugací roztoku 10 minut při 100 g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a dále centrifugován při 23000 g a 4 °C. Plasma i hemocyty byly dále uchovávány při -20 °C.

Střevo a slinné žlázy byly vypitvány z pěti částečně nasátých samic, několikrát důkladně promyty v PBS a homogenizovány v 300 μ l PBS 2 minuty při frekvenci 30 Hz (Tissue Homogenizer, Qiagen). K homogenátům byly přidány inhibitory proteáz (Thermo Scientific) a orgány byly skladovány při -70 °C.

4.2.2 Příprava polyklonálního séra

4.2.2.1 Protilátky proti hemaglutinační aktivitě

Plasma *D. marginatus* byla naředěna 1:5 a 100 μ l naředěné plasmy bylo smícháno se 100 μ l 2% myších krvinek a ponecháno 1 hod při pokojové teplotě. Směs pak byla centrifugována 5 min při 400 g a 4°C. Supernatant byl odebrán a krvinky byly 3x promyty ve fyziologickém roztoku. Po posledním promytí bylo k supernatantu přidáno nekompletní Freundovo Adjuvans (SERVA) v poměru 1:1 a 80 μ l suspenze byla injikována BALB/c myším. Imunizace byla opakována celkem 4x, vždy po 14 denních intervalech. 14 dní po poslední imunizaci byla myším odebrána krev a po koagulaci byla centrifugována (8000 g, 4°C). K odebranému séru byl přidán stejný objem glycerolu. Takto připravené protilátky byly rozděleny do alikvotů a uchovávány při -20°C.

Imunní séra byla použita k charakterizaci proteinů po deglykosylaci a pro izolaci proteinů pomocí afinitní chromatografie

4.2.2.2 Protilátky proti HLGp

Proteiny plasmy *D. marginatus* byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a obarveny pomocí CBB R-250. Příslušné proteiny byly vyřezány z gelu a homogenizovány s 240 μ l PBS. K homogenátu bylo přidáno nekompletní Freundovo Adjuvans (SERVA) v poměru 1:1 a směs (80 μ l) byla podkožně injikována BALB/c myším. Imunizace byla opakována celkem 4x vždy po 14 denních intervalech. 14 dní po poslední imunizaci byla myším odebrána krev a po koagulaci byla centrifugována (8000 g, 4 °C). K odebranému séru byl

přidán stejný objem glycerolu. Takto připravené protilátky byly rozděleny do alikvotů a uchovávány při -20 °C.

Imunní séra byla použita k imunoblotu a k izolaci proteinů pomocí imunoprecipitace.

4.2.3 Elektroforetické metody

4.2.3.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Separace proteinů podle molekulové velikosti probíhala polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. SDS-PAGE byla provedena podle Laemmliho (1970) na připravených 5-17,5% gradientových gelech. Gradientové gely byly použity s Tris-glycinovým elektroforézovým pufrům pro detekci glykoproteinů, imunobloting, deglykosylace, lektinobloting a pro imunoprecipitaci. Množství jednotlivých složek pro 5% a 17% gely je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Množství složek pro přípravu 4 gradientových gelů s gradientem 5 až 17,5 % akrylamidu.

GRADIENTOVÝ GEL (4 GELY)			
5% gel	objem	17,5% gel	objem
30 % akrylamid mix	3,75 ml	30 % akrylamid mix	10,2 ml
gelový pufr (5x)	4,5 ml	gelový pufr (5x)	3,5 ml
destilovaná voda	14,94 ml	destilovaná voda	2,55 ml
glycerol		glycerol	3,5 ml
10 % SDS	0,225 ml	10 % SDS	0,175 ml
10 % APS	0,09 ml	10 % APS	0,03 ml
TEMED	0,005 ml	TEMED	0,005 ml

Vzorky plasmy nasátých samic byly kvůli vysoké koncentraci proteinů naředěny 1:5 ve fyziologickém roztoku a dále byly stejně jako ostatní vzorky smíchány s odpovídajícím množstvím 4x vzorkového pufru (s DTT – redukující) nebo 5x vzorkového pufru (bez DTT – neredukující) a zahřívány 3 minuty při 95 °C. K určení molekulových velikostí byl použit proteinový standard (SDS-PAGE) a značený proteinový

standard (blotovací techniky). Elektroforéza probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli při 130V cca 1 hod a 30 min.

Gely byly barveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo použity pro western blotting k dalším analýzám.

4.2.3.2 2D elektroforéza: Blue Native-PAGE/Tricine-SDS-PAGE

Pro zjištění, které proteiny plasmy *D. marginatus* se nachází v nativním stavu v komplexu, byla použita 2D elektroforéza, tj. nativní elektroforéza v prvním směru a elektroforéza s SDS v druhém směru (viz níže).

4.2.3.3 Blue Native PAGE (BN-PAGE)

Pro přípravu vzorků pro nativní elektroforézu k nim byl přidán glycerol do výsledné koncentrace 5 % a Ponceau S do výsledné koncentrace 0,01 %. Rozdělení proteinů plasmy podle jejich velikosti probíhalo metodou Blue Native PAGE na elektroforetické aparatuře Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) podle Wittiga *et al.*, (2006). Pro tuto metodu byly použity gradientové gely (3,5% zaostřovací část a 6%-13% separační část) a katodový (B a B/10) a anodový pufr.

Tabulka 5: Složení zaostřovacího a gradientového separačního gelu

	zaostřovací gel	gradientový separační gel	
	3,5% akrylamid	6% akrylamid	13% akrylamid
AB-3 mix	0,44 ml	2,2 ml	3,9 ml
Gelový pufr 3x	2 ml	6 ml	5 ml
Glycerol	-	-	3 g
Destilovaná voda	3,4 ml	9,7 ml	5ml
10% APS	50 µl	100 µl	75 µl
TEMED	5 µl	10 µl	7,5 µl

Elektroforéza probíhala v katodovém pufru B při 7 °C při počátečním napětí 100 V. Po proniknutí proteinů do zaostřovacího gelu byl vyměněn katodový pufr B za katodový pufr B/10 a proud byl omezen na horní hranici 15 mA.

Po skončení elektroforézy byl gel obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo byl použit pro druhý směr (Tricine SDS-PAGE) 2D elektroforézy.

4.2.3.4 Gelová elektroforéza (Tricine SDS-PAGE)

Tricinová SDS-PAGE (Schägger, 2006) následovala po BN-PAGE jako druhý směr elektroforézy. Pro tuto elektroforézu byly připraveny gely se 4% zaostřovací částí a 10% separační částí podle Tabulky 6.

Tabulka 6: Složení zaostřovacího a separačního gelu

	zaostřovací gel	separační gel
	4% akrylamid	10% akrylamid
AB-3 mix	1 ml	6 ml
Gelový pufr 3x	3 ml	10 ml
Glycerol	-	3 g
Destilovaná voda	8 ml	11 ml
10% APS	90 μ l	150 μ l
TEMED	9 μ l	15 μ l

Jako vzorek byl použit proužek BN-PAGE gelu s nativními proteiny plasmy, který byl po nativní elektroforéze inkubován 1 hodinu v katodovém pufru s přidaným 1% SDS při pokojové teplotě a následně vložen mezi elektroforetická skla (cca 1cm pod okraj kratšího skla). Mezi skla byl nalit 10% separační gel tak, aby jeho hladina sahala těsně pod vložený proužek a po jeho ztuhnutí byl proužek z BN-PAGE zalit 4% zaostřovacím gelem. Tricinová SDS-PAGE probíhala cca 2,5 hodiny při omezení proudu do 50 mA. Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.2.4 Elektroeluce (EE)

Vzhledem k tomu, že optimalizace izolace HLGP imunoprecipitací byla zdlouhavá a vyžadovala mnoho změn oproti původním protokolům, byla pro získání čistého (leč denaturovaného) proteinu použita elektroeluce tohoto proteinu z SDS PAGE gelu.

Protein, který byl imunoblotem a MS analýzou identifikován jako HLGP byl vyřezán z gelu a umístěn do elektroelučních zkumavek spolu s 800 μ l elektroelučního pufru. Zkumavky byly umístěny do stojanu v horizontální elektroforetické aparatuře a

zality elektroelučním pufrem. EE probíhala cca 3 hodiny při 100 V. Po uplynutí této doby byl směr elektrického proudu obrácen na 30s, aby se protein uvolněný z gelu dostal z membrány zkumavky do pufru.

Takto připravený čistý protein byl dále charakterizován biochemickými metodami, jako je Schiffovo barvení, lektinobloting a enzymatická deglykosylace.

4.2.5 Enzymatická deglykosylace

Elektroeluovaný HLGP byl deglykosylován glykosidázami Endo H, PNGázou F (New England Biolabs, Ipswich, MA) a PNGázou A (Roche Applied Science) při redukujících i neredukujících podmínkách. Pro deglykosylaci směsí PNGázy A/F za redukujících podmínek bylo smícháno 68 μ l elektroeluovaného HLGP s 10 μ l denaturačního pufru a směs byla zahřívána na 95°C po dobu 10 min. K roztoku bylo dále přidáno 10 μ l 0,5M fosforečnanu sodného, 10 μ l Nonidentu P-40, 0,5 μ l PNGázy A, 0,5 μ l PNGázy F, a 1 μ l deionizované vody.

Pro deglykosylaci s glykosidázou Endo H za redukujících podmínek bylo smícháno 68 μ l elektroeluovaného HLGP s 10 μ l denaturačního pufru a směs byla zahřívána na 95°C po dobu 10 min. K roztoku bylo dále přidáno 10 μ l 0,5M citrátu sodného, 2 μ l Endo H, a 10 μ l deionizované vody.

Deglykosylace za neredukujících podmínek byla prováděna stejným způsobem, kromě denaturačního kroku, který byl vynechán.

4.2.6 Blotovací metody

PVDF membrána (Bio-Rad) byla inkubována 5 min. v methanolu a ekvilibrována v blotovacím pufru. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny z gelu na PVDF membránu pomocí aparatury TRANS-BLOT® SD SEMI DRY TRANSFER (Bio-Rad) metodou podle Towbina *et al.* (1979). Blotování probíhalo přibližně 1 hodinu při 20 V. Membrána byla použita k identifikaci proteinů protilátkami, k detekci glykoproteinů a k určení glykanů na jejich povrchu.

4.2.6.1 Immunobloting

Membrána byla promyta PBS pufrem (cca 50 ml), nakrájena na proužky dle separovaných vzorků a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě v 5% odstředěném sušeném mléce v PBS. Proužky membrány byly následně inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C s příslušnou primární protilátkou ředěnou 1:1000, 3x promyty v PBS-Tween 20 (1 ml na proužek) a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C se sekundární anti-myší protilátkou značenou alkalickou fosfatázou a ředěnou 1:1000 v 5% mléce. Po inkubaci byly proužky membrány opět promyty v roztoku PBS-Tween 20 a v PBS. Barevná reakce byla vyvolána vyvíjecím roztokem (Alkaline Phosphate Substrate Kit IV, Vector laboratories) a fotograficky zdokumentována. Reakce byla zastavena důkladným promytím membrány v destilované vodě.

4.2.6.2 Detekce glykoproteinů

Glykosylované proteiny byly detekovány kitem DIG Glycan Detection Kit (ROCHE), který pracuje na principu Schiffova barvení glykanů. Elektroelovaný HLGP byl separován na SDS-PAGE, přenesen na PVDF membránu a barven přesně podle instrukcí výrobce. Principem metody je oxidace hydroxylových skupin glykoproteinů na aldehydové jodistanem sodným, kovalentní připojení steroidního haptenu digoxigeninu (DIG) na tyto aldehydové skupiny a detekce označených glykoproteinů anti-DIG protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou.

4.2.6.3 Lektinobloting

K určení vazebné specifity HLGP byly použity lektiny (DIG Glycan Differentiation Kit, ROCHE) konjugované s (DIG). Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Dle postupu doporučeného výrobcem bylo provedeno značení jednotlivými lektiny (GNA, SNA, DSA, MAA, PNA; viz Tabulka 7) a následná inkubace s anti-DIG protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Po důkladném promytí byla membrána ponořena do roztoku NTB/BCIP, v kterém probíhala reakce.

Tabulka 7: Názvy, zkratky a vazebná specifita použitých lektinů

zkratka	název	vazebná specifita
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	terminální manóza
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	sialová kyselina, terminálně připojená (2-6) ke galaktóze nebo <i>N</i> -acetyl-galaktosaminu
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	sialová kyselina terminálně připojená (2-3) ke galaktóze
PNA	peanut agglutinin	galaktóza- β (1-3)- <i>N</i> -acetyl-galaktosamin
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin	galaktóza- β (1-4)- <i>N</i> -acetyl-glukosamin <i>N</i> -acetyl-glukosamin

4.2.7 Imunoprecipitace

Protein HLGP byl izolován imunoprecipitací z plasmy pomocí protilátek proti hemaglutinační aktivitě plasmy *D. marginatus*. Optimalizovaný protokol zahrnoval smíchání 20 μ l plasmy s 5 μ l anti HA protilátek, 5 μ l inhibitorů proteáz a 1 μ l 1% PBS-Tweenu. Směs byla doplněna PBS na 0,5 ml a inkubována ve 4°C 6 h anebo přes noc. Poté bylo ke směsi přidáno 10 μ l magnetických kuliček (30 mg/ml) s navázaným proteinem G (Invitrogen, Life Technologies) a reakce probíhala dále 1 hodinu při pokojové teplotě. Kuličky byly promyty 4x 0,01% PBS-Tweenem a navázaný HLGP byl poté uvolněn elucí 2x 15 min s elučním pufrem obsahujícím primární aminy (Pierce, Life Technologies). SDS-PAGE a imunoblotem bylo potvrzeno, že se jedná o HLGP.

Čistý protein byl použit pro měření jeho vazebné specifity k sacharidům pomocí SPR (surface plasmon resonance) a k MS analýze.

4.2.8 Hemaglutinace

Určení hemaglutinační aktivity (HA) bylo prováděno podle práce Grubhoffer a Kovář (1998) v mikrotitračních deskách (96 jamek, typ U) ředěním 50 μ l purifikovaného HLGP dvojkovou řadou v 50 μ l aglutinačního pufru a následným přidáním 50 μ l 2% suspenze myších erytrocytů. Titr HA byl odečten po 1h inkubace při pokojové teplotě a vyjádřen jako reciproká hodnota nejvyššího ředění vzorku plasmy, při kterém bylo ještě možné zaznamenat pozitivní aglutinační reakci.

4.2.9 Rezonance povrchového plazmonu ('Surface Plasmon Resonance', SPR)

Kvantitativní měření vazebných interakcí mezi HLGP a sacharidy byla provedena metodou SPR na přístroji BIACORE 3000 (GE Healthcare). Měření interakcí bylo provedeno v laboratoři Doc. RNDr. Michaely Wimmerové, Ph.D za pomoci Mgr. Lenky Malinovské (Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno).

Pro měření vazebné specifity nativního purifikovaného hemelipoglykoproteinu byl použit čip s imobilizovanými monosacharidy – α -D-galaktóza na kanálu 1, α -D-manóza/ α -L-fukóza na kanálu 2, α -D-manóza na kanálu 3 a α -L-fukóza na kanálu 4. Na čip bylo injektováno 15 μ l purifikovaného HLGP. V případě analýzy závislosti vazby na přítomnosti dvoumocných kationtů bylo injikováno 10 μ l HLGP s přidavkem 25 mM EDTA. Rychlost průtoku reakčního pufru byla pro všechny pokusy nastavena standardně na 5 μ l/min. Odezva na jednotlivých kanálech byla zaznamenávána softwarem výrobce.

4.2.10 Hmotnostní spektrometrie ('Mass Spectrometry', MS)

4.2.10.1 Permetylace N-glykanů na pevné fázi

Glykany uvolněné PNGázou A/F byly purifikovány pomocí centrifugačních kolon s náplní aktivního uhlí (Harvard Apparatus), vysušeny ve vakuu a rozpuštěny v 5 μ l vody. K vzorkům bylo přidáno 70 μ l DMF a 25 μ l methyl iodidu. Směs byla nanesena na centrifugační kolony (Harvard Apparatus) s kuličkami NaOH (Sigma-Aldrich), inkubována 15 min při pokojové teplotě a centrifugována při 200 g 1 min. K roztoku bylo přidáno 25 μ l methyl iodidu, směs byla opět nanesena na kolonu, inkubována 15 min a centrifugována při 200 g 1 min (Alley *et al.*, 2010). Kuličky byly poté promyty 100% acetonitrilem a centrifugovány při 1 min. Permetylované glykany v kapalných frakcích byly extrahovány chloroformem a vysušeny ve vakuu.

4.2.10.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostně spektrometrické analýzy byly provedeny v National Center for Glycomics and Glycoproteomics (Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA) vedeném Prof. Milošem V. Novotným s pomocí Dr. Williama R. Alleyho a Benjaminu F. Manna.

Elektroforeticky separovaný HLGP byl vyřezán z akrylamidového gelu a naštěpen trypsinem podle návodu výrobce (ROCHE). Tryptické štěpy byly podrobeny LC-MS analýze. Peptidy byly rozděleny pomocí HPLC (jako mobilní fáze byl použit C18 silikagel, Dionex) s gradientem acetonitrilu (5-80 %) a analyzovány pomocí FT-ICR hmotnostního spektrometru (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, Thermo Fisher). Obdržená data byla porovnána s databázemi Acari non-redundant a Swiss-Prot za použití programu MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Permetylované glykany byly smíchány s 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou (10 mg/ml v 1mM octanu sodném), nakapány na kovovou MALDI destičku a analyzovány na přístroji 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer ('Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight', Applied Biosystems, Inc.) v pozitivním módu. Naměřená data byla následně konvertována do formátu mzXML (ConvertPeakList, <https://www.proteomecommons.org>) a zpracována pomocí programů mMass (Strohalm *et al.*, 2008) a GlycoWorkbench (Ceroni *et al.*, 2008).

5 VÝSLEDKY

5.1 Detekce a identifikace HLGP v plasmě *D. marginatus*

Potenciální lektiny plasmy *D. marginatus* rozdělené v SDS-PAGE za neredukujících podmínek byly identifikovány metodou imunoblotingu s primárními protilátkami proti HA plasmy *D. marginatus* a *I. ricinus*, a protilátkami proti plasmovému lektinu Dorinu M z *O. moubata*. Proteiny o velikostech 37 kDa, 79 kDa, 80 kDa a 290 kDa (Dupejová 2008, Dupejová et al., v tisku) byly vyřezány z gelu a podrobeny MS analýze (ESI-FT-ICR MS). Tři z nich se nepodařilo identifikovat; čtvrtý z nich (290 kDa protein) byl identifikován jako protein blízké příbuzný hemlipoglyko-transportnímu proteinu (DvCP) z *D. variabilis* (hemlipoglycoprotein precursor, GenBank číslo ABD83654) a pojmenován hemlipoglykoprotein (HLGP). Na základě známých sekvencí DvCP prekurzorů 1 a 2 bylo identifikováno 10,2 % a 4 % aminokyselinové sekvence těchto dvou prekurzorů (Tab. 8 a 9).

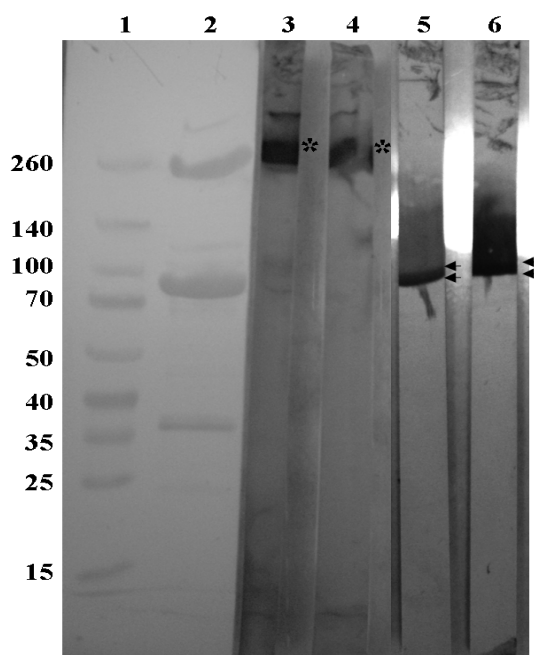
Tabulka 8. Peptidy identifikované FT-MS z *D. variabilis* HLGP. Hemlipoglycoprotein precursor 1 [ABD83654], Mw:178646, Skóre:12286, Identifikované peptidy: 244. Pokrytí 10,2 %.

Peptid	Delta	Expect
K.LEILPVTEDSGLIVR.V	-0,0200	5,00E-09
K.KGVLSLFQLDLVK.G	-0,0100	5,2E-08
R.ASSHLLISSGYNPK.Y	-1,0100	4,5E-06
K.FDEGKLEEF SIGK.N	-1,0100	5,7E-06
R.YVLPLWETNPR.F	-0,0100	6,00E-05
K.HNELSVDDADRFY NK.L	-1,0200	8,8E-05
R.TLDLEEEHDAATDTTLVEAGEK.E	-0,0100	7,2E-05
K.DVEHEPEYESTVFIR.S	-0,0200	0,00012
K.LAHIEYGDEDIKEIDNK.E	-0,0100	0,00033
R.MAALWALK.Q	-0,0100	0,0012
K.FDEGKLEEF SIGK.N	0,0000	1,4E-06
K.ENFVEGLKK.L	0,0000	0,0059
K.NLWNFMGR.R	-0,0100	0,06
K.GVLSLFQLDLVK.G	-1,0200	8,2E-07

Tabulka 9. Peptidy identifikované FT-MS z *D. variabilis* HLGP. Hemelipoglycoprotein precursor 2 [ACF35055], Mw: 171972, Skóre: 707, Identifikované peptidy: 12. Pokrytí 4 %.

Peptid	Delta	Expect
K.ASSHLIISSTYSPK.Y	0,0000	6,40E-06
K.YDYGGMTSSVMIR.S	-1,0200	2,5E-07
R.YVLPEWDHDTR.F	-1,0100	0,0017
R.FYGQLHLNLK.E	-0,0100	0,0068

Proti HLGP byly připraveny myší polyklonální protilátky (Ab 4-1, Ab4-2), které byly dále využity při izolaci a charakterizaci tohoto proteinu. Immunoblot prokázal, že tyto protilátky rozeznávají stejný protein jako anti-HA a anti-Dorin M protilátky v neredukujících podmínkách; po denuraci proteinů plasmy pak tyto protilátky detekovaly dvě podjednotky HLGP o velikostech 95 kDa a 100 kDa (Obr. 5).

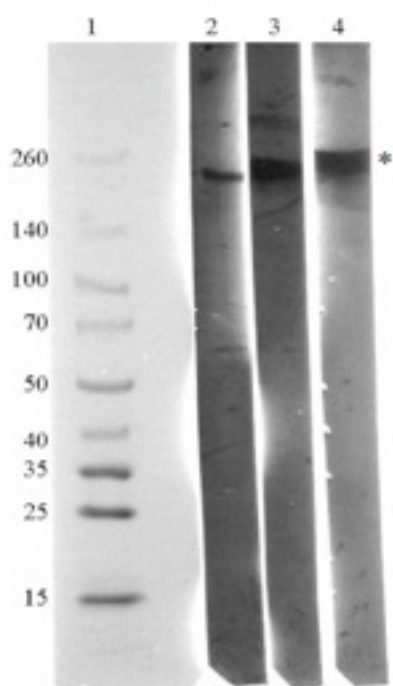


Obrázek 5: detekce neredukovaného a redukováného hemelipoglykoproteinu pomocí anti HLGP protilátek Ab4-1 a Ab4-2 v plasmě nasátých samic *D. marginatus*. 1 - marker, 2 - neredukovaný HLGP detekovaný protilátkou Ab4-1, 4 - neredukovaný HLGP detekovaný protilátkou Ab4-2, 5 - redukováný HLGP detekovaný protilátkou Ab4-1, 6 - redukováný HLGP detekovaný protilátkou Ab4-2. Hvězdička označuje glykosylovaný HLGP, šipky označují redukováné glykosylované podjednotky HLGP.

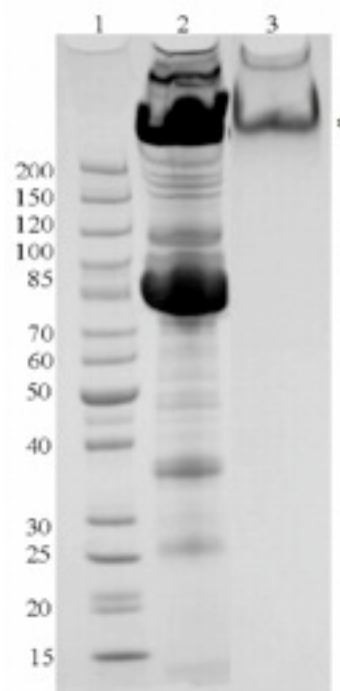
5.2 Izolace HLGP

Pro další biochemické analýzy byl HLGP izolován v nativní (Obr. 6) i denaturované (Obr. 7) formě.

Izolace nativního proteinu probíhala imunoprecipitací hemlipoglykoproteinu z hemolymfy pomocí anti-HLGP protilátek navázaných na magnetické kuličky prostřednictvím proteinu A. Pro izolaci denaturovaného proteinu byla plasma *D. marginatus* elektroforeticky rozdělena, HLGP byl poté vyřezán z gelu a uvolněn do roztoku elektroelucí.



Obrázek 6: Izolace nativního HLGP z plasmy *D. marginatus* imunoprecipitací. 1 - marker, 2 - imunozaření neredukovaného HLGP v plasmě, 3,4 - imunozaření HLGP izolovaného imunoprecipitací. Hvězdička označuje neredukovaný glykosylovaný HLGP.



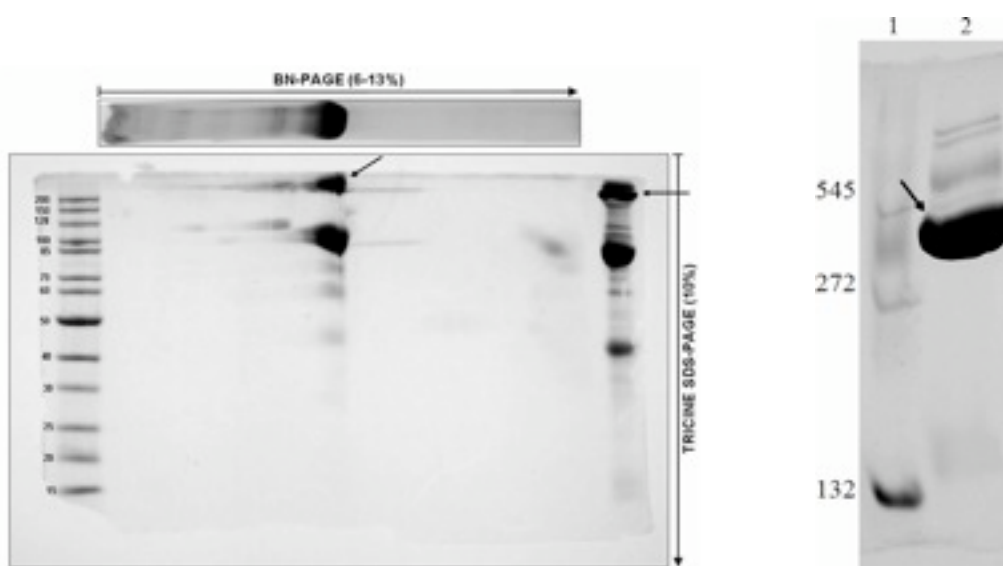
Obrázek 7: SDS-PAGE elektroeluovaného HLGP z plasmy *D. marginatus*. 1-marker, 2-plasma *D. marginatus*, 3-elektroeluovaný HLGP. Hvězdička označuje neredukovaný glykosylovaný HLGP.

Z obrázků je zřejmé, že se podařilo HLGP izolovat oběma způsoby v poměrně čistém stavu a koncentraci přibližně 260 $\mu\text{g/ml}$. V případě promývání magnetických kuliček s navázaným HLGP v pufru bez přítomnosti detergentů se společně s HLGP purifikovaly další proteiny, které nebyly zatím identifikovány a které velikostně odpovídají proteinům s fibrinogenovou doménou ('Fibrinogen-Related Domain', FReD).

5.3 Biochemická charakterizace HLGP

5.3.1 Blue Native-PAGE/SDS-PAGE

Pro získání profilu nativních proteinů plasmy a pro potvrzení tvorby komplexu HLGP s potenciálními lektiny byla provedena dvourozměrná elektroforéza (Obr. 8). V prvním směru byly proteiny plasmy rozděleny na gelu za nativních podmínek; druhý směr představovala Tricinová elektroforéza za přítomnosti SDS sloužící zejména k rozdělení jednotlivých složek komplexů proteinů nacházejících se v plasmě v nativním stavu. Velikost celého komplexu byla určena pomocí BN-PAGE s využitím nativních proteinových markerů (Obr. 9).



Obrázek 8: Blue Native/SDS-PAGE elektroforéza plasmy *D. marginatus*. Proteiny rozdělené nativní elektroforézou jsou v horizontálně položeném proužku gelu nahoře. Druhý směr elektroforézy je vertikální gel; zleva: marker, proteiny plasmy rozdělené ve druhém směru elektroforézy (Tricinová SDS-PAGE), proteiny plasmy rozdělené v prvním směru elektroforézy. HLGP je označen šipkou.

Obrázek 9: Blue Native PAGE proteinů plasmy *D. marginatus*. 1 – nativní marker, 2 - proteiny plasmy. Komplex je označen šipkou.

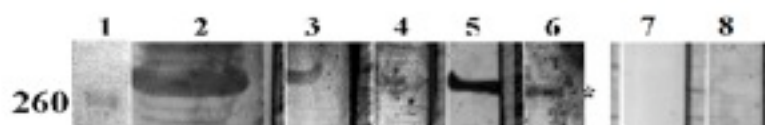
2D elektroforéza *odhalila*, že HLGP je v nativním stavu spolu s ostatními třemi potenciálními sacharidy-vážícími proteiny a s dalšími dosud neidentifikovanými proteiny součástí vysokomolekulárního komplexu (Obr. 8). Velikost tohoto komplexu byla určena pomocí nativní elektroforézy na cca 450 kDa (Obr. 9).

5.3.2 Glykosylace, charakterizace glykanů

Mnoho lektinů a také oba nejvíce charakterizované transportní proteiny obsahují glykany, a proto byla i u HLGP provedena detekce glykoproteinů a následné určení typu a velikosti sacharidových zbytků připojených k proteinu.

Schiffovo barvení elektroeluovaného proteinu (Obr. 10, jamka 3) potvrdilo, že se jedná o glykosylovaný protein. K určení charakteru glykanů byl použit lektinoblotting s vybranými lektiny specifickými pro různé sacharidy (Obr. 10, jamky 4,5,6,7,8).

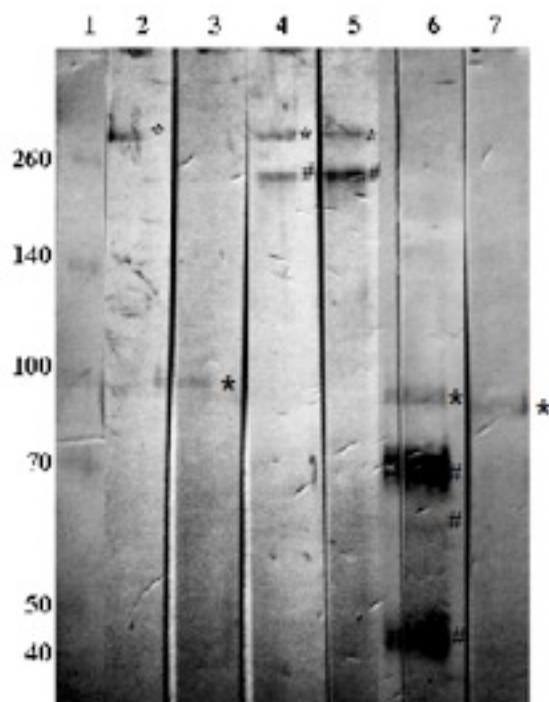
Pro lektinoblot byly vybrány lektiny SNA, GNA, DSA, PNA a MAA.



Obrázek 10: Schiffovo barvení a lektinoblotting proteinů plasmy *D. marginatus*. 1 – marker, 2 – proteiny plasmy, 3 – Schiffovo barvení, 4 - barvení lektinem SNA, 5 – barvení lektinem GNA, 6 – barvení lektinem DSA, 7 - barvení lektinem PNA, 8 – barvení lektinem MAA. Hvězdička označuje glykosylovaný HLGP.

Lektinové barvení ukázalo pozitivní reakci HLGP s lektinem SNA (specifický pro $\alpha(2-6)$ kyselinu sialovou vázanou na Gal/GalNAc), GNA (terminální manóza) a DSA (Gal- $\beta(1-4)$ -GlcNAc). Lektiny PNA (Gal- $\beta(1-3)$ -GalNAc) a MAA ($\alpha(2-3)$ vázaná kyselina sialová) s HLGP nereagovaly. Z těchto výsledků lze usuzovat na přítomnost *N*-glykanů hybridního a komplexního typu, které obsahují terminální manózu, galaktózu nebo kyselinu sialovou. Pozitivní vazba lektinu DSA na protein HLGP může také značit přítomnost *O*-glykanů.

Velikosti *N*-glykanů byly určeny enzymatickou deglykosylací (Obr. 11), resp. určením přibližného rozdílu mezi velikostmi deglykosylovaného a nedeglykosylovaného proteinu, za využití endoglykosidáz Endo H a směsi PNGázy A a F. Kromě PNGázy F byla využita i PNGáza A pro zajištění odštěpení glykanů s $\alpha 1,3$ -vázanou fukózou na jádře glykanů, jejichž přítomnost byla u klíšťat prokázána (Pedra *et al.*, 2010, Štěrbá *et al.*, v přípravě.). Deglykosylovaný HLGP byl poté detekován pomocí anti-HLGP protilátek (Obr. 11).



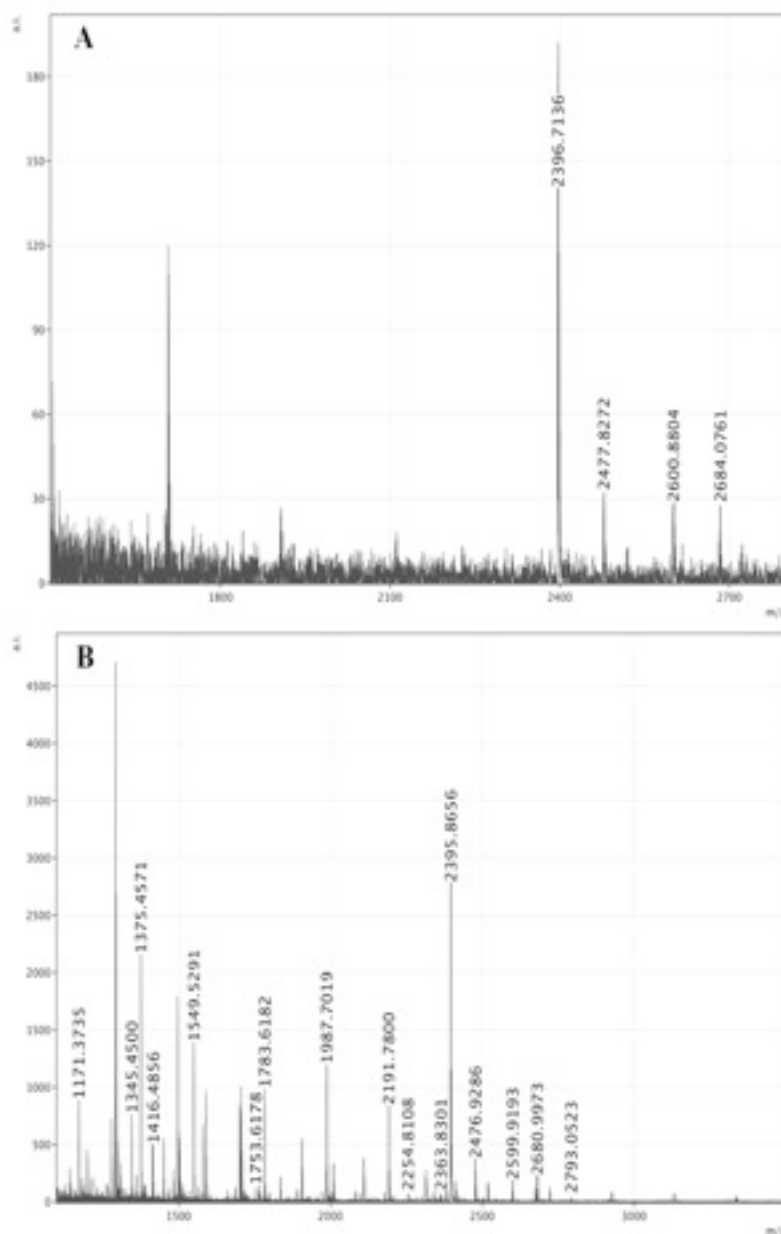
Obrázek 11: Detekce purifikovaného deglykosylovaného HLGP pomocí anti-HLGP protilátek. 1 – marker, 2, 4, 5 – neredukovaný elektroelovaný HLGP, 3, 6, 7 – redukovaný elektroelovaný HLGP, 4, 5 – vzorky deglykosylované Endo H, 6, 7 – vzorky deglykosylované PNGA/F. Hvězdička označuje glykosylovaný HLGP, křížek označuje deglykosylovaný HLGP.

Za nativních podmínek při štěpení oběma typy glykosidáz detekovaly anti-HLGP protilátky dva proteiny o velikostech 250 a 290 kDa. Protože tyto endoglykosidázy jsou méně účinné při deglykosylaci za nativních proteinů, dá se předpokládat, že větší protein představuje glykosylovanou formu a 250 kDa protein formu deglykosylovanou, a tedy, že *N*-glykanové zbytky mají velikost přibližně 40 kDa.

Po deglykosylaci za denaturačních podmínek anti-HLGP protilátky reagovaly se čtyřmi proteiny/podjednotkami HLGP o velikostech 100 kDa, 77 kDa, 68 kDa a 43 kDa.

5.4 Hmotnostní spektrometrie

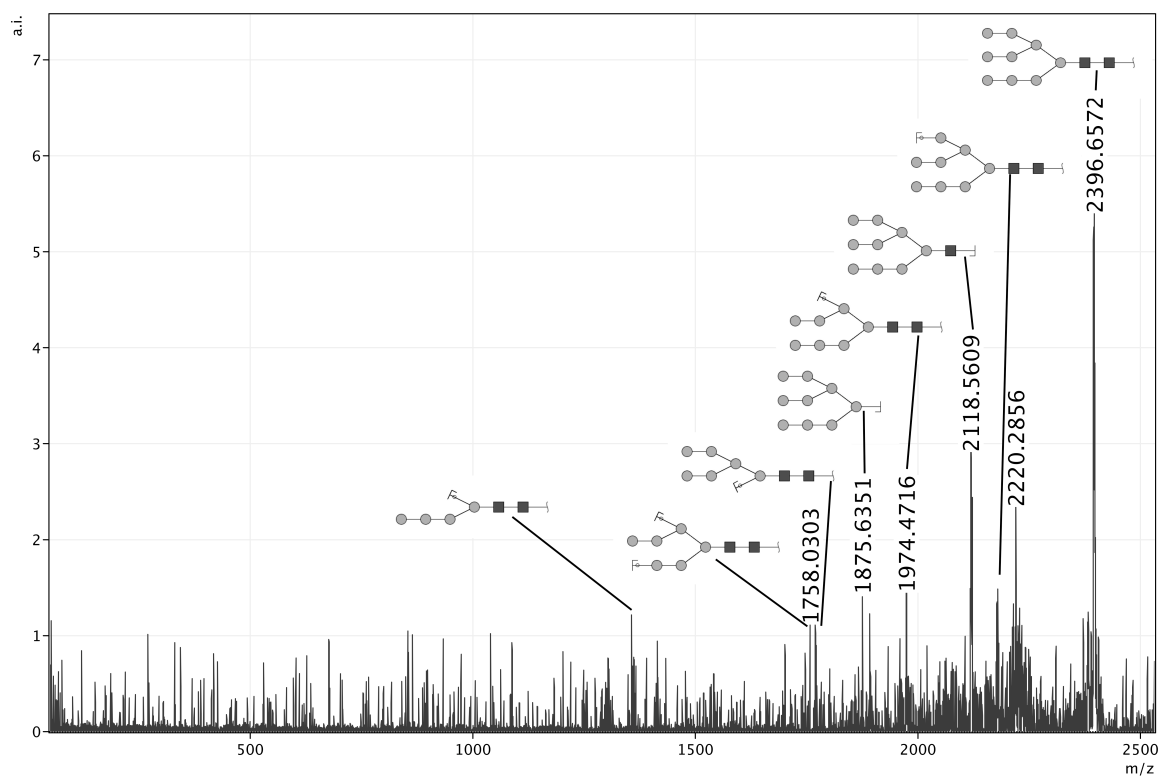
MALDI TOF/TOF analýza glykanů z purifikovaného HLGP poskytla informace o jejich hmotnostech a složení (Obr. 12A). Identifikovány byly vysoce manosylované struktury se složením HexNAc₂Hex₉ a HexNAc₂Hex₁₀ (m/z 2396,7 a 2600,8) a komplexní glykany se složením HexNAc₄Hex₇ a HexNAc₄Hex₈ (m/z 2477,8 a 2684) (Obr. 12A).



Obrázek 12: MS spektra *N*-glykanů uvolněných z purifikovaného HLGP (A) a plasmy *D. marginatus* (B). A – čtyři signály *N*-glykanů odpovídající HexNAc₂Hex₉ (m/z 2396,7), HexNAc₂Hex₁₀ (m/z 2600,8), HexNAc₄Hex₇ (m/z 2477,8), a HexNAc₄Hex₈ (m/z 2684). Ostatní detekované signály odpovídají *O*-glykanům a sérii hexóz. B – identifikace vysoce manosylovaných glykanů obsahujících HexNAc₂Hex₃ až HexNAc₂Hex₁₀ (m/z 1171,3, 1375,4, 1783,6, 1987,7, 2191,8, 2395,9, 2599,9) a komplexních fukosylovaných a nefukosylovaných glykanů HexNAc₃Hex₃ (m/z 1416,5), HexNAc₂Hex₄dHex₁ (m/z 1549,5), HexNAc₂Hex₅dHex₁ (m/z 1753,6). Ostatní detekované signály odpovídají *O*-glykanům a sérii hexóz.

Struktura jednotlivých glykanů byla potvrzena MS/MS analýzou, kdy se jednotlivé ionty odpovídající glykanům fragmentovaly a dále analyzovaly. Vzorové spektrum pro HexNAc₂Hex₉ (m/z hodnota 2396,7) je zobrazeno na Obr. 13. Původní struktura je

ozobrazena při píku 2396,6 a představuje vysoce manosylovaný typ *N*-glykanu. Další struktury, vzniklé při fragmentaci jsou vztažené k jednotlivým píkům. Zobrazeny jsou fragmenty, z kterých lze usuzovat na strukturu původního glykanu a to podle počtu odštěpených sacharidových jednotek z redukujícího popř. neredukujícího konce.



Obrázek 13: Vzorové MS/MS spektrum HexNAc₂Hex₉ (*m/z* hodnota 2396,7)

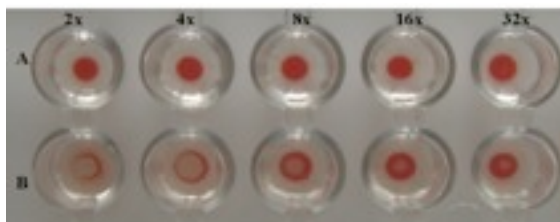
Pro srovnání složení a charakteru glykanů byly analyzovány dále *N*-glykany hemolymfy *D. marginatus* (Obr. 12B). Kromě všech čtyř struktur glykanů nalezených u HLGP, byly identifikovány další glykany manosylového typu glykany se složením v rozmezí HexNAc₂Hex₃ až HexNAc₂Hex₈ (*m/z* 1171,3, 1375,4, 1783,6, 1987,7, 2191,8) a fukosylované a nefukosylované glykany komplexního typu HexNAc₃Hex₃ (1416,5), HexNAc₂Hex₄dHex₁ (1549,5), HexNAc₂Hex₅dHex₁ (1753,6). Při analýze purifikovaného HLGP i hemolymfy byly ve vzorcích identifikovány také série hexóz a některé *O*-glykany (tyto ale nejsou více popsány, jelikož nebyly předmětem zájmu těchto analýz).

Tabulka 9: hodnoty složení jednotlivých glykanů a jejich *m/z*. X označuje výskyt v HLGP nebo v hemolymfě.

HexNAc	Hex	dHex	NeuAc		HLGP	hemolymfa
2	2	1	0	1141,5731		x
2	3	0	0	1171,5837		x
2	3	1	0	1345,6729		x
2	4	0	0	1375,6835		x
3	3	0	0	1416,71		x
2	4	1	0	1549,7727		x
2	5	0	0	1579,7833		x
3	3	1	0	1590,7992		x
4	3	0	0	1661,8363		x
2	3	1	1	1706,8466		x
2	5	1	0	1753,8725		x
2	6	0	0	1783,8831		x
3	4	1	0	1794,899		x
4	3	1	0	1835,9255		x
4	4	0	0	1865,9361		x
5	3	0	0	1906,9626		x
2	7	0	0	1987,9829		x
3	5	1	0	1998,9988		x
5	3	1	0	2081,0518		x
2	8	0	0	2192,0827		x
5	4	1	0	2285,1516		x
6	3	1	0	2326,1781		x
2	9	0	0	2396,1825	x	x
3	7	1	0	2407,1984		x
4	7	0	0	2478,2355	x	x
5	5	1	0	2489,2514		x
5	6	0	0	2519,262		x
2	10	0	0	2600,2823	x	x
4	8	0	0	2682,3353	x	x
5	6	1	0	2693,3512		x
5	7	0	0	2723,3618		x
5	7	1	0	2897,451		x
5	8	0	0	2927,4616		x
5	9	0	0	3131,5614		x

5.5 Schopnost vázat sacharidy

Schopnost purifikovaného HLGP vázat sacharidy byla potvrzena měřením hemaglutinační aktivity (Obr. 14) a dále analýzou pomocí rezonance povrchového plasmonu (Obr. 15, 16).

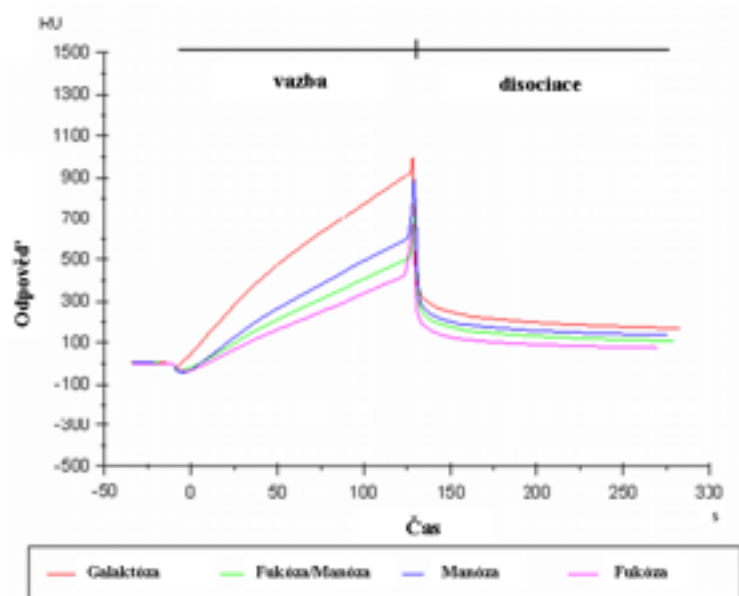


Obrázek 14: Detekce hemaglutinační aktivity purifikovaného HLGP. A – negativní kontrola, B – pravidelné dvojkové ředění elektroelucovaného HLGP. Hemaglutinační aktivita je patrná do ředění 16x.

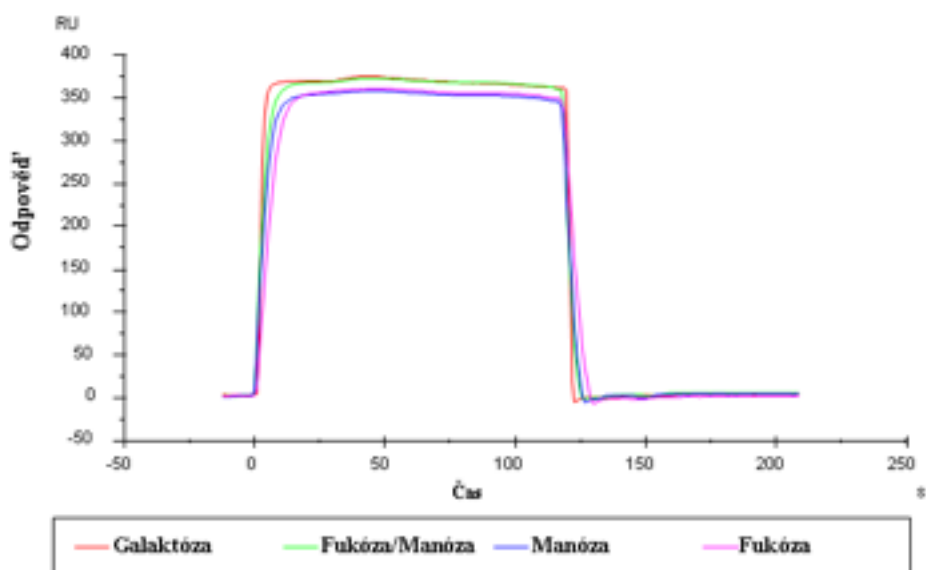
Stejně jako v případě plasmy *D. marginatus* (Dupejová, 2008) byla hemaglutinace HLGP purifikovaného elektroelucí detekována s pozitivním výsledkem s použitím 2% suspenze myších erytrocytů. Pozitivní reakce je patrná až do ředění výchozí koncentrace 16x.

Z důvodu malého množství izolovaného HLGP nebylo možné provést inhibici HA a zjistit tak, jaké sacharidy tento protein specificky váže. Pro zjištění této specifity bylo proto využito měření interakce HLGP s různými monosacharidy (galaktóza, fukóza, manóza) pomocí rezonance povrchového plazmonu, kde je vyžadováno výrazně méně vzorku než při inhibici HA.

Měření ukázalo, že purifikovaný HLGP specificky váže galaktózu; ze srovnání signálů z kontrolního kanálu (fukóza/manóza) je dále vidět, že slabá vazba byla také zaznamenána u manózy (Obr. 15). V případě následné injekce vzorku s přídavkem EDTA na čip byla pozorována stejná odezva na všech kanálech a žádná vazebná křivka (Obr. 16). Míra odezvy také poukazovala jenom na nescifickou adsorpci na povrchu čipu (porovnej odezvu – Obr. 15 a 16). Vazba purifikovaného HLGP na monosacharidy byla tedy inhibována pomocí EDTA, což značí interakci protein-sacharid závislou na vápenatých iontech, popř. jiných dvoumocných kationtech.



Obrázek 15: SPR analýza vazby purifikovaného HLGP k různým monosacharidům. Kanál 1 – α -D-galaktóza. Kanál 2 – α -D-manóza/ α -L-fukóza, kanál 3 – α -D-manóza , kanál 4 – α -L-fukóza.



Obrázek 16: SPR analýza vazby purifikovaného HLGP k různým monosacharidům při inhibici pomocí EDTA. Kanál 1 – α -D-galaktóza. Kanál 2 – α -D-manóza/ α -L-fukóza, kanál 3 – α -D-manóza , kanál 4 – α -L-fukóza.

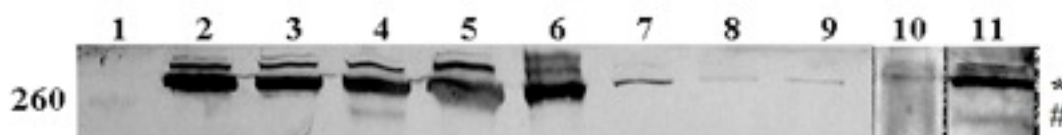
Měření bylo prováděno v reálném čase; jako kontrola byl použit kanál 2 s navázanou fukózou a manózou obsahující poloviční množství odpovídajících sacharidů.

Tomu také odpovídá odezva na kontrolním kanálu, která je přibližně průměrem odezev na kanálech 3 a 4 (Obr. 15).

5.6 Detekce HLGP v tkáních

Přítomnost HLGP v různých tkáních *D. marginatus* byla již dříve zkoumána imunofluorescencí (Dupejová, 2008) a v této práci byla doplněna imunoblotem (Obr. 17).

Kromě plasmy nasátých a nenasátých samic a samců byla sledována přítomnost neredukovaného HLGP v hemocytech nasátých a nenasátých samic a samců a ve slinných žlázách a střevě nasátých samic.



Obrázek 17: detekce HLGP v různých tkáních *D. marginatus* anti-HLGP protilátkami. 1 – marker, 2 – plasma nasátých samic, 3 – plasma nenasátých samic, 4 – plasma nasátých samců, 5 – plasma nenasátých samců, 6 - hemocyty nasátých samic, 7 - hemocyty nenasátých samic, 8 – hemocyty nasátých samců, 9 – hemocyty nenasátých samců, 10 – střevo nasátých samic, 11 – slinné žlázy nasátých samic. Na gel bylo nanášeno cca 5 µg proteinů na jamku. Hvězdička označuje glykosylovaný HLGP, křížek označuje deglykosylovaný HLGP.

Ve všech orgánech nasátých i nenasátých samců i samic detekovaly anti-HLGP protilátky stejný protein se stejnou molekulovou velikostí v neredukujících podmínkách. Z výsledku je zřejmé, že se HLGP vyskytuje v podobném množství v plasmě samců i samic; navíc není překvapivě rozdíl ani mezi množstvím proteinu v plasmě nasátých a nenasátých samic ani samců.

Naopak výrazný rozdíl byl shledán mezi hemocyty nasátých (Obr. 17, jamka 6) a nenasátých (Obr. 17, jamka 7) klíšťat *D. marginatus*. V hemocytech nasátých samic bylo detekováno přibližně stejné množství HLGP jako v plasmě samců i samic, zatímco v hemocytech nenasátých samic je HLGP přítomen v nižším množství. U samců nemělo sání na expresi HLGP v hemocytech žádný vliv, protože jeho množství zůstalo v obou

případech přibližně stejné (Obr. 17, jamky 8,9). Množství HLGP v hemocytech bylo u nasátých i nenasátých samců nižší než tomu bylo v případě nenasátých samic.

Zajímavým zjištěním dále bylo, že ve slinných žlázách anti-HLGP protilátky detekovaly dva proteiny s velikostmi odpovídajícími deglykosylovanému a nedeglykosylovanému proteinu (Obr. 17, jamka 11).

6. DISKUZE

Tato práce byla zaměřená na izolaci a charakterizaci proteinu o velikosti 290 kDa, potenciálního lektinu, který byl rozeznáván protilátkami proti HA hemolymfy klíšťat *Dermacentor marginatus* a *Ixodes ricinus* a protilátkami proti FReD proteinu Dorinu M z klíštěte *Ornithodoros moubata*.

Tento protein byl pomocí hmotnostní spektrometrie identifikován jako hemlipoglykoprotein (HLGP) blízce příbuzný transportnímu proteinu DvCP z *D. variabilis*. Velikost tohoto proteinu i velikost jeho podjednotek (86 a 90 kDa) je podobná, jako velikosti ostatních popsaných CP, které se pohybují v rozmezí 200 kDa až 365 kDa (Guddera *et al.*, 2001; Maya-Monteiro *et al.*, 2000). CP proteiny se skládají stejně jako HLGP ze dvou podjednotek 92 kDa a 98 kDa, resp. 92 kDa a 103 kDa.

Bylo prokázáno, že CP proteiny obsahují *N*-terminální lipoproteinovou doménu, von Willebrandovu doménu typu D a doménu s neznámou funkcí (Donohue *et al.*, 2008). Ani u jednoho proteinu (včetně DvCP) však nebyly nalezeny domény, které by odpovídaly sacharid vázajícím doménám známých lektinů popř. fibrinogenu podobné doméně. CP proteiny také nejsou fylogeneticky příbuzné s FReD proteiny (Šterba *et al.*, 2009).

Schopnost vázat sacharidy, lipidy a kovy by mohla mít *N*-terminální lipoproteinová doména těchto proteinů (Donohue *et al.*, 2008). Transportní proteiny jsou sekvenčně vysoce podobné vitelogeninům, u kterých byla schopnost HA prokázána např. u vitelogeninu z hemolymfy *Leptinotarsa decemlineata* (Stynen a de Loof, 1982) nebo u vitelogeninu ryby rodu *Branchiostoma* (obsahujícího lipoproteinovou doménu podobnou DvCP), který také vykazoval hemaglutinační aktivitu a schopnost vázat sacharidy (Zhang *et al.*, 2005).

Anti-HA protilátky *D. marginatus* detekovaly v plasmě kromě HLGP ještě další tři proteiny (Dupejová, 2008) a nativní elektroforéza v kombinaci s SDS-PAGE ve druhém směru odhalila, že se HLGP za nativních podmínek nachází v komplexu s těmito třemi proteiny a s dalšími dosud neznámými proteiny. Toto zjištění by mohlo znamenat, že při přípravě anti-HA protilátek mohl být HLGP kopurifikován spolu s proteiny s lektinovou aktivitou, a proto byly vytvořeny protilátky i proti tomuto proteinu. Nicméně toto nevysvětluje reakci anti-Dorin M protilátek s HLGP (tyto jsou namířeny jen proti tomuto klíštěcímu lektinu). Dosud není známá terciární struktura žádného CP, FReD proteinu ani

Dorinu M a vzhledem k tomu, že sekvenční analýza nepotvrdila příbuznost HLGP a FReD proteinů, by se mohlo jednat o podobnost v terciární struktuře (popř. podobnost epitopů) mezi HLGP a fibrinogenu podobnou doménou Dorinu M.

HLGP purifikovaný jak v nativní tak v denaturované formě byl schopen vázat sacharidy (Obr. 14, 15, 16) stejně jako plasma klíštěte *D. marginatus* (Dupejová, 2008) a plasma dalších druhů klíšťat (Kovář *et al.*, 2000; Kibuka-Sebitosi, 2006; Štěrbá *et al.*, 2009). Schopnost vázat sacharidy se zdá být závislá na vápenatých iontech (Obr. 16), což se shoduje s výsledky pozorovanými při detekci hemaglutinace proteinu příbuzného vitelogeninu z raka (Hall *et al.*, 1999) a vitelogeninu z ježovky (Cervello *et al.*, 1996). Schopnost vázat sacharidy spolu s přítomností HLGP v komplexu s potenciálními lektiny a pravděpodobnou strukturní podobností s FReD proteiny podporuje domněnku, že má tento protein ještě jiné vlastnosti než transport a skladování hemu.

Reaktivita HLGP s lektiny DSA, GNA a MAA značí přítomnost *N*-glykanů s terminální manózou, terminální galaktózou (vazba $\alpha(1-4)$) a s kyselinou sialovou (vazba $\alpha(2-6)$); negativní reakce s lektinem MAA II a PNA naznačuje absenci $\alpha(2-3)$ -vázané kyseliny sialové a $\alpha(1-3)$ -vázané galaktózy. Doplnující výsledky o složení *N*-glykanů HLGP přinesla analýza hmotnostní spektrometrií. Byly nalezeny čtyři různé glykanové struktury. Dvě byly vysoce manosylovaného typu obsahující dva *N*-acetylhexosaminy a devět resp. deset molekul hexóz (pravděpodobně manóz), další dvě struktury byly komplexní glykany se čtyřmi *N*-acetylhexosaminy a sedmi a osmi hexózami pravděpodobně s terminálními galaktózami. Ani jedna z těchto struktur nebyla modifikována fukózou vázanou na chitobiosové jádro.

Podobné výsledky byly objeveny i u jiných klíštěcích glykoproteinů. Vysoce manosylované a komplexní glykany byly popsány ve slinách a v extraktech slinných žláz (Štěrbá *et al.*, v přípravě) a přítomnost sialovaných glykanů byla prokázána na ultratenkých řezech klíštěte *I. ricinus* (Vancová *et al.*, 2006, Vancová, nepublikováno). Plasmový lektin Dorin M obsahuje kromě fukosylovaných struktur rovněž vysoce manosylované glykany (Kovář *et al.*, 2000; Man *et al.*, 2008). Zajímavá je skutečnost absence core-fukosylace u HLGP vzhledem k tomu, že tento typ glykanů se vyskytoval v hemolymfě (Obr. 12B) a také je převládajícím typem glykanu ve slinách a slinných žlázách klíšťat (Štěrbá *et al.*, v přípravě). Přítomnost core-fukosylovaných struktur u purifikovaného HLGP nebyla prokázána, přestože byty tyto glykany přítomny v plasmě

(Obr 12B) a patří mezi nejčastěji zastoupené glykany klíštěcích slin a slinných žláz (Štěrbá *et al.*, v přípravě), a potvrzeny byly i u lektinu Dorinu M (Man *et al.*, 2008).

Dále bylo pomocí deglykosylace PNGázou A/F a Endo H zjištěno, že HLGP je modifikován *N*-glykany. Anti-HLGP protilátky detekovaly v případě opracování oběma typy enzymů dva proteiny o velikosti 250 kDa a 290 kDa (Obr. 11). Protože endoglykosidázy pracují za nativních podmínek s nižší účinností, jedná se v případě většího proteinu pravděpodobně o glykosylovanou formu (Obr. 11, hvězdička) a menší protein představuje deglykosylovanou formu (Obr. 11, křížek). Velikost glykanů byla tedy určena na cca 40 kDa.

Ve spektrech HLGP i plasmy byly pozorovány dále serie hexóz a *O*-glykany (neoznačeny v obrázcích). Zatímco serie glykanů tvořených hexosami může být způsobena kontaminací z pudru (na rukavicích), další struktury odpovídající *O*-glykanům byly pravděpodobně přítomné již ve výchozích vzorcích ve vysokých koncentracích a tudíž se ko-purifikovaly společně s *N*-glykany. Nicméně podobné kontaminanty byly nalezeny i v klíštěcích slinných žlázách, střevě a ováriích (Štěrbá *et al.*, v přípravě).

HLGP coby protein sloužící k vazbě a uskladnění hemu byl v předchozích analýzách nalezen především v hemolymfě a v dalších orgánech. V této práci byla potvrzena přítomnost HLGP v plasmě/hemolymfě a to jak u nasátých tak nenasátých samic a samců *D. marginatus*, ale také v jejich hemocytech, ve slinných žlázách a ve střevě. Vzhledem k analýze stejného množství proteinů bylo možné porovnat množství HLGP v jednotlivých vzorcích (Obr. 17). Zatímco v plasmě se množství HLGP u samců a samic nelišilo u nasátých ani u nenasátých klíšťat, u hemocytů byly pozorovány rozdíly. V hemocytech nasátých samic bylo pozorováno porovnatelné množství HLGP jako v plasmě, nicméně v hemocytech nenasátých samic bylo přítomno výrazně nižší množství HLGP. U hemocytů nasátých i nenasátých samců pak byl HLGP přítomen ještě v nižším množství.

Kontinuální přítomnost HLGP v plasmě/hemolymfě lze u nenasátých klíšťat jednoduše vysvětlit vazbou hemu a jeho uskladněním pro své potřeby, u nasátých pak potřebou vázat a uskladnit nově přijatý hem. Podobně i HLGP v hemocytech nasátých samic by mohl sloužit tomuto cíli jako doplňkové místo uskladnění velkého množství uvolněného hemu. Tomu by i odpovídala nízká exprese HLGP v hemocytech nenasátých samic.

Samci rodu *Dermacentor* sají obecně méně často a menší množství krve než samice (Fielden *et al.*, 1999), musí tedy zpracovat méně volného (a toxického) hemu – tomu ale neodpovídá srovnatelné množství HLGP v hemolymfě u samců a samic, které bylo pozorováno. Překvapivá je proto také přítomnost hem vázajícího proteinu v hemocytech samců a to jak nasátých tak nenasátých a také rozdílná regulace jeho exprese (jelikož u samic sání krve spouští tvorbu HLGP v hemocytech, u samců nikoliv). Proto se zdá, že HLGP přítomný v plasmě i v hemocytech má buď další dosud neznámou úlohu, nebo se exprimuje i v hemocytech a následně je transportován do hemolymfy, kde váže a skladuje hem. Dalším překvapivým zjištěním bylo potvrzení HLGP ve slinných žlázách a to dokonce ve dvou formách, z kterých jedna odpovídá svou velikostí deglykosylovanému proteinu. Transportní proteiny byly prokázány ve slinných žlázách i u jiných klíšťat (Gudderra *et al.*, 2001, 2002a), a u *D. variabilis* byl tento protein ve slinných žlázách nalezen bez navázaného hemu (Gudderra *et al.* 2002a), dosud ale nebyly popsány dvě formy těchto proteinů.

Přítomnost hem vázajících proteinů v slinných žlázách, kde nedochází k uvolňování hemu z trávené krve, přítomnost těchto proteinů bez vázaného hemu a přítomnost dvou různých forem HLGP u *D. marginatus* proto dále naznačují možnost existence dalších funkcí hemlipoglykoproteinu a dalších transportních proteinů u klíšťat.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla izolace a biochemická charakterizace hemlipoglykoprotein (HLGP) z klíštěte *Dermacentor marginatus*. Protein o molekulové velikosti 290 kDa byl spolu s dalšími třemi proteiny identifikován jako potenciální FReD protein (Dupejová, 2008). V této práci byl protein 290 kDa identifikován analýzou MS jako protein blízké příbuzný transportnímu proteinu (DvCP) z klíštěte *Dermacentor variabilis* a pojmenován hemlipoglykoprotein (HLGP). Proti HLGP byly připraveny monospecifické polyklonální protilátky, pomocí kterých byl HLGP purifikován a dále detekován při jeho další biochemické charakterizaci (např. po deglykosylaci) a pomocí kterých byla určena jeho tkáňová lokalizace.

HLGP byl úspěšně purifikován v nativním (imunoprecipitace) i v denaturovaném (elektroeluce) stavu. Velikost neredukovaného proteinu je 290 kDa, v redukovaném stavu se skládá ze dvou podjednotek velkých 100 a 95 kDa. V nativním stavu je HLGP součástí komplexu o velikosti 450 kDa spolu s dalšími proteiny. Jedná se o glykosylovaný protein s vysoce manosylovanými a komplexními glykany o velikost přibližně 40 kDa obsahujícími terminální galaktózu a manózu a dále kyselinu sialovou. *N*-glykany HLGP ale neobsahují fukózu vázanou na v jádrové části glykanu. Při MS analýze glykanů HLGP bylo nalezeny glykany obsahující HexNAc₂Hex₉, HexNAc₂Hex₁₀, HexNAc₄Hex₇, a HexNAc₄Hex₈; v plasmě *D. marginatus* byly detekovány navíc ještě vysoce manosylované glykany HexNAc₂Hex₃ až HexNAc₂Hex₁₀ a komplexní fukosylované a nefukosylované glykany HexNAc₃Hex₃, HexNAc₂Hex₄Hex₁, HexNAc₂Hex₅dHex₁. HLGP je rovněž schopen vázat sacharidy a to jak v nativním, tak v denaturovaném stavu a dále se zdá, že je tato vazba závislá na iontech Ca²⁺. Hemlipoglykoprotein se nachází v plasmě a v hemocytech nasátých i nenasátých samic a samců a dále ve střeve a slinných žlázách. Ve slinných žlázách byly nalezeny dvě formy tohoto proteinu velikostně odpovídající glykosylovanému a neglykosylovanému HLGP.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS – amonium persulfát
BN-PAGE – Blue Native Polyacrylamide Electrophoresis, nativní elektroforéza
CBB – Coomassie Brilliant Blue
CP – carrier protein, transporní protein
dHex – deoxyhexóza
DSA - *Datura sativa* agglutinin, lektin z *Datura sativa*
DTT – dithiotreitol
FReP - fibrinogen-related protein, fibrinogenu podobný proteiny
GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin
GlcNAc – N-acetyl-D-glukosaminu
GNA - *Galanthus nivalis* agglutinin, lektin z *Galanthus nivalis*
HA – hemaglutinační aktivita
Hex – hexóza
HexNAc – N-acetyl-D-hexosamin
HLGP – hemlipoglykoprotein
IrAM-An - α -2-makroglobulinu z klíštěte *I. ricinus*
MAA - *Maackia amurensis* agglutinin, lektin z *Maackia amurensis*
MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization
MALDI TOF/TOF - Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-o-Flight/Time-of-Flight
MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
PNA – peanut agglutinin
PRR – pattern recognition receptors, receptory rozpoznávající motivy
SDS – sodium dodecylsulfát
SDS-PAGE – polyakrylamidová elektroforéza
SNA – *Sambucus nigra* agglutinin, lektin ze *Sambucus nigra*
SPR – Surface Plasmon Resonance, Rezonance povrchového plazmonu
TAM - tick α -macroglobulin, klíštěcí α -makroglobulin
Vg – vitellogenin
Vn – vitelin

9. CITACE

ALLEY, W.R. JR., MADERA, M., MECHREF, Y., NOVOTNY, M.V. (2010) Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated *N*-linked glycans: A potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Anal Chem* 82:5095-5106.

ALTMANN, F., FABINI, G., AHORN, H., WILSON, I.B. (2001) Genetic model organisms in the study of *N*-glycans. *Biochimie* 83:703-12.

AOKI, K., PERLMAN, M., LIM, J., CANTU, R., WELLS, L., TIEMEYER, M. (2007) Dynamic developmental elaboration of *N*-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J Biol Chem* 282:9127–9142.

BAKER, A. S. (1999) *Mites and Ticks of Domestic Animals: An Identification Guide and Information Source*. The Natural History Museum, London, UK.

BÁZLIKOVÁ, M., KAZÁR, J., SCHRAMEK, S. (1984) Phagocytosis of *Coxiella burnetii* by *Hyalomma dromedarii* tick haemocytes. *Acta Virol* 28:48-52.

BEATI, L., RAOULT, R. (1993) *Rickettsia massiliae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia. *Int J Syst Bacteriol* 43:839-40.

BENACH, J.L., HABICHT, G.S., GOCINSKI, B.L., COLEMAN, J.L. (1984) Phagocytic cell responses to in vivo and in vitro exposure to the Lyme disease spirochete. *Yale J Biol Med* 57:599-605.

BOROVÍČKOVÁ, B., HYPŠA, V. (2005) Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol* 35:317-33.

BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (2008) *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge University Press, pp:506.

BRAZ, G.R.C., COELHO, H.S.L., MASUDA, H., OLIVEIRA, P.L. (1999) A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr Biol* 9:703-706.

BROSSARD, M., WIKEL, S.K. (1997) Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol* 11:270-6.

BROSSARD, M., WIKEL, S.K. (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129:161-76.

BUREŠOVÁ, V., HAJDUŠEK, O., FRANTA, Z., SOJKA, Z., KOPÁČEK, P. (2009) IrAM-An alpha2 macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev Comp Immunol* 33:489-98.

CERAUL, SM, SONENSHINE, DE, HYNES, WL. (2002) Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J Med Entomol* 39:376-83.

CERAUL, SM, SONENSHINE, DE, RATZLAFF, R.E., HYNES, WL. (2003) An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 33, 1099-103.

CERONI, A., MAASS, K., GEYER, H., GEYER, R., DELL, A., HASLAM, S.M. (2008) GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Prot Res* 7:1650—1659.

CIPOLLO, J.F., AWAD, A.M., COSTELLO, C.E., HIRSCHBERG, C.B. (2005) *N*-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol Chem* 280:26063-72.

COONS, L.B., ROSELL-DAVIS, R., TARNOWSKI, B.I. (1986) Blood meal ingestion in ticks. In: Saue, J.R., Hair, A.J., (Editors) *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester, Ellis Horwood, pp. 248–279.

DONOHUE, K.V., KHALIL, S.M., MITCHELL, R.D., SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. (2008) Molecular characterization of the major hemelipoglycoprotein in ixodid ticks. *Insect Mol Biol* 17:197-208.

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

FIELDEN, L.J., JONES, R.M., GOLDBERG, M., RECHAV, Y. (1999) Feeding and respiratory gas exchange in the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *J Insect Physiol* 45:297-304.

FOGAÇA, A.C., DA SILVA, P.I., JR, MIRANDA, M.T., BIANCHI, A.G., MIRANDA, A., RIBOLLA, P.E., DAFFRE, S. (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274:25330-4.

FOGAÇA, A.C., LORENZINI, D.M., KAKU, L.M., ESTEVES, E., BULET, P., DAFFRE, S. (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol* 28:191-200.

FUJITA, T., MATSUSHITA, M., ENDO, Y. (2004) The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*, 198:185-202.

GAGNEUX, P., VARKI, A. (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9:747-55.

GRUBHOFFER, L., DUSBÁBEK, F. (1991) Lectin binding analysis of *Argas polonicus* tissue glycoproteins. *Vet Parasitol* 38:235-247.

GRUBHOFFER, L., MAŤHA, V. (1991) New lectins in invertebrates. *Zool Sci* 8:1001-1003.

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

GRUNCLOVÁ, L., FOUQUIER, H., HYPŠA, V., KOPÁČEK, P. (2003) Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol.* 27:651-60.

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

GUDDERRA, N.P., SONENSHINE, D.E., APPERSON, C.S., ROE, R.M. (2002a) Tissue distribution and characterization of predominant hemolymph carrier proteins from *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros parkeri*. *J Insect Physiol* 48:161-170.

GUDDERRA, N.P., SONENSHINE, D.E., APPERSON, C.S., ROE, R.M. (2002b) Hemolymph proteins in ticks. *J Insect Physiol* 48:269-278.

HANNEMAN, A.J., ROSA, J.C., ASHLIN, D., REINHOLD, V.N. (2006) Isomer and glycomer complexities of core GlcNAcs in *Caenorhabditis elegans*. *Glycobiology* 16:874-90.

HILLYARD, P.D. (1996) Ticks of North-West Europe. Eds R. S. K. Barnes and J. H. Crothers. Field Studies Council, Shrewsbury, Shropshire, UK. pp. 1-178.

HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C.A.J.R., EZEKOWITZ, R.A.B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.

HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J. (1999) West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5:643-50.

HUBÁLEK, Z., JURICOVÁ, Z., HALOUZKA, J. (1990) *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.* 37:255-60.

HUBÁLEK, Z., MITTERMAYER, T., HALOUZKA, J., ČERNÝ, V. (1988) Isolation of "exotic" Bhanja virus (Bunyaviridae) from ticks in the temperate zone. *Arch Virol* 101:191-7.

- HUANG, X., TSUJI, N., MYIOSHI T., NAKANUTA-TSURUTA, S., HIABAYASHI J., FUJISAKI K.** (2007) Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Glycobiology* 17:313-23.
- CHINZEI, Y., CHINO, H., TAKAHASHI, K.** (1983) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. *J Comp Physiol B* 152, 13–21.
- CHRUDIMSKÁ, T., CHRUDIMSKÝ, T., GOLOVCHENKO, M., RUDENKO, N., GRUBHOFFER, L.** (2010) New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Vet Parasitol* 167:298-303.
- INOUE, N., HANADA, K., TSUJI, N., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., MIKAMI, T., FUJISAKI, K.** (2001) Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 38:514-9.
- JAMES, A.M., OLIVER, J.H.** (1996) Vitellogenin concentrations in the hemolymph and ovaries of *Ixodes scapularis* ticks during vitellogenesis. *Exp Appl Acarol* 20:639–647.
- JAMES, A.M., OLIVER, J.H.** (1997) Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem Mol Biol* 27:639–649.
- JAMES, A.M., OLIVER, J.H.** (1999a) Localization of vitellogenin production in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Invertebr Reprod Dev* 35:81–87.
- JAMES, A.M., OLIVER, J.H.** (1999b) Vitellogenesis and its hormonal regulation in Ixodida: preliminary result. v Needham, G.R., Mitchell, R., Horn, D.J., Welbourn, W.C. (Editoři), *Acarology IX*, vol. 2, Symposia, July 17–22 1994. Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, 471–476.
- JOHNS, R., SONENSHINE, D.E., HYNES, W.L.** (1998) Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol* 35:458–464.
- JOHNS, R., SONENSHINE, D.E., HYNES, W.L.** (2000) Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J Med Entomol* 37:265-70.
- JOHNS, R., SONENSHINE, D.E., HYNES, W.L.** (2001) Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol* 31:857–865.
- JONGEJAN, F., UILENBERG, G.** (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129:3-14.

- KADOTA, K., WALTER, S., CLAVERIA, F.G., IGARASHI, I., TAYLOR, D., FUJISAKI, K.** (2003) Morphological and populational characteristics of hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysial phase. *J Med Entomol* 40:770-6.
- KAMWEDO, S.P., INGRAM, G.A., MUSISI, F.L., TREES, A.J., MOLYNEUX, D.H.** (1993) Characteristics of tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, glands distinguished by surface lectin binding. *Ann Trop Med Parasitol*, 87:525-535.
- KELLY, W.G., HART, G.W.** (1989) Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell* 57:243–251.
- KOPÁČEK, P., VOGT, R., JINDRÁK, L., WEISE, C., ŠAFAŘÍK, I.** (1999) Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 29:989-97.
- KOPÁČEK, P., WEISE, C., SARAVAN, T., VÍTOVÁ, K., GRUBHOFFER, L.** (2000) Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur J Biochem* 267:465-75.
- KOVÁŘ, V., KOPÁČEK, P., GRUBHOFFER, L.** (2000) Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol* 30:195-205.
- KOŽUCH, O., NOSEK, J.** (1971) Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol* 15:334.
- KRYUCHECHNIKOV, V. N.** (1991) Protective responses of Ixodidae hemocytes. v F. Dusbabek V. Bukva (Editoři) *Modern acarology*, SPB Academic Prague, pp 331-334.
- KUHN, K.H., UHLÍŘ, J., GRUBHOFFER, L.** (1996) Ultrastructural localization of a sialic-specific hemolymph lectin in hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae). *Parasitol Res* 82:215-221.
- KUHN, K.H., HAUG, T.** (1994) Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterisation of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Cell Tissue Res* 277:493-504.
- LARA, F.A., LINS, U., PAIVA-SILVA, G., ALMEIDA, I.C., BRAGA, C.M., MIGUENS, F.C., OLIVEIRA, P.L., AND DANSÁ-PETRETSKI, M.** (2003) A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J Exp Biol* 206:1707–1715.
- LAVINE, M.D., STRAND, M.R.** (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1295-309.
- LAEMMLI, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

LOGULLO, C., MORAES, J., DANSAPETRETSKI, M., VAZ JR., I.S., MASUDA, A., SORGINE, M.H.F., BRAZ, G.R., MASUDA, H., OLIVEIRA, P.L. (2002) Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1805-1811.

MAN, P., KOVÁŘ, V., ŠTĚRBA, J., STROHALM, M., KAVAN, D., KOPÁČEK, P., GRUBHOFFER, L., HAVLÍČEK, V. (2008) Deciphering Dorin M glycosylation by mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 14:345-54.

MARKESHIN, S.I.A., SMIRNOVA, S.E., EVSTAFEV, I.L. (1992) An assessment of the status of natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Crimea. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 4:28-31.

MAYA-MONTEIRO, C.M., DAFFRE, S., LOGULLO, C., LARA, F.A., ALVES, E.W., CAPURRO, M.L., ZINGALI, R., ALMEIDA, I.C., OLIVEIRA, P.L. (2000) HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 275:36584-9.

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALVES, L.R., PINHAL, N., ABDALLA, D.S.P., OLIVEIRA, P.L. (2004) HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem Mol Biol* 34:81-87.

MILLER, J. S., STANLEY, D. W. (1998) The nodule formation reaction to bacterial infection: assessing the role of eicosanoids, pp. 265-270. v A. Wiesner, G. B. Dunphy, V. J. Marmaras, I. Morishima, M. Sugumaran, and M. Yamakawa (editoři), *Techniques in insect immunology*. SOS, Fair Haven, NJ. The nodule formation reaction to bacterial infection: assessing the role of eicosanoids.

MIYOSHI, T., TSUJI, N., ISLAM, M.K., HUANG, X., MOTOBU, M., ALIM, M.A., FUJISAKI, K. (2007) Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Insect Physiol* 53:195-203.

MUTH, O.H. (1945) Tick paralysis in beef cattle due to *Dermacentor andersoni*. *North Am Vet* 26:668.

NAKAJIMA, Y., VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A., TAYLOR, D., YAMAKAWA, M. (2001) Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol* 3:747-751.

NAKAJIMA, Y., VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A., TAYLOR, D., YAMAKAWA, M. (2002a) Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol Biol* 11:611-8.

- NAKAJIMA, Y., TAYLOR, D., YAMAKAWA, M.** (2002b) Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. *Exp Appl Acarol* 28:135-40.
- NAKAJIMA, Y., ISHIBASHI, J., YUKUHIRO, F., ASAOKA, A., TAYLOR, D., YAMAKAWA, M.** (2003) Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1624:125-30.
- NORTH, S.J., KOLES, K., HEMBD, C., MORRIS, H.R., DELL, A., PANIN, V.M., HASLAM, S.M.** (2006) Glycomics studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconj J* 23:345–354.
- NUTTALL, P.A., LABUDA, M.** (2004) Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129:177-89.
- PAGEL VAN ZEE, J., GERACI, N.S., GUERRERO, F.D., WIKEL, S.K., STUART, J.J., NENE, V.M., HILL, C.A.** (2007) Tick genomics: the Ixodes genome project and beyond. *Int J Parasitol* 37:1297-1305.
- PASCHINGER K, HACKL M, GUTTERNIGG M, KRETSCHMER-LUBICH D, STEMMER U, JANTSCH V, LOCHNIT G, WILSON IB.** (2006) A deletion in the golgi alpha-mannosidase II gene of *Caenorhabditis elegans* results in unexpected non-wild-type N-glycan structures. *J Biol Chem* 281:28265-77.
- PASCHINGER, K., GUTTERNIGG, M., RENDIĆ, D., WILSON, I.B.** (2008) The N-glycosylation pattern of *Caenorhabditis elegans*. *Carbohydr Res* 343:2041-9.
- PEDRA, J.H., NARASIMHAN, S., RENDIĆ, D., DEPONTE, K., BELL-SAKYI, L., WILSON, I.B., FIKRIG, E.** (2010) Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 12:1222-34.
- PEREIRA, L.S., OLIVEIRA, P.L., BARJA-FIDALGO, C., DAFFRE, S.** (2001) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol* 99:66-72.
- PIETROBELLI, M., CANCRINI, G., MORETTI, A., TAMPIERI, M.P.** (2007) Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? *Parassitologia* 1:33-8.
- PODBORONOV, V.M.** (1990) Comparative characteristics of lysozymes of different origin. *Antibiot Khimioter* 35:22-5.
- REGO, R.O., HAJDUŠEK, O., KOVÁŘ, V., KOPÁČEK, P., GRUBHOFFER, L., HYPŠA V.** (2005) Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol* 35:991-1004.

- REGO R.O., KOVÁŘ V., KOPÁČEK P., WEISE C., MAN P., ŠAUMAN I., GRUBHOFFER L.** (2006) The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem Mol Biol* 36:291-9.
- RIBEIRO, J.M., ALARCON-CHAIDEZ, F., FRANCISCHETTI, I.M., MANS, B.J., MATHER, T.N., VALENZUELA, J.G., WIKEL, S.K.** (2006) An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol* 36:111-29.
- ROSELL, R., COONS, L.B.** (1992) The role of fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. *Int J Parasitol* 22:341–349.
- ŘEHÁČEK, J., KOVÁČOVÁ, E., LISAK, V., RUMIN, W.** (1990) Occurrence of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia slovaca* and organisms resembling bacillary rickettsiae in their natural foci in Slovakia 20 years after their first detection. *Folia Parasitol* 37:285-6.
- SCHÄGGER, H.** (2006) Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols* 1:16–22.
- SCHOELER, G.B., WIKEL, S.K.** (2001) Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol* 95:755-71.
- SIMSER, J.A., MACALUSO, K.R., MULENGA, A., AZAD, A.F.** (2004) Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. *Insect Biochem Mol Biol* 34:1235-46.
- SMETANOVÁ, K., SCHWARZOVÁ, K., KOCIANOVÁ, E.** (2006) Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N.Y. Acad Sci* 1078:312-5.
- SONENSHINE, D.E.** (1991) *Biology of ticks*. Vol. 1. Oxford University Press, New York.
- SONENSHINE, D.E.** (1993) *Biology of ticks*. Vol. 2. Oxford University Press, New York.
- SONENSHINE, D.E., HYNES, W.L., CERAUL, S.M., MITCHELL, R., BENZINE, T.** (2005) Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol* 36:207-23.
- ŠTĚRBA, J., DUPEJOVÁ, J., FIŠER, M., GOLOVCHENKO, M., RUDENKO, N., GRUBHOFFER, L.** (2009) Identification and characterisation of lectins in several tick species, *FEBS Journal*, 276, Suppl 1, pp. 88.
- STONE, B.F., BINNINGTON, K.C., GAUCI, M., AYLWARD, J.H.** (1989) Tick/host interactions for *Ixodes holocyclus*: role, effects, biosynthesis and nature of its toxic and allergenic oral secretions. *Exp Appl Acarol* 7:59-69.

STROHALM, M., HASSMAN, M., KOŠATA, B., KODÍČEK, M. (2008) mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:905-9.

SUGUMARAN, M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res* 15(1):2-9.

SULLIVAN, C.D., ROSELL, R.C., COONS, L.B. (1999) Partial characterization of vitellogenin from the ixodid *Dermacentor variabilis*: preliminary results. In: Needham, G.R., Mitchell, R., Horn, D.J., Welbourn, W.C. (Eds.), *Acarology IX*, vol. 2, Symposia, July 17-22, 1994. Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, pp. 477-480.

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

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

THOMPSON, D.M., KHALIL, S.M.S., JEFFERS, L.A., ANANTHAPADMANABAN, U., SONENSHINE, D.E., MITCHELL, R.D., OSGOOD, C.J., APPERSON, C.S., ROE, R.M. (2005) In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *J Insect Physiol* 51:1105-1116.

THOMPSON, D.M., KHALIL, S.M., JEFFERS, L.A., SONENSHINE, D.E., MITCHELL, R.D., OSGOOD, C.J., MICHAEL, ROE. R. (2007) Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. *Insect Biochem Mol Biol* 37:363-74.

TRETTER, V., ALTMANN, F., KUBELKA, V., MÄRZ, L., BECKER, W.M. (1993) Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 102:259-66.

TSUJI, N., BATTSETSEG, B., BOLDBAATAR, D., MIYOSHI, T., XUAN, X., OLIVER, J.H. JR., FUJISAKI, K. (2007) Babesial vector tick defensin against *Babesia sp.* parasites. *Infect Immun* 75:3633-40.

UHLÍŘ, J., GRUBHOFFER, L., BORSKÝ, I., DUSBÁBEK, F. (1994) Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. *Med Veterinary Entomol* 8:141-150.

VANCOVÁ, M., ZACHAROVÁ, K., GRUBHOFFER, L., NEBESÁŘOVÁ, J. (2006) Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *J Parasitol* 92:431-440.

VARKI, A., CUMMINGS, R., ESKO, J., FREEZE, H., HART, G. (editoři). (1999) Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. pp 653.

WIKEL, S.K. (1996) Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol* 41:1-22.

WIKEL, S.K. (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol.* Jun 29:851-9.

WITTIG, I., BRAUN, H.P., SCHÄGGER, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1:418-28.

ZHIOUA, E., YEH, M.T., LEBURN, R.A. (1997) Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 83:553-4.