

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Petra Sumová

Glykoproteiny ve slinách krevsajících členovců

Salivary glycoproteins of bloodsucking arthropods

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2011

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Petru Volfovi CSc. za cenné připomínky a odbornou pomoc při psaní mé bakalářské práce. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za přijetí, a zejména Mgr. Janu Drahotovi za velkou pomoc nejen při mých prvních pokusech. Velmi děkuji také své rodině, zejména mamince, za podporu při studiu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.5.2011

.....
Petra Sumová

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Úvod	5
3. Glykoproteiny	6
3.1. N-glykoproteiny	6
3.2. O-glykoproteiny	10
3.3. C-glykoproteiny	11
3.4. Fosfoglykoproteiny	11
3.5. S-glykoproteiny	12
4. Slinné žlázy krevsajících členovců	13
4.1. Slinné žlázy	13
4.2. Intersexuální rozdíly	13
4.3. Obsah a stěna slinné žlázy	15
4.4. Mezidruhové rozdíly v proteinovém složení slinných žláz	16
4.5. Protilátková odpověď pobodaných hostitelů	17
5. Glykoproteiny ve slinách krevsajících členovců	20
5.1. Potenciální glykoproteiny ve slinách krevsajících členovců	20
5.2. Strukturní analýza a antigenní vlastnosti slinných glykoproteinů	23
5.3. Exprese rekombinantních glykoproteinů	27
6. Závěr	31
7. Seznam použité literatury	32

1. Abstrakt

Krevsající členovci injikují během sání krve obsah svých slinných žláz do hostitele. Sliny krevsajících členovců obsahují celé spektrum bioaktivních makromolekul, jejichž hlavní funkcí je umožnění sání krve. Proti řadě těchto molekul je ovšem namířena protilátková odpověď hostitelského imunitního systému. Detekce této protilátkové odpovědi může, díky mezidruhovým odlišnostem v proteinovém složení slin, sloužit jako měřítko expozice hostitele jednotlivým druhům krevsajících členovců. Molekulami vyvolávajícími protilátkovou odpověď mohou být proteiny nebo glykoproteiny. Glykoproteiny jsou proteiny, na něž jsou glykosidicky vázány oligosacharidové řetězce. Za antigenní vlastnosti slinných glykoproteinů mohou být zodpovědné obě jejich složky, či pouze cukerná nebo proteinová část. Tuto skutečnost je třeba zohlednit při výběru expresního systému pro syntézu rekombinantních glykoproteinů. Tato práce shrnuje poznatky o struktuře, funkci a vlastnostech slinných glykoproteinů různých druhů krevsajících členovců.

Klíčová slova:

antigeny, glykoproteiny, glykosylace, krevsající členovci, protilátková odpověď, slinné žlázy, sliny

1. Abstract

During obtaining their blood meal, bloodsucking arthropods salivate into their host. Bloodsucking arthropods' saliva contains wide array of bioactive macromolecules. Host organism develops antibody response against many of these molecules. Due to interspecies variability in salivary protein composition, detection of antibody response may serve as a marker of the exposure to individual species of bloodsucking arthropods. Host antibody response is mostly elicited by proteins or glycoproteins. Glycoproteins contain one or more oligosaccharide chains attached to the protein. Glycoprotein's antigenicity could be caused by either both parts, or by only the protein, or the sugar part. This fact has to be taken into consideration for choice of the expression system for recombinant glycoprotein synthesis. This work summarizes current knowledge about structure, function and features of salivary glycoproteins in various species of bloodsucking arthropods.

Key words:

antibody response, antigens, bloodsucking arthropods, glycoproteins, glycosylation, saliva, salivary glands

2. Úvod

Krevsající členovci jsou zodpovědní za přenos řady parazitů způsobujících závažné onemocnění jejich hostitelů. Sedm z 12 nejdůležitějších lidských infekčních onemocnění sledovaných Světovou zdravotnickou organizací (<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases>) je přenášeno krevsajícím hmyzem. Mezi protozoární původce 4 z těchto 7 onemocnění patří *Trypanosoma cruzi* přenášená plošticemi podčeledi Triatominae, různé druhy leishmanií přenášené flebotomy, *Trypanosoma rhodesiense* a *Trypanosoma gambiense* přenášené glosinami a lidská plasmódia, jejichž vektorem jsou komáři rodu *Anopheles*. Komáři přenášejí také virus horečky dengue a filárie rodů *Brugia* a *Wuchereria*. Poslední z těchto 7 onemocnění způsobuje filárie *Onchocerca volvulus* a jejím vektorem jsou muchničky.

Pro snížení rizika šíření patogenů přenášených členovci je nutná kontrola jejich vektorů. K potlačení výskytu parazitických členovců se používá mechanických, chemických, či biologických metod. Mechanickým bojem se rozumí např. likvidace přirozených hostitelů, úpravy vodních toků a krajiny, ale i používání moskytiér. V chemickém boji se používá nejrůznějších insekticidů a repelentů. Biologický boj je založený na využití specifických patogenů, parazitů, či parazitoidů členovců. Další možností je i vypouštění sterilních samců a genetické modifikace parazitických členovců. Ke sledování úspěšnosti vybraných opatření proti vektorům lze využít detekce protilátkové odpovědi hostitele proti komponentům slin jednotlivých druhů krevsajících členovců. K detekci protilátek lze použít buďto homogenátu celých slinných žláz, samotných slin, či vybraných antigenních slinných proteinů nebo glykoproteinů. Jako nejvýhodnější se jeví využití rekombinantních proteinů nebo glykoproteinů. Za antigenní vlastnosti glykoproteinů mohou být zodpovědné obě jeho složky, či pouze proteinová nebo cukerná část. Cukerná složka glykoproteinů syntetizovaná v různých expresních systémech se ovšem může značně odlišovat od nativní. Díky této skutečnosti je žádoucí se při výběru vhodných antigenů zaměřit také na glykosylaci proteinů.

Tato práce shrnuje poznatky o glykoproteinech izolovaných ze slinných žláz různých druhů krevsajících členovců, věnuje se jejich struktuře, předpokládané funkci a antigenním, popř. imunomodulačním vlastnostem. V neposlední řadě také srovnává syntézu rekombinantních glykoproteinů v různých expresních systémech.

3. Glykoproteiny

Sacharidy mohou být v buňce přítomny samostatně, či vázány na proteiny nebo lipidy. Podle velikosti cukerné složky navázané na protein rozlišujeme glykoproteiny a proteoglykany. Cukerná část proteoglykanů se skládá z opakujících se disacharidových podjednotek a je relativně větší než u glykoproteinů. Oligosacharidové řetězce glykoproteinů navíc většinou opakující se struktury neobsahují.

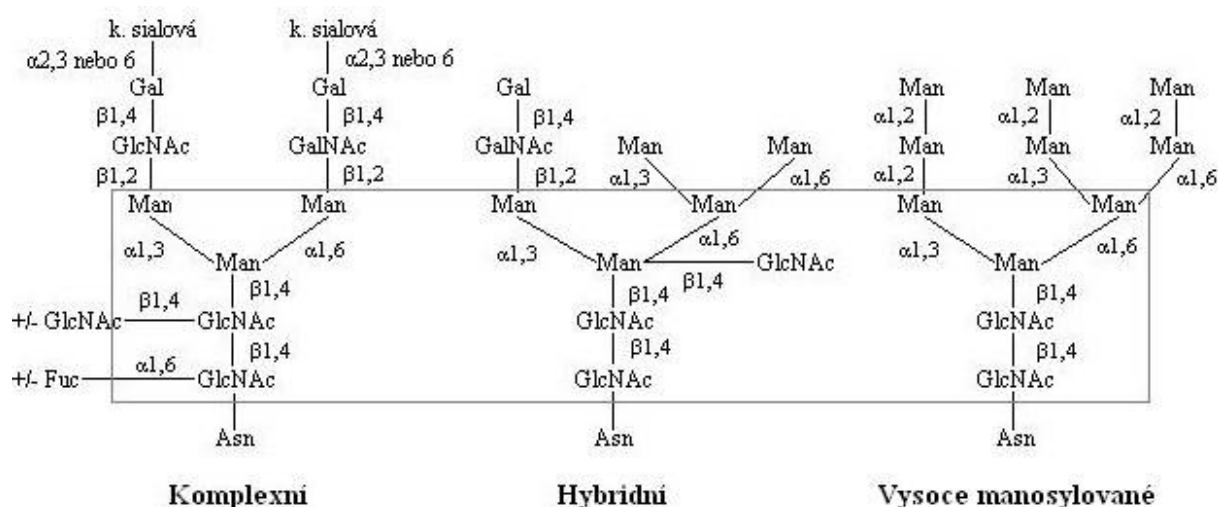
Glykoproteiny jsou tedy proteiny s kovalentně vázanými oligosacharidovými řetězci. K vazbě glykanu na protein dochází při ko- a post-translačních modifikacích proteinu. Rozlišujeme 2 základní typy vazby glykanu na protein. Při N-glykosylaci se váže redukující konec N-acetylglukosaminu (GlcNAc) k amidové skupině asparaginu, zatímco při O-glykosylaci se terminální redukční cukry O-glykanů nejčastěji vážou na hydroxylové skupiny threoninu a serinu, vzácněji i hydroxylysinu či hydroxyprolinu. Prokaryotní O-glykany mohou být navíc vázány i na tyrosin (Brooks, 2004). Kromě těchto 2 nejběžnějších typů glykosylací existuje ještě několik dalších způsobů vazby sacharidů na protein, které jsou popsány níže.

3.1. N-glykoproteiny

Základní strukturou všech N-glykanů je tzv. trimanosylové jádro ($\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$). Podle složení oligosacharidových řetězců navázaných na tuto základní strukturu rozdělujeme N-glykany na vysoce manosylované, komplexní a hybridní (Obr. 1). U komplexního typu N-glykanů se k vnějším manosám (Man) jádra váže N-acetylaktosamin ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$), na který je dále navázána kyselina sialová (NeuNAc) nebo další N-acetylaktosaminy. K N-acetylglukosaminům základní struktury se navíc může vázat fukosa (Fuc), či další N-acetylglukosamin. Vysoce manosylované N-glykany mají k vnějším manosám základní struktury navázáno dalších 2-6 manos. N-glykany hybridního typu vzniknou tak, že se k částečně vytvořenému oligosacharidu vysoce manosylovaného typu navážou další cukerné zbytky. Hybridní typ tedy obsahuje více jak 3 manosy, ale zároveň i N-acetylaktosaminový boční řetězec připojený na $\alpha 1 \rightarrow 3$ vázanou manosu (Kornfeld a Kornfeld, 1985).

Za velkou diverzitu N-glykanů jsou odpovědné zejména ty komplexního typu. Velké množství variant je dáno rozdílným počtem a způsobem vazby N-acetylglukosaminů na α -manosy základní struktury. Podle počtu bočních řetězců navázaných na α -manosy základní struktury rozlišujeme monoantenární, biantenární až pentaantenární N-glykany. Nejčastěji se vyskytují biantenární, triantenární a tetraantenární N-glykany (Kornfeld a Kornfeld, 1985).

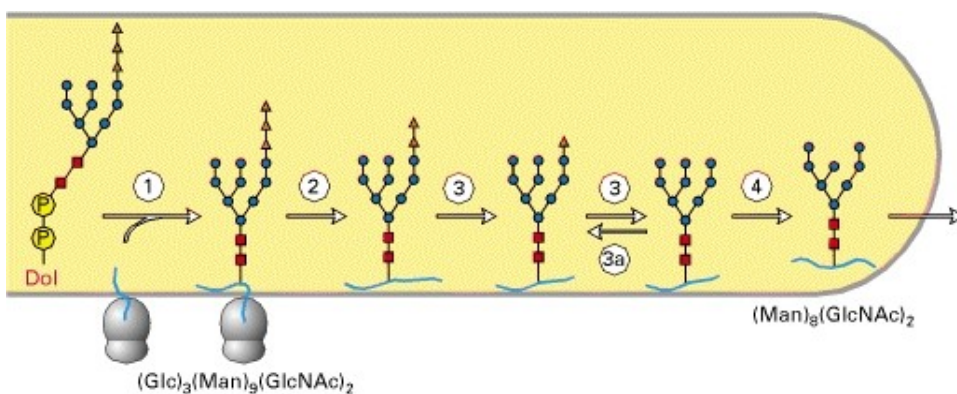
Dalším zdrojem diverzity komplexních N-glykanů je také variabilita v řetězcích vázaných na terminální manosu. Vedlejší řetězce lze klasifikovat do 5 skupin. Obvyklým vedlejším řetězcem je samotný N-acetyllaktosamin. Druhá skupina je tvořena N-acetyllaktosaminem, na jehož galaktosu je vázána kyselina sialová (Obr. 1) nebo fukosa. Kombinace kyseliny sialové a fukosy nebo 2 kyselin sialových charakterizuje třetí skupinu. Čtvrtou skupinu tvoří dlouhé vedlejší řetězce poly-N-acetyllaktosaminů nebo polysialové řetězce vázané na N-acetyllaktosamin. V páté skupině se místo galaktosy vyskytuje N-acetylgalaktosamin (Fukuda, 2000).



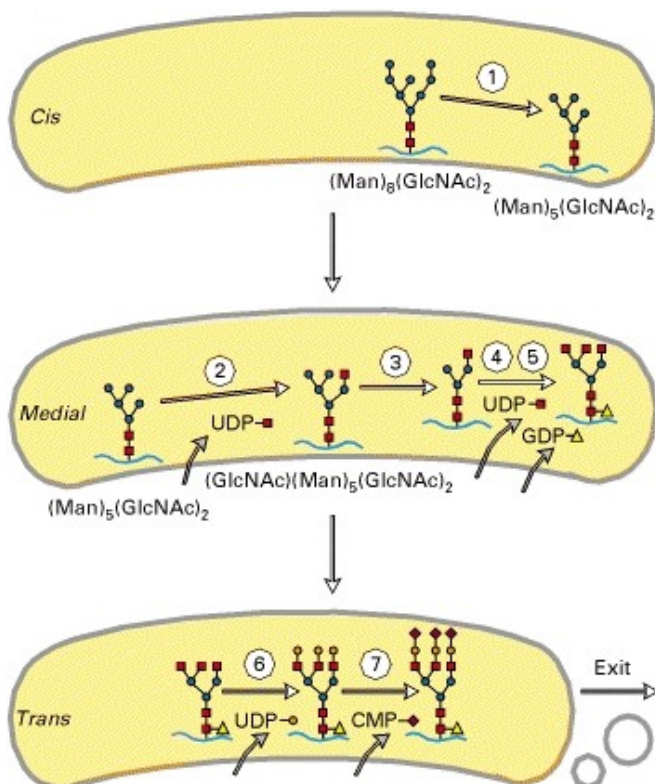
Obr. 1: Struktura hlavních typů N-glykanů. V obdélníku je znázorněno trimanosylové jádro. GlcNAc= N-acetylglukosamin, Man= manosa, Fuc= fukosa, Asn= asparagin, k. sialová= kyselina sialová. Upraveno dle Kornfeld a Kornfeld (1985).

Syntéza N-glykanů začíná tvorbou prekurzorového oligosacharidu skládajícího se ze 3 glukos, 9 manos a 2 N-acetylglukosaminů ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Při jeho formaci hraje roli dolicholpyrofosfát, na který je vznikající oligosacharid navázán. Tento membránově vázaný polyisoprenoid dále ukotvuje oligosacharid k membráně endoplasmatického retikula tak, že je orientován směrem do jeho lumen. Hotový prekurzorový oligosacharid je posléze přenesen z dolicholu na asparaginový zbytek v aminokyselinové sekvenci asparagin-X-serin/threonin, kde X je pravděpodobně jakákoliv aminokyselina kromě prolinu a kyseliny asparagové (Obr. 2: reakce 1). Všechny typy N-glykanů jsou syntetizovány z tohoto vysoce manosylovaného prekurzoru. K přeměně na komplexní typ oligosacharidu je zapotřebí mnoha kroků zahrnujících adice a sestřihy. Zpracování N-glykanů je zahájováno odstraněním 3 glukosových zbytků glukosidázami lokalizovanými v membráně endoplasmatického retikula (Obr. 2: reakce 2-3). Po odstranění jedné $\alpha 1 \rightarrow 2$ vázané manosu (Obr. 2: reakce 4) je glykoprotein přesunut do cis váčků Golgiho komplexu (Obr. 3). Následuje odstranění dalších

3 $\alpha 1 \rightarrow 2$ vázaných manos α -manosidázou I (Obr. 3: reakce 1). V dalším kroku dochází k adici N-acetylglukosaminu prostřednictvím enzymu N-acetylglukosaminyltransferázy I (Obr. 3: reakce 2). Pokud k adici N-acetylglukosaminu nedojde, zůstane N-glykan vysoce manosylovaného typu. V dalším kroku dochází k odštěpení dalších 2 manos prostřednictvím α -manosidázy II (Obr. 3: reakce 3) za následné adice dalšího N-acetylglukosaminu N-acetylglukosaminyltransferázou II. Bez odštěpení manos vzniknou N-glykany hybridního typu. Další úpravy komplexních N-glykanů probíhají v mediálních a trans váčcích Golgiho komplexu řadou navazujících kroků katalyzovaných glykosyltransferázami (Obr. 3: reakce 4-7) (Kornfeld a Kornfeld, 1985; Fukuda, 2000).



Obr. 2: Úpravy N-glykanů v endoplazmatickém retikulu. Reakce 1-4 viz text. Dol= dolichol, N-acetylglukosamin, manosa a glukosa. Upraveno dle Lodish a kol. (2000).



Obr. 3: Úpravy N-glykanů a syntéza N-glykanů komplexního typu v Golgiho komplexu. Reakce 1-7 viz text.

N-acetylglukosamin
 Manosa
 Galaktosa
 Fukosa
 Kyselina sialová

Upraveno dle Lodish a kol. (2000).

Výše popsaným způsobem probíhá syntéza N-glykanů v savčích buňkách.

Počátek syntézy N-glykanů probíhající v endoplazmatickém retikulu (Obr. 2) je shodný pro všechna eukaryota. U kvasinek je vytvořený oligosacharid ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) dále manosylován tak, že výsledný N-glykan může obsahovat až 100 manos (Bobrowicz a kol, 2004; Brooks, 2004; Cregg a kol, 2000). Genetickými manipulacemi byl přesto získán kmen kvasinky *Pichia pastoris* (*Pi. pastoris*) schopný syntetizovat komplexní N-glykany obdobné savčím (Brooks, 2004). Členovci zřejmě mají většinu enzymů pro syntézu glykanů savčího typu, ale využívají je jen v určitých fázích vývoje, jelikož za normálních okolností pro ně nejsou přítomny vhodné substráty (Brooks, 2004). Vysoce manosylované N-glykany se u hmyzu vyskytují poměrně často. Savčí a hmyzí dráha syntézy komplexních N-glykanů je ovšem zřejmě totožná jen po vznik $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Wilson, 2002a). N-acetylglukosamin, účastníci se N-glykosidické vazby, může být v dalších krocích syntézy hmyzích N-glykanů dvakrát fukosylován. Fukosa vázaná $\alpha 1 \rightarrow 6$ glykosidickou vazbou je nalézána i u savčích N-glykanů, zatímco u hmyzu poměrně častá $\alpha 1 \rightarrow 3$ fukosylace se u savců nevyskytuje. Hmyzí buňky mají oproti savčím sníženou expresi N-acetylglukosaminyltransferázy II, takže u nich nedochází ke vzniku rozvětvených komplexních N-glykanů. Zároveň u nich hraje značnou roli N-acetylglukosaminidáza, odštěpující již nasyntetizovaný terminální N-acetylglukosamin. Kyselina sialová i galaktosa jsou zřejmě v hmyzích buňkách přítomny, ale je zde snížena exprese enzymů zodpovědných za přenos těchto monosacharidů na vznikající oligosacharidový řetězec. N-glykany hmyzu jsou často tvořeny pouze trimanosylovým jádrem, které může být navíc ochuzeno o 1-2 manosy (Altmann a kol., 1999; Tomiya a kol., 2004; Wilson, 2002a).

U prokaryot dochází k syntéze N-glykanů na vnější straně cytoplazmatické membrány. Glykany prokaryot jsou tvořeny mnohem širším spektrem monosacharidů, např. N-glykosidické vazby se u prokaryot účastní glukosa, N-acetylgalaktosamin, či rhamnosa (Brooks, 2004). Prokaryotická glykosylace proteinů byla nalezena zejména u patogenních bakterií (např. *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*) a u některých archebakterií (Abu-Qarn a kol., 2008).

Glykoprotein často obsahuje více N-glykanů navázaných na různé části polypeptidového řetězce. Běžně se na jednu z pozic váže vysoce manosylovaný N-glykan, zatímco na druhé pozici je navázaný N-glykan komplexního typu. To je možné díky tomu, že odlišné pozice maturovaného proteinu jsou různě dostupné pro oligosacharidy a příslušné sacharidy zpracovávající enzymy (Trimble a kol., 1983).

3.2. O-glykoproteiny

U této skupiny glykoproteinů se redukující terminální sacharid váže na hydroxylovou skupinu aminokyselin polypeptidu. O-glykany se dělí do několika podskupin podle konkrétního cukerného a aminokyselinového zbytku účastnícího se O-glykosidické vazby. První podskupinu tvoří O-glykany mucinového typu, u kterých se O-glykosidické vazby účastní N-acetylgalaktosamin, vázající se na serin nebo threonin. Název této podskupiny je odvozen od mukózní látky nazývané mucin, ve které byly prvně nalezeny. O-glykosidické vazby se může účastnit i N-acetylglukosamin vázaný také na serin nebo threonin. Tato modifikace byla nalezena např. u chromozomálních proteinů octomilky (Kelly a Hart, 1989). Třetí typ se uplatňuje u proteoglykanů, u kterých se na serin nebo threonin váže xylosa (Lidholt a kol., 1988 a Wilson, 2002b). Tyto 3 skupiny jsou v živočišných buňkách relativně hojné, méně časté jsou následující typy. V kolagenu a proteinech obsahujících kolagenu podobnou doménu, jako např. u podjednotky C1q prvního proteinu klasické cesty aktivace komplementu, se nachází galaktosa vázaná k hydroxylysinu (Reid, 1979). V EGF (epidermální růstový faktor) podobné doméně několika srážecích faktorů je xylosylglukosa nebo glukosa vázaná k serinu nebo threoninu (Nishimura a kol., 1989). Další skupinu tvoří fukosa, prvně nalezená vázaná na konkrétní threonin EGF podobné domény tkáňového aktivátoru plasminogenu (Harris a kol., 1991). V rostlinách se vyskytuje arabinosa vázaná na hydroxyprolin a galaktosa vázaná na serin (Allen a kol., 1978), u hub manosa vázaná na serin nebo threonin (Trueheart a Fink, 1989). O-vázaná manosa se vyskytuje v menší míře i u prokaryot, kde pravděpodobně zvyšuje virulenci patogenních bakterií, dále v savčím mozku, svalovém dystroglykanu a zřejmě i v dalších tkáních zvířat (Lommel a Strahl, 2009).

K syntéze O-glykanů dochází během průchodu glykoproteinů Golgiho komplexem. Monosacharidy jsou postupně přidávány k O-glykosylačním místům proteinu, či k rostoucímu cukernému řetězci. Za tuto reakci jsou odpovědné jednotlivé glykosyltransferázy, které se vyskytují v různých částech Golgiho komplexu a vykazují v nich zároveň odlišnou aktivitu (Piller a Piller, 1993).

V živočišných buňkách se nejčastěji vyskytují O-glykany mucinového typu. Glykoproteiny tohoto typu se vyskytují v širokém spektru tkání, přičemž běžně jsou nalézány v hlenu pokrývajícím povrch epitelálních buněk dýchacího a gastrointestinálního systému. Jsou produkovány nejspíše různými typy buněk sliznice, čímž může být částečně dána jejich velká rozmanitost. Ta je umožněna jak heterogenitou základního proteinu, tak i různorodostí oligosacharidové části. Hlavní rolí těchto glykoproteinů je udržování hladké polopropustné povrchové vrstvy na epitelech a tím jejich ochrana před působením trávicích enzymů a před

napadením patogeny. Díky tomu, že O-glykany se mohou vázat na vhodné proteiny ve shlucích a být tak koncentrovány ve vysoké hustotě, je zajištěn vysoce hydratovaný povrch epitelu, který vytváří bariéru mezi tělesnými tekutinami a tkáněmi. Komplexita těchto glykanů také zajišťuje jejich větší odolnost proti různým typům trávicích enzymů. O-glykany mucinového typu mohou též fungovat jako past na bakterie, které se na ně navážou svými lektiny (Ribeiro a kol., 2010). Díky různorodosti těchto oligosacharidů se zvyšuje pravděpodobnost, že se většina bakterií naváže na hlen a nebude tedy schopna infikovat epitelové buňky a pronikat dále do organismu (Fukuda, 2000).

U členovců nejčastěji nacházíme O-glykany tvořené pouze samotným N-acetylgalaktosaminem (tzv. Tn antigen), popřípadě může být k tomuto N-acetylgalaktosaminu $\beta 1 \rightarrow 3$ vazbou navázána galaktosa (tzv. T antigen) (Mejia a kol., 2006).

3.3. C-glykoproteiny

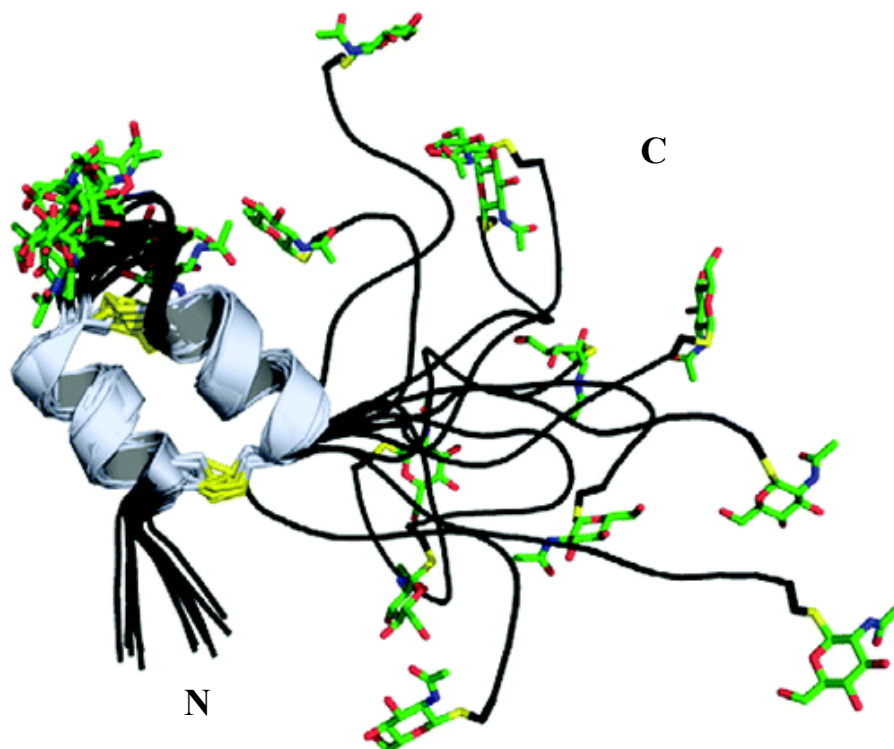
C-glykosylace byla popsána u lidské RNázy 2. K C_2 atomu indolu tryptofanu, který se nachází na sedmé pozici peptidického řetězce RNázy 2, se přímo váže anomerní uhlík α -manopyranosy (de Beer a kol., 1995). Manosa se váže na první tryptofan ve specifické sekvenci Trp-X-X-Trp. Protože se tento motiv vyskytuje v řadě savčích proteinů, je možné, že C-glykosylace může být častějším fenoménem (Krieg a kol., 1998). V práci Krieg a kol. (1997) byla C-manosylace nalezena i v buňkách prasete, myši, křečka a kočkodana, zatímco v bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*), rostlinných a hmyzích buňkách nebyl tento způsob vazby glykanu nalezen. V pozdější práci Munte a kol. (2008) byla ale C-glykosidicky vázaná manosa popsána i u hmyzu. Vazba manosy na tryptofan je katalyzována C-manosyltransferázou za využití dolicholfosfátmanosy jako prekurzoru (Doucey, 1998).

3.4. Fosfoglykoproteiny

Tento typ glykoproteinů je složen ze sacharidové složky vázané na serin či threonin polypeptidového řetězce prostřednictvím fosfodiesterové vazby (Haynes, 1998). Tento způsob vazby sacharidu na protein byl popsán v práci Gustafson a Milner (1980) studující proteinázu I hlenky *Dictyostelium discoideum*. Autoři v této práci prokázali vazbu N-acetylglukosamin-1-fosfátu na hydroxylovou skupinu serinu. Dalším příkladem fosfoglykoproteinu je sekreční kyselá fosfatáza u *Leishmania mexicana* (Ilg a kol., 1994). V tomto případě dochází k vazbě mezi manoso-1-fosfátem a serinem. Experimentální identifikace fosfoglykoproteinů je založena na odlišném štěpení fosfodiesterové vazby oproti N- či O-glykosidické vazbě. Společnou vlastností fosfoglykoproteinů je jejich vysoká imunogenicita (Haynes, 1998).

3.5. S-glykoproteiny

Existence S-glykosylace byla prvně prokázána v práci Stepper a kol. (2011) a souběžně s ní i v práci Oman a kol. (2011). Důvodem pro vznik S-glykosidické vazby může být to, že je stabilnější než N- či O-glykosidická vazba a zřejmě i odolnější proti deglykosylačním enzymům. Při S-glykosylaci dochází k vazbě monosacharidu na síru v thiolové skupině cysteinu. Tato modifikace byla nalezena u 2 bakteriocinů. Bakteriociny jsou antimikrobiální polypeptidy působící baktericidně, či bakteriostaticky na cizí bakterie, díky čemuž mohou být využívány jako přírodní konzervanty (Venugopal a kol., 2011). Jeden z S-glykosylovaných bakteriocinů, glycocin F (Obr. 4), byl izolován z bakterie *Lactobacillus plantarum* (Stepper a kol., 2011). U glycocinu F byl nalezen N-acetylglukosamin vázaný O-glykosidicky na serin, který je zodpovědný za jeho bakteriostatickou funkci a S-glykosidicky vázaný N-acetylhexosamin, který byl v práci Venugopal a kol. (2011) identifikován také jako N-acetylglukosamin. S-glykosidicky vázaný N-acetylglukosamin může sloužit k zachycení glykopeptidu na buněčné stěně cizí bakterie. Druhý S-glykosylovaný bakteriocin (sublancin 168) byl izolován z bakterie *Bacillus subtilis*. Tento glykopeptid obsahuje S-vázanou glukosu, přičemž S-glykosylace je pro jeho antimikrobiální aktivitu nezbytná (Oman a kol., 2011).



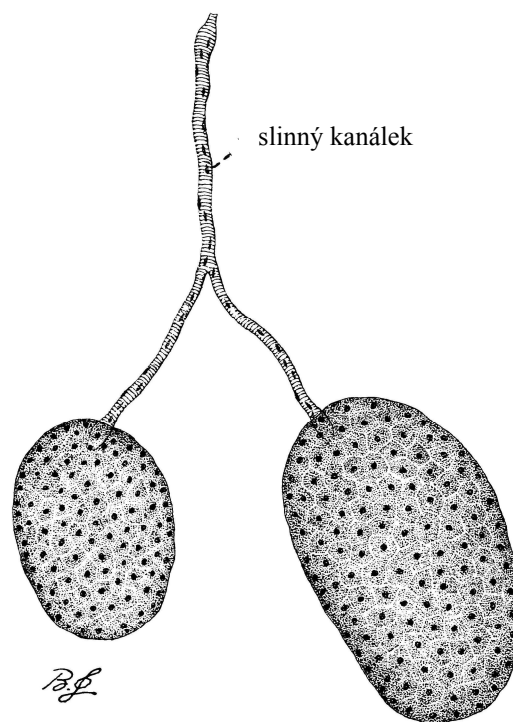
Obr. 4: Struktura glycocinu F. Superpozice 12 struktur s nejnižší energií, zvýrazněna struktura monosacharidů. Označen N a C konec peptidu, atomy síry znázorněny žlutě. N-acetylgalaktosamin vázaný na cystein se nalézá na C konci, O-glykosidicky vázaný N-acetylgalaktosamin mezi helixy peptidu. Převzato z Venugopal a kol. (2011).

4. Slinné žlázy krevsajících členovců

4.1. Slinné žlázy

Slinné žlázy členovců jsou tvořeny jednovrstevným epitelem. Rozlišují se 2 typy slinných žláz, tubulární a alveolární (Valenzuela, 2004). Tubulární žlázy jsou tvořeny centrálním kanálkem, který je obklopen vrstvou buněk obsahujících sekreční měchýřky. Sliny jsou tedy u tohoto typu žláz vylučovány do centrálního kanálku, kterým jsou odváděny k ústnímu ústrojí. Tubulární slinné žlázy mají např. komárovití (Culicidae). Alveolární žlázy tvoří buňky obklopující rozvětvené kanálky a lze je nalézt např. u klíšťat (Ixodida).

Většina krevsajících členovců má jeden pár slinných žláz. Blechy (Siphonaptera) mají 4 hruškovité slinné žlázy, které se u dospělých samic plně dotvářejí až se začátkem sání krve a vývojem vajíček (Gage, 2004). Slinné žlázy mohou být ve tvaru jednoduchých váčků, jako např. u flebotomů (Obr. 5), nebo mohou být lalokovité, jako např. slinné žlázy komárů, které jsou tvořeny 2 laterálními a jedním mediáním lalokem (Obr. 6).



Obr. 5: Slinné žlázy samice *Phlebotomus papatasi*. Upraveno dle Jobling a Lewis (1987).

4.2. Intersexuální rozdíly

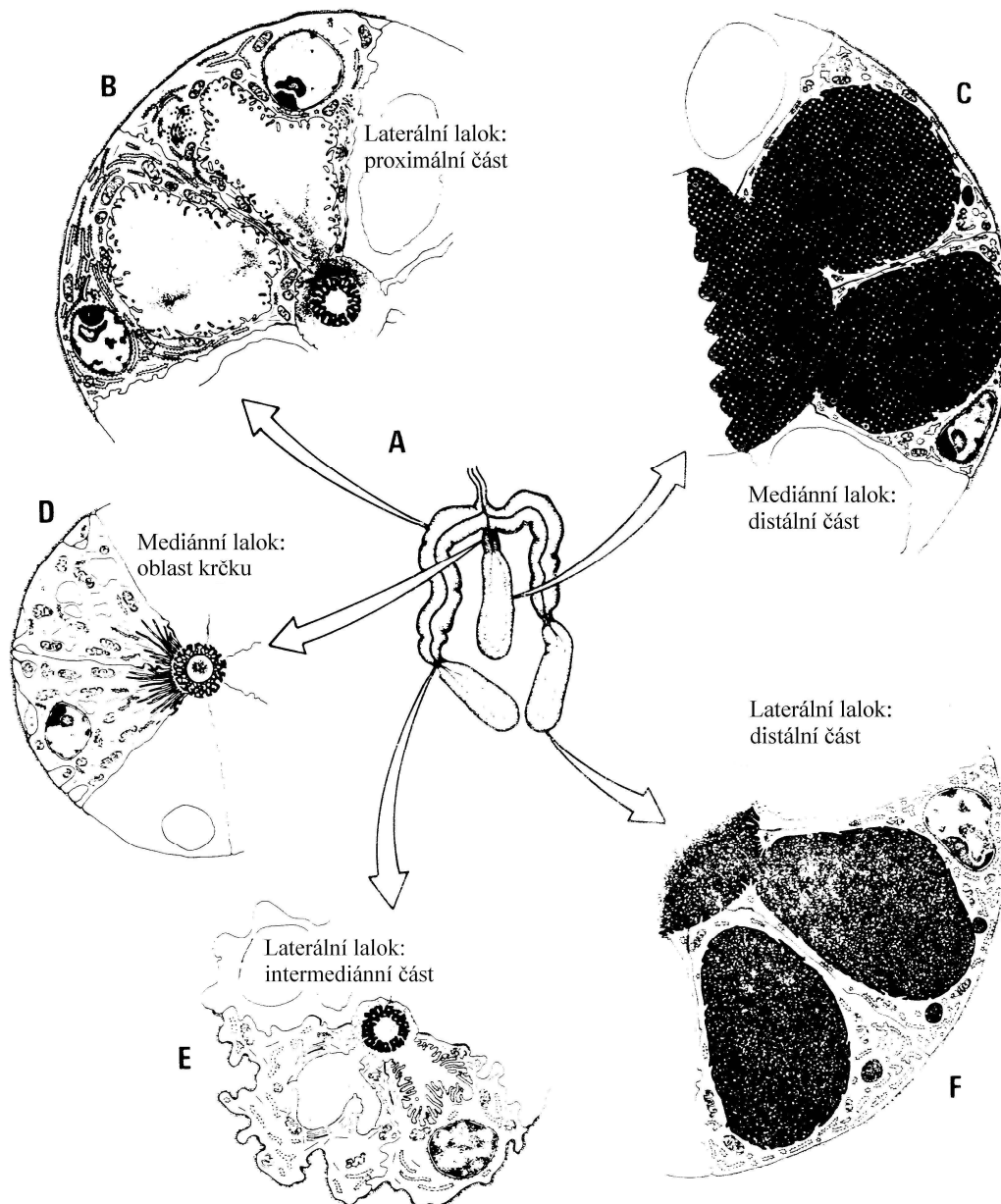
Někteří krevsající členovci, jako např. zákeřnice podčeledi Triatominae, štěnice (Cimicidae), vši (Anoplura) a klíšťáci (Argasidae) sají krev v průběhu celého životního cyklu. U krevsajícího hmyzu s proměnou dokonalou (Holometabola), jako jsou např. blechy (Siphonaptera) nebo dvoukřídli (Diptera), sají krev pouze dospělí jedinci.

U některých krevsajících členovců jsou hematofágní pouze dospělé samice, které potřebují krev jako zdroj bílkovin pro vývoj vajíček. Hematofágnii vyskytující se pouze u samic nalézáme u fylogeneticky odvozenějších klíšat (např. rodu *Ixodes*) a dále u mnoha skupin dvoukřídlých. To platí o všech parazitických čeledi podřádu dlouhorohých (Nematocera), zatímco z parazitických krátkorohých (Brachycera) jen o ovádech (Tabanidae). U ostatních zástupců krátkorohých, jako jsou např. glosiny (Glossinidae), sají krev dospělci obou pohlaví.

Mezi dlouhorohé patří 4 hematofágní čeledi, tj. komárovití (Culicidae), flebotomovití (Phlebotomidae), pakomárcovití (Ceratopogonidae) a muchničkovití (Simuliidae). Samičí slinné žlázy se u zástupců těchto skupin často liší proteinovým složením i velikostí od samčích žláz. Sexuální dimorfismus můžeme nalézt např. u slinných žláz tiplíka *Culicoides variipennis*. Samčí žlázy jsou značně menší a jednodušší než samičí. Morfologické rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny specializací samičích žláz k sekreci látek důležitých pro hematofágní způsob výživy (Pérez de León a kol., 1994). Také váčkovité slinné žlázy flebotomů jsou u samců výrazně menší než u samic. Samčí žlázy *Phlebotomus duboscqi* (*Ph. duboscqi*) obsahují slinné proteiny v 30krát nižší koncentraci než samičí žlázy. Zároveň se liší elektroforetický profil samčích a samičích slinných proteinů. U samic bylo na gelu vizualizováno 8 hlavních polypeptidů, zatímco u samců byl nalezen pouze jeden majoritní polypeptid (Volf a kol., 2000).

Slinné žlázy samic komárů jsou také výrazně větší než samčí žlázy a můžeme u nich rozlišit více morfologických podoblastí (Obr. 6). U samic jsou laterální laloky tvořeny proximální, intermediální a distální částí. Mediální lalok je tvořen krátkým krčkem a distální částí (Dhar a Kumar, 2003). Proteinový profil proximální části laterálního laloku slinné žlázy samice komára *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) odpovídá proteinovému profilu samčí žlázy. U samců, narozdíl od samic, nejsou přítomny dominantní proteiny mediálního a distální části laterálního laloku. V elektroforetickém profilu extraktu slinných žláz samic bylo nalezeno minimálně 6 hlavních a několik méně zřetelných proteinových proužků, které v samčích žlázách patrně nebyly. Zároveň bylo detekováno 14 specificky samičích glykoproteinů slinných žláz, přičemž každá část samičí žlázy měla jiný glykosylační vzor (Andrews a kol., 1997). Proteiny, které se vyskytují ve slinných žlázách samců i samic, jsou nejčastěji zodpovědné za zpracování cukerné potravy (např. maltáza), či mohou mít antimikrobiální nebo jinou funkci. V samičích slinných žlázách komára *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) je specificky překládána více než polovina z 59 transkriptů kódujících potenciálně sekretované proteiny. Tyto slinné proteiny jsou zřejmě zodpovědné za funkce spojené se

sáním a zpracováním krve. Ostatní proteiny jsou exprimovány buď ve slinných žlázách obou pohlaví, a pravděpodobně se účastní zpracování cukerné potravy, nebo byly extrahovány ze slinných žláz i zbytku těla komára, a jsou zřejmě zodpovědné za udržovací (“housekeeping“) funkce (Arcà a kol., 2007).



Obr. 6: Slinné žlázy samice komára *Anopheles stephensi*. A) celé slinné žlázy, B-F) struktura jednotlivých částí slinných žláz. Upraveno dle Clements (2000).

4.3. Obsah a stěna slinné žlázy

Autoři studií, zabývající se sledováním účinků slin krevsajících členovců na obratlovčího hostitele ať už z hlediska vývoje vakcín, sledování expozice hostitele vektorům, přenosu patogenů, či z hlediska vytvoření slinných transkriptomů nebo proteomů, využívají

většinou při svých pokusech homogenátu celých slinných žláz. Při sání členovce se ovšem do hostitele dostanou jen sliny, čili molekuly secernované do lumen slinné žlázy. Proto je důležité zjistit, nakolik se liší proteinový profil stěny a obsahu slinných žláz. V práci Volf a kol. (2000) se všechny hlavní proteiny u *Ph. duboscqi* vyskytovaly v obsahu slinných žláz, ale elektroforetický profil stěny navíc ukázal několik minoritních polypeptidů o molekulové hmotnosti 53-54 kDa, 57 kDa a větší než 62 kDa, které v obsahu nalezeny nebyly.

U některých členovců lze k experimentům využít i samotných slin. Například u zákeřnic lze zachytit vylučované kapičky slin do kapiláry při držení plošnice mezi prsty (Volf a kol., 1993). U klíšťat je nutný poněkud složitější postup (Skallová a kol., 2008). Ústní ústrojí imobilizovaných klíšťat se umístí do ústí skleněné kapiláry. K indukci slinění se na dorsální stranu klíštěte aplikují 2 µl 3% roztoku pilokarpinu v etanolu. Po jedné hodině se sliny odeberou, zbaví se kontaminace pilokarpinem a změří se v nich koncentrace proteinů. U drobnějšího hmyzu, např. u komárů, se používá podobný postup (Remoue a kol., 2006). Je zřejmé, že získání slin, zejména u menších členovců, je výrazně pracnější a časově náročnější než pitva celých slinných žláz.

Ze srovnání proteomů slinných žláz různých krevsajících členovců vyplývá, že proteiny, u nichž se podle signální sekvence předpokládá sekrece do slin, tvoří u jednotlivých druhů různě velké procento všech proteinů nalezených ve slinných žlázách. U blech (Andersen a kol., 2007), komárů (Calvo a kol., 2007; Arcà a kol., 2007) a muchniček (Andersen a kol., 2009) tvoří více než 50% všech sekvencí kódujících proteiny slinných žláz. U roztočů podřádu Ixodida (Francischetti a kol., 2008a a 2008b; Chmelař a kol., 2008; Anatriello a kol., 2010) a glosin (Alves-Silva a kol., 2010) tvoří sekretované proteiny méně než 50% všech proteinů slinných žláz. U krevsajících ploštic (Francischetti a kol., 2010; Assumpção a kol., 2008; Kato a kol. 2010; Santos a kol., 2007) se podíl sekretovaných proteinů mezi druhy výrazně lišil. Vzhledem ke značné variabilitě v podílech proteinů ve slinách, oproti proteinům stěn, by bylo vhodné zvážit, zda používání homogenátů celých slinných žláz nepřináší ve srovnání s použitím samotných slin poněkud zkrácené výsledky.

4.4. Mezidruhové rozdíly v proteinovém složení slinných žláz

Proteinové složení slin krevsajících členovců se často liší i na úrovni druhů. Několik odlišných druhů a geograficky vzdálených kolonií rodu *Phlebotomus* (*Ph.*) a druhu *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) se liší elektroforetickým profilem proteinů z extraktu slinných žláz. Největší variabilita byla nalezena v 38-48 kDa oblasti, naproti tomu nejpodobnější proteinový profil byl u 2 kolonií *Ph. papatasi* (Volf a kol., 2000). Podobnost proteinového

složení slin odpovídá fylogenetické vzdálenosti u druhů a geografické vzdálenosti u jednotlivých kolonií. Podobná závislost byla nalezena i v práci zkoumající druhově specifické slinné antigeny 3 druhů flebotomů (Volf a Rohoušová, 2001). U každého druhu reagovala séra opakovaně pobodaných pokusných zvířat se 4-9 specifickými antigeny lyzátu slinných žláz. Slabá zkřížená reaktivita byla nalezena jen mezi antigeny slinných žláz *Ph. perniciosus* a sérem zvířat pobodaných *Ph. halepensis*, přičemž tyto druhy flebotomů jsou si fylogeneticky blízké. Za zkříženou reaktivitu mezi některými druhy flebotomů mohou být zodpovědné některé konzervované proteiny rodu *Phlebotomus*. V práci Anderson a kol. (2006) byly jako takové identifikovány “yellow-related“ protein, apyrázy a “antigen 5-related“ proteiny, zatímco většina ostatních proteinů se mezi druhy lišila.

Variabilita v elektroforetickém profilu byla nalezena i u 4 kmenů zákeřnice *Triatoma infestans* (*T. infestans*), u nichž byly kromě shodných, nalezeny i proteinové proužky lišící se v intenzitě a několik kmenově specifických proteinových proužků (Schwarz a kol., 2009a). Druhovú specifickú proteínového profilu slinných žláz může sloužit k determinaci jednotlivých druhů, jako je tomu u 5 morfologicky nerozlišitelných sesterských druhů komplexu *Anopheles barbirostris* v Thajsku (Jariyapan a kol., 2010), z nichž některé jsou vektorem *Plasmodium vivax*. U každého z druhů byl nalezen alespoň jeden hlavní specifický protein slinných žláz. Dále se druhy mezi sebou lišily i mobilitou některých proteinů v SDS-polyakrylamidovém gelu.

S případnou druhovou specifickostí slinných proteinů je nutno počítat při výběru antigenů za účelem vývoje vakcín i pro sledování expozice hostitelů krevsajícím členovcům. Při cíleném výzkumu jednoho druhu je jistě výhodné použít specifický protein, ovšem při zkoumání expozice hostitelů na lokalitě, kde se může vyskytovat více druhů vektorů, by využití takového proteinu vedlo ke značnému zkreslení výsledků.

4.5. Protilátková odpověď pobodaných hostitelů

Sliny krevsajících členovců vyvolávají u exponovaných hostitelů protilátkovou odpověď. K detekci protilátkové odpovědi mohou sloužit homogenáty slinných žláz, sliny, či vybrané imunogenní proteiny slin exprimované rekombinantně. Protilátková odpověď proti slinám krevsajících členovců může sloužit jako indikátor vystavení hostitelské populace těmto členovcům, dále může být využita k vymezení prostorové distribuce vektorů v určité populaci hostitelů, popř. k identifikaci rezervoárových hostitelů. Detekce protilátek proti slinám vektorů také může pomoci při uplatňování programů zaměřených na kontrolu vektorů i jimi přenášených onemocnění (Teixeira a kol., 2010).

Velké epidemiologické studie využívající homogenátů slinných žláz členovců jsou díky nutnosti pitev tisíců slinných žláz časově a technicky téměř neproveditelné, proto je snahou identifikovat vhodné imunogenní proteiny, které lze následně vyrábět rekombinantně. První prací, využívající rekombinantní protein ze slin k detekci protilátkové odpovědi hostitele jako měřítka expozice flebotomům, je práce Barral a kol. (2000). V této práci byla prokázána pozitivní korelace mezi protilátkovou (IgG) odpovědí proti antigenu *Leishmania* a IgG proti rekombinantnímu slinnému proteinu *L. longipalpis*, díky čemuž lze tento protein využít i při studiu epidemiologie leishmaniózy. Identifikace a exprese slinných proteinů *L. longipalpis* (Teixeira a kol., 2010) rozeznávaných savčím hostitelem prohlubuje porozumění interakcím mezi hostitelem a vektorem a pomáhá při vývoji epidemiologických nástrojů spojujících vystavení hostitele vektoru s náchylností či imunitou k jím přenášené leishmanióze. V práci Teixeira a kol. (2010) bylo exprimováno 9 rekombinantních slinných proteinů *L. longipalpis* z nichž 2 reagovaly s protilátkami v séru lidí a psů pokousaných stejným druhem a zároveň se na ně nevázaly protilátky lidí pokousaných sympatrickým druhem *Lutzomyia intermedia*. Tyto 2 proteiny jsou tedy vhodnými markery expozice hostitele *L. longipalpis* v oblastech, kde se jiné druhy flebotomů vyskytují v zanedbatelném počtu. V navazující práci (Souza a kol., 2010) bylo prokázáno, že detekce protilátkové odpovědi kombinací těchto 2 antigenů je schopná nahradit detekci pomocí celých slinných žláz.

Využitím rekombinantního slinného glykoproteinu *T. infestans* jako měřítka expozice domácích kuřat a morčat zástupcům podčeledi *Triatominae* se zabývají práce Schwarz a kol. (2009a, 2009b a 2010). Proti slinným antigenům *T. infestans* se v hostiteli tvoří protilátková odpověď. Tu lze detekovat již 2 dny po pobodání 5 zákeřnicemi. Titry protilátek IgG v séru kuřat a morčat opakovaně vystavovaným 5 *T. infestans* byly nižší než u skupiny zvířat vystavovaných 25 zákeřnicím, čili je možné odlišit méně a více zamořené populace domácích zvířat. Ve slinách všech 4 odlišných kmenů *T. infestans* byly přítomny jen 14 a 21 kDa antigeny, přičemž 14 kDa protein reagoval s protilátkami proti 4 dalším druhům krevsajících zákeřnic a nereagoval s protilátkami proti slinám komárů. Zároveň byly 14 a 21 kDa proteiny rozeznány i séry pocházejícími z hostitelů infestovaných zákeřnicemi v přirozených podmínkách (Schwarz a kol., 2009a). V následující práci (Schwarz a kol., 2009b) byl 14,6 kDa vysoce imunogenní glykoprotein vyroben rekombinantně a byla ověřena jeho specifita. Detekci IgG odpovědi pomocí tohoto glykoproteinu lze využít jako epidemiologické měřítko pro sledování expozice hostitelů již nízkým počtům odlišných druhů zákeřnic. Potíž je ovšem s délkou přetrvání IgG odpovědi, která perzistuje v kuřatech 4 a v morčatech dokonce až 6

měsíců. Možným řešením je kombinace protilátkové IgG a IgM odpovědi proti slinám *T. infestans* (Schwarz a kol., 2010). IgM odpověď je měřitelná již 24 hodin po expozici 5 *T. infestans* a mizí po 18 dnech od expozice, její titry se ovšem na rozdíl od IgG při infestaci více plošticemi nezvyšují. Reakce IgM na rekombinantní antigen je násobně vyšší než na sliny, což může dokazovat, že 14,6 kDa glykoprotein je hlavním imunogenním proteinem slin, ve kterých ovšem tvoří jen 8% všech proteinů. Sledování IgG i IgM odpovědi hostitelů může sloužit jako kontrola úspěšnosti insekticidních programů v endemických lokalitách.

Detekce protilátkové odpovědi proti slinám jako měřítka expozice se samozřejmě využívá i u jiných druhů krevsajících členovců, jako např. u komárů v souvislosti s rizikem onemocnění malárií (Remoue a kol., 2006), či k vyhodnocení účinnosti insekticidních opatření (Drame a kol., 2010), a u klíšťat v souvislosti s Lymeskou boreliózou (Schwartz a kol., 1990 a 1991). Při studiu expozice hostitelů krevsajícím členovcům je důležité mít na zřeteli jednak specifčnost ale i možnou podobnost antigenů slinných žláz jednotlivých druhů i kmenů členovců, jednak i rozdíly v imunitních reakcích jednotlivých hostitelů, kteří mohou rozeznávat zcela odlišné slinné antigeny (Schwarz a kol., 2009a).

5. Glykoproteiny ve slinách krevsajících členovců

5.1. Potenciální glykoproteiny ve slinách krevsajících členovců

Studie zaměřené na analýzu transkriptomu a proteomu slinných žláz byly provedeny pouze u několika druhů krevsajících členovců. Cílem bylo popsat jednotlivé skupiny slinných proteinů, určit jejich fylogenezi a pokud možno i funkci. Autoři se ovšem většinou příliš nevěnovali otázce post-translačních modifikací slinných proteinů, mezi které patří i jejich glykosylace. Ve většině prací byla zjišťována pouze potenciální O-glykosylační místa proteinů, a to pomocí programu NetOGlyc (Hansen a kol., 1998; Julenius a kol., 2005). V tělech členovců ale zřejmě převažují N-glykoproteiny (Grubhoffer a Dusbábek, 1991; Uhlíř a kol., 1994; Volf a kol., 2000), např. u octomilky tvoří většinu glykosylovaných proteinů vysoce manosylované N-glykoproteiny (Seppo a Tiemeyer, 2000). Jelikož i většina glykoproteinů nalezených ve slinách komára *An. gambiae* má cukernou složku tvořenou N-glykany (Andrews a kol., 1997) a ve slinách zákeřnice *T. infestans* byly nalezeny dokonce výhradně N-glykoproteiny (Volf a kol., 1993), není analýza pouze O-glykosylačních míst příliš vypovídající o celkové šíři glykoproteinů ve slinných žlázách krevsajících členovců. Nejvíce nalezených O-glykoproteinů lze zařadit do skupiny mucinů. V práci Alves-Silva a kol. (2010), věnující se proteomu slinných žláz glosiny *Glossina morsitans morsitans* (*G. m. morsitans*), jsou jako muciny charakterizovány proteiny bohaté na serin a threonin, které jsou sekretovány do slin a obsahují více než 10 potenciálních O-glykosylačních míst pro vazbu N-acetylgalaktosaminu. Kromě možných dalších funkcí muciny pomáhají lubrikovat a chránit slinné kanálky, ústní ústrojí a potravní kanál členovců. U glosiny bylo popsáno 9 takových proteinů, z nichž 3 obsahovaly více než 40 potenciálních glykosylačních míst a jeden reagoval s králičím antisérem proti slinám *G. m. morsitans*.

Proteinovým složením slin krevsajících dvoukřídlých podřádu dlouhorohých (Nematocera) se zabývala práce Ribeiro a kol. (2010). Celkem u nich bylo nalezeno 106 mucinů patřících do 12 rodin. V sialomu (tj. souboru proteinů a mRNA exprimovaných ve slinných žlázách) samice komára *Ae. albopictus* byly nalezeny 4 muciny (Arcà a kol., 2007). Dva z nich byly malé peptidy s molekulovou hmotností menší než 8 kDa, z nichž jeden byl podobný mucinu popsanému u *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*). Zbylé muciny byly podobné jiným komářím mucinům. Předpokládanou funkcí těchto glykoproteinů je udržování hydratovaného povrchu ústního ústrojí. U jednoho mucinu byla nalezena doména vázající chitin, z čehož se předpokládá jeho funkce v obalení chitinové výstelky slinných kanálků a stomodea. Všechny 4 muciny byly nalezeny pouze ve slinných žlázách. K mucinům *Ae.*

albopictus lze zařadit také antimikrobiální protein s 19 potenciálními glykosylačními místy. Funkcí tohoto peptidu bohatého na histidin nalezeného u obou pohlaví může být vychytávání zinečnatých a nikelnatých iontů nutných pro bakteriální růst a tím bránění množení bakterií v potravě. Podobné peptidy byly nalezeny i u komárů *Ae. aegypti* a *Culex pipiens quinquefasciatus*. Glykosylační místa mucinového typu obsahuje i pět 30 kDa alergenů *Ae. albopictus*, přičemž tato proteinová rodina je exprimována pouze ve slinných žlázách samic komárů (Arcà a kol., 2007). Podobný 30 kDa alergen byl nalezen i u *Culex pipiens quinquefasciatus* (Ribeiro a kol., 2004). U tohoto druhu komára bylo popsáno 6 pravděpodobných mucinů s 5-78 predikovanými O-glykosylačními místy. Muciny o molekulové hmotnosti 8,3 kDa, 13,4 kDa a 56,5 kDa jsou podobné glykoproteinům nalezeným u *Ae. aegypti*. Jeden z popsaných glykoproteinů obsahující 78 potenciálních O-glykosylačních míst je ze 45% tvořen pouze aminokyselinami serinem a threoninem.

U komára *Anopheles funestus* byly popsány 3 proteiny, jejichž aminokyselinová sekvence obsahuje 10,5-35% serinu a threoninu a bylo u nich nalezeno 20-58 potenciálních glykosylačních míst (Calvo a kol., 2007). Mezi sekretované proteiny nalezené jen u druhů podčeledi Anophelinae patří 8,2 kDa rodina. Proteiny této rodiny mají vysoký obsah serinu a threoninu a bylo u nich nalezeno 9 možných míst pro vazbu N-acetylgalaktosaminu. Tři glykoproteiny s více než 10 potenciálními místy pro O-glykosidickou vazbu N-acetylgalaktosaminu byly nalezeny u komára *An. gambiae* (Arcà a kol., 2005). Jeden z nich má pravděpodobně doménu vázající chitin, jiný obsahuje až 60 potenciálních O-glykosylačních míst. Potenciální O-glykosylační místa byla nalezena také u jedné metaloproteinázy, která hraje roli při vývoji slinných žláz dospělců.

Sialom muchničky *Simulium vittatum* byl studován v práci Andersen a kol. (2009). Byly nalezeny 2 proteinové fragmenty s více než 100 predikovanými glykosylačními místy. Jeden z těchto glykoproteinů patří mezi kyselé, na glutamin bohaté proteiny, jejichž funkcí by mohla být vazba na proteiny nebo receptory hostitelské extracelulární matrix. Celkem 5 glykoproteinů mucinového typu bylo nalezeno i u tiplíka *Culicoides sonorensis* (Campbell a kol., 2005). V práci Russell a kol. (2009) byla přítomnost glykoproteinů v extraktu slinných žláz tiplíka *Culicoides nubeculosus* detekována pomocí specifického barvení (ProQ Emerald 488™) elektroforeticky separovaných proteinů. Cukerná složka byla nalezena u většiny slinných proteinů o vyšších molekulových hmotnostech a i u několika menších proteinů.

Analýzou slinných transkriptů flebotoma *Ph. arabicus* se zabývá práce Hostomská a kol. (2009). V této práci byla predikována jak potenciální O-glykosylační, tak N-glykosylační místa slinných proteinů. Potenciální N-glykosylační místa byla nalezena u 2 "D7-related"

proteinů. Tyto proteiny, s předpokládanou molekulovou hmotností 26-28 kDa, mohou hrát roli v rozvoji lidské hypersenzitivity na pobodání flebotomy. Ve slinných žlázách *Ph. arabicus* byl také nalezen protein homologní s jedním z pravděpodobně sekretovaných mucinů nalezených u *Ae. aegypti*. Tento protein o předpokládané molekulové hmotnosti 22,2 kDa obsahuje 9 potenciálních O-glykosylačních a 2 potenciální N-glykosylační místa. Při barvení proteinů pomocí ProQ Emerald bylo detekováno 6 glykoproteinových proužků. Ty odpovídaly amyláze, "yellow related" proteinu, 34 kDa proteinům a dalším blíže neidentifikovaným proteinům.

Další skupinou hmyzu, u kterých byl sialom studován, jsou ploštice (Heteroptera). Autoři práce zabývající se sialomem zákeřnice *T. infestans* sice v metodice uvádějí využití serveru NetOGlyc pro predikci O-glykosylačních míst, ale v celé práci (Assumpção a kol., 2008) není o glykoproteinech ani zmínka. To může potvrzovat předpoklad Volf a kol. (1993), že se ve slinách *T. infestans* O-glykoproteiny nevyskytují. V sialomu štěnice *Cimex lectularius* byl nalezen pouze jeden na serin bohatý protein s potenciálními O-glykosylačními místy pro vazbu N-acetylgalaktosaminu (Francischetti a kol., 2010). Díky chybějící terminální sekvenci nelze určit, zda je tento protein sekretován do slin.

Také u blech (Siphonaptera) bylo nalezeno několik proteinů řazených mezi muciny. U blechy morové (*Xenopsylla cheopis*) byly nalezeny 3 sekretované slinné peptidy o molekulové hmotnosti 5,5-13 kDa obsahující 6-12 potenciálních glykosylačních míst (Andersen a kol., 2007). Jejich předpokládanou funkcí je opět lubrikace trávicích cest.

Kromě sialomů řady hmyzích vektorů, byly analyzovány i slinné transkriptomy a proteomy roztočů podřádu Ixodida (Metastigmata). Roztoče podřádu Ixodida dělíme na 2 hlavní skupiny, klíšťáky (Argasidae) a klíšťata (Ixodidae). Sialom klíšťat dosahuje větší komplexity než u klíšťáků, zřejmě díky delšímu kontaktu klíšťat s imunitním systémem hostitele (Francischetti a kol., 2008a). Sialomem klíštěte *Ixodes scapularis* (*I. scapularis*) se zabývá práce Ribeiro a kol. (2006). Autoři charakterizovali 5 předpokládaných glykoproteinů patřících do skupiny proteinů obsahujících dvojitou Kunitz doménu. Tyto proteiny, obsahující na serin a threonin bohatý C konec, mají 15-23 potenciálních O-glykosylačních míst. Glykosidicky vázaná cukerná složka těchto proteinů přitom může bránit jejich degradaci karboxypeptidázami. Tyto potenciální glykoproteiny mohou hrát roli jako inhibitory proteáz, účastnících se srážení krve. Také proteiny *I. scapularis*, které působí proti některým složkám komplementové kaskády (Isc proteinová rodina), mají C konec bohatý na serin a threonin a obsahují 8-14 potenciálních O-glykosylačních míst. Více než 4 potenciální O-glykosylační místa byla nalezena u 12-16 kDa proteinů patřících do LPTS peptidové rodiny. Sialom *I.*

scapularis obsahuje i několik mucinů se 14 a více potenciálními O-glykosylačními místy a 1-2 proteiny popsané také jako muciny, které ovšem obsahují jen 4 možná O-glykosylační místa a chitin vázající domény. Proteiny řazené k mucinům byly nalezeny i u klíšěte *Rhipicephalus sanguineus* (Anatriello a kol., 2010). Jeden z nich obsahuje 5 možných O-glykosylačních míst a chitin vázající doménu. Tento protein je příbuzný mucinům nalezeným i u jiných členovců. Zbylé 2 proteiny obsahují 11 potenciálních O-glykosylačních míst.

V sialomu klíšěťáka *Ornithodoros parkeri* byly nalezeny 4 zásadité proteiny bohaté na threonin, popř. na serin, s molekulovou hmotností 12,5-17,8 kDa (Francischetti a kol., 2008b). Tyto proteiny obsahují 13-34 potenciálních O-glykosylačních míst. Funkcí těchto k mucinům řazených proteinů je pravděpodobně zvlhčování ústního ústrojí, kromě čehož mohou zřejmě interagovat s hostitelskými proteiny extracelulární matrix. U jiného druhu klíšěťáka (*Ornithodoros coriaceus*) byla identifikována jen jedna proteinová sekvence bohatá na serin a glycin, která by mohla být řazena k mucinům (Francischetti a kol., 2008a).

5.2. Strukturní analýza a antigenní vlastnosti slinných glykoproteinů

K identifikaci glykoproteinů lze použít i lektinů. Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny, které obsahují minimálně 2 vazebná místa pro cukry (Goldstein a kol., 1980). Lektiny specificky reagují s konkrétními monosacharidy vyskytujícími se volně, či vázanými v cukrech, glykolipidech, či glykoproteinech. Vazebná specifita vybraných lektinů je znázorněna v tabulce (Tab. 1). Pomocí komerčně dostupných lektinů s úzkou cukernou specifitou lze zjistit nejen přítomnost glykosylovaných proteinů, ale také dále určit strukturní typ glykanů vázaných na tyto glykoproteiny.

Lektin	Zdroj	Vazebná specifita pro:	
		Monosacharid	Typ glykanů
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	D-manosa D-glukosa	vysoce manosylovaný komplexní, hybridní
PSA	<i>Pisum sativum</i>	D-manosa D-glukosa	komplexní- biantenární komplexní- triantenární
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	D-galaktosa	komplexní- biantenární O-glykany
SBA	<i>Glycine max</i>	N-acetyl-D-galaktosamin D-galaktosa	O-glykany (bez kyseliny sialové)
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	L-fukosa	komplexní
WGA	<i>Triticum aestivum</i>	N-acetyl-D-glukosamin (kyselina sialová)	hybridní (s terminální k. sialovou)

Tab. 1: Vazebná specifita vybraných lektinů. Upraveno dle Uhlíř a kol. (1994).

Identifikaci glykoproteinů v homogenátu slinných žláz 2 druhů flebotomů (*Ph. duboscqi* a *L. longipalpis*) se zabývá práce Volf a kol. (2000). Glykoproteiny byly identifikovány a analyzovány pomocí 5 lektinů. N-glykany komplexního typu byly nalezeny ve 48 a 53-54 kDa glykoproteinech obou druhů, dále u 57-60 kDa glykoproteinů *Ph. duboscqi* a u 65-67 kDa glykoproteinů *L. longipalpis*. Vysoce manosylované N-glykany byly součástí 20 a 39 kDa glykoproteinů *L. longipalpis* a 40-42 kDa glykoproteinů *Ph. duboscqi*. Část glykoproteinů byla obsažena v obsahu i stěně slinných žláz. U *Ph. duboscqi* byly pouze ve stěně nalezeny 53-54 a 57 kDa glykoproteiny.

Glykoproteiny byly izolovány i v samčích a samičích slinných žlázách komára *An. gambiae* (Andrews a kol., 1997). Výrazně větší množství glykoproteinů bylo detekováno v samičích žlázách. Nejvíce glykoproteinů reagovalo s ConA (vazebná specifita pro manosu a glukosu) a DBA (vazebná specifita pro N-acetylgalaktosamin). Samičí glykoproteiny o molekulové hmotnosti 14, 19 a 24 kDa byly rozeznány pouze pomocí DBA, což ukazuje na přítomnost O-glykanů mucinového typu. Celkem bylo detekováno 14 specificky samičích slinných glykoproteinů, z nichž 11 reagovalo s lektiny SBA a PNA. Deglykosylace glykoproteinů enzymem N-glykosidázou F, štěpícím N-glykosidickou vazbu, prokázala ve slinných žlázách *An. gambiae* většinový podíl N-glykanů. Některé glykoproteiny obsahující N-glykany byly i po deglykosylaci N-glykosidázou F rozpoznávány prostřednictvím PNA. Tento lektin mimo jiné rozeznává běžnou strukturní jednotku O-glykanů mucinového typu (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc), což ukazuje na možnou přítomnost N- i O-glykanů u těchto glykoproteinů.

Popisem 4 slinných glykoproteinů komára *Anopheles albimanus* (*An. albimanus*) se zabývá práce Montero-Solis a kol. (2004). Tyto glykoproteiny o molekulové hmotnosti 65 kDa jsou do slin sekretovány buňkami mediálního a distální části laterálních laloků samičích slinných žláz a reagují s monoklonální protilátkou vybranou z myších sérových protilátek produkovaných proti extraktu slinných žláz *An. albimanus*. Po oxidaci glykoproteinů jodistanem sodným je protilátka přestala rozpoznávat, což ukazuje na účast cukerné složky glykoproteinů v její vazbě. Pomocí molekulární analýzy byla získána mRNA sekvence jednoho z glykoproteinů (gp65-1), ze které byla predikována přítomnost 4 N-glykosylačních míst, což podporuje hypotézu, že se jedná o N-glykosylované proteiny. Z nukleotidové sekvence byla také odhadnuta molekulová hmotnost proteinové části gp65-1 na 43,4 kDa, z čehož vyplývá, že post-translační modifikace tvoří 21,6 kDa výsledného glykoproteinu.

Autoři některých prací se primárně zajímali o strukturní analýzu těch glykoproteinů, které jsou schopny vyvolávat imunitní odpověď hostitele. Hlavní antigenní glykoproteiny

obsažené ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) byly popsány v práci Uhlíř a kol. (1994). Ve slinných žlázách *I. ricinus* je zřejmě obsaženo široké spektrum N- i O-glykosylovaných proteinů, jelikož se k nim vázaly všechny lektiny uvedené v tabulce (Tab. 1), kromě UEA. S králičím sérem proti dospělým *I. ricinus* reagovaly glykoproteiny o molekulové hmotnosti 35-40, 45, 56 a 81 kDa. Antigen o 45 kDa interagoval s ConA, PSA, PNA i SBA, což dokazuje, že k tomuto proteinu jsou glykosidicky vázány N- i O-glykany. Sacharidová složka ostatních identifikovaných glykoproteinů byla tvořena pouze komplexními nebo vysoce manosylovanými N-glykany. Jelikož většina antigenů rozeznávaných sérem králíků exponovaných klíšťatům patří mezi glykoproteiny, je možné, že za jejich antigenní vlastnosti je odpovědná cukerná část glykoproteinů. Analýza antigenních glykoproteinů byla provedena i u jiného roztoče, klíšťáka *Argas polonicus* (Grubhoffer a Dusbábek, 1991). K analýze glykoproteinů byly využity všechny lektiny popsané v tabulce (Tab. 1), kromě UEA. Antigenicita byla zjišťována pomocí inkubace elektroforeticky separovaných proteinů přenesených na nitrocelulosovou membránu se sérem holubů opakovaně pobodaných larvami klíšťáků. V homogenátu slinných žláz byly nalezeny 3 dominantní antigeny o molekulové hmotnosti 19, 34 a 35 kDa. Mimo ně bylo nalezeno ještě několik méně antigenních proteinů. Antigeny o molekulové hmotnosti 19, 21, 23 a 27 kDa byly rozpoznány prostřednictvím PSA a slaběji i ConA, což naznačuje, že obsahují N-glykany komplexního typu. Dominantní 34 kDa glykoprotein reagoval se všemi lektiny, z čehož lze předpokládat N- i O-glykosylaci. Antigen o 35 kDa glykosylován nebyl. Slinný neantigenní glykoprotein o molekulové hmotnosti 42 kDa vázal PNA a slaběji i PSA, což ukazuje na přítomnost komplexních N-glykanů obsahujících terminální galaktosu. Neantigenní 305 kDa glykoprotein, nalezený prakticky ve všech tkáních klíšťáka, reagoval s lektiny ConA, PSA a WGA, takže se u něj předpokládá N-glykosylace.

Charakterizací antigenů slinných žláz zákeřnice *T. infestans* se zabývá práce Volf a kol. (1993). V této práci byla poprvé popsána dynamika protilátkové (IgG) odpovědi u hostitelů opakovaně vystavovaných sání krevsajícího hmyzu. Protilátky pobodaných myší rozeznávaly 6-7 proteinů o molekulové hmotnosti 80-120 kDa. Jako hlavní proteinové komponenty slinných žláz *T. infestans* byly identifikovány 4 nízkomolekulární proteiny, z nichž minimálně 3 byly glykosylovány. Slinné glykoproteiny byly identifikovány pomocí inkubace se 4 lektiny (PNA, PSA, SBA a WGA), přičemž PSA rozeznalo asi 10 glykoproteinů mezi 18-80 kDa, zatímco ostatní lektiny poskytovaly jen nespecifické reakce. S myšími sérovými protilátkami reagoval jen 80 kDa glykoprotein. Rozpoznání glykoproteinů pouze pomocí PSA ukazuje na převahu biantennárních nebo triantennárních N-glykanů

komplexního typu. Tento typ glykanů byl nalezen i u rekombinantního slinného 14,6 kDa glykoproteinu *T. infestans* (rTiSP14,6), který je rozeznáván protilátkami ze séra opakovaně pobodaných kuřat (Schwarz a kol., 2009b). Podle proteinové sekvence obsahuje tento glykoprotein 3 potenciální N-glykosylační a žádné O-glykosylační místo. Analýzou rTiSP14,6 byly identifikovány biantennární a triantennární N-glykany vázané k asparaginu jednoho z potenciálních N-glykosylačních míst.

Slinné antigeny byly zkoumány i u glosiny *Glossina palpalis palpalis* (Mařha a kol., 1986). Pozitivní reakce s IgG protilátkami získanými ze séra králíků opakovaně pobodaných glosinami byla zaznamenána celkem u 4 antigenů. Glykoproteiny byly z homogenátu slinných žláz izolovány pomocí afinitní chromatografie s navázaným lektinem ConA. Bylo nalezeno 5 N-glykosylovaných proteinů, z nichž 2 byly zřejmě totožné s hlavními 55 a 60 kDa antigeny.

Izolací antigenu, který použit jako vakcína indukuje částečnou ochranu dobytka proti infestaci klíšťaty *Boophilus microplus* se zabývá práce McKenna a kol. (1998). Autoři izolovali 63 kDa membránově vázaný glykoprotein (BMA7), vyskytující se na povrchu slinných žláz, vaječníků, střeva (a zřejmě i dalších tkání) klíštěte, a zjistili určitou podobnost tohoto glykoproteinu s obratlovčími muciny. Sacharidová složka BMA7 tvoří 36 kDa (57% glykoproteinu) a je tvořena N- i O-glykany. Protilátkovou odpověď vyvolává proteinová i sacharidová část glykoproteinu, přičemž větší roli pravděpodobně hraje cukerná složka. Zřejmě se jedná o tzv. skrytý antigen, protože při sání na hostiteli nevyvolává žádnou, nebo jen velmi malou imunitní odpověď (McKenna a kol., 1998).

Ve slinách hematofágních členovců se vyskytuje řada látek ovlivňujících hostitelský organismus. Mezi tyto látky patří zejména antihemostatika, vasodilatátory, protizánětlivé a imunomodulační látky. Funkcí těchto látek je umožnit hematofágnímu členovci nasát se na hostiteli a popř. napomoci úspěšné nákaze hostitele patogeny přenášenými členovci (Titus a kol., 2006; Ribeiro a Francischetti, 2003).

Imunomodulačními účinky slin tiplíka *Culicoides sonorensis* na myší imunitní buňky se zabývá práce Bishop a kol. (2006). Homogenát slinných žláz inhiboval proliferaci slezinných T-lymfocytů aktivovaných mitogenem (ConA). Dále inhiboval polyklonální odpověď mitogenem (lipopolysacharid- LPS) aktivovaných slezinných B-lymfocytů a byl odpovědný za snížení produkce oxidu dusnatého peritoneálními makrofágy stimulovanými LPS. Tato suprese imunitních reakcí může pomoci přenášeným patogenům infikovat hostitele. Pomocí lektinové (ConA) afinitní chromatografie byla izolována N-glykosylovaná frakce proteinů slinných žláz tiplíka. Při ředění v poměru 1:50 byla tato frakce schopna inhibovat proliferaci slezinných buněk ze 75%. V této frakci byl nalezen jeden hlavní 66 kDa

glykoprotein, který je zřejmě zodpovědný alespoň za některé z výše zmíněných modifikací imunitních reakcí myších leukocytů.

Valenzuela a kol. (2000) se ve své práci zabývali purifikací a expresí rekombinantního slinného glykoproteinu klíštěte *I. scapularis* (Isac), působícího proti alternativní cestě aktivace komplementu hostitele. Komplement je složkou nespecifické imunity. Je tvořen asi 30 proteiny, které se postupně kaskádovitě aktivují. Hlavní funkcí komplementu je označení mikrobiálních buněk a jejich osmotická lýza. Alternativní cesta aktivace komplementu slouží k obraně proti patogenům a podílí se také na imunitní reakci, která snižuje úspěšnost sání klíšťat u opakovaně napadených hostitelů. Nativní Isac protein inhibující komplement byl izolován pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) a rekombinantní Isac (r-Isac) byl exprimován v savčím expresním systému (COS-7 buňky). Antikomplementová aktivita Isac byla diagnostikována podle schopnosti nativního i rekombinantního proteinu inhibovat lýzu králičích erytrocytů lidským sérem. Protein r-Isac byl také zodpovědný za inhibici vazby molekuly C3b, což je klíčová molekula komplementu vázající se na antigenní povrch, na agarosu. Dále byl také zodpovědný za rozpad alternativní C3-konvertázy, která štěpí protein C3 na fragmenty C3a a C3b. Z nukleotidové sekvence byla molekulová hmotnost Isac proteinu odhadnuta na 18,5 kDa. Podle chování při chromatografii ale molekulová hmotnost nativního i rekombinantního Isac proteinu odpovídala spíše 65 kDa. Tento rozdíl může být způsoben zvláštním chováním některých proteinů při chromatografii, nebo polymerizací, či glykosylací Isac proteinu. V sekvenci Isac proteinu bylo nalezeno 7 potenciálních N-glykosylačních míst (Valenzuela a kol., 2000). Zároveň má tento protein C konec bohatý na serin a threonin a obsahuje několik potenciálních O-glykosylačních míst (Ribeiro a kol., 2006). Je tedy pravděpodobné, že se jedná o glykoprotein.

5.3. Expese rekombinantních glykoproteinů

Expese rekombinantních proteinů krevsajících členovců má oproti použití homogenátu celých slinných žláz řadu výhod. Hlavním pozitivem je to, že nevyžaduje obtížný chov členovců v laboratořích a jejich časově i technicky náročné pitvy. Výhodou rekombinantních slinných proteinů je i lepší reprodukovatelnost epidemiologických studií než při využití celých slinných žláz, jejichž proteinový profil se mění v závislosti na několika faktorech jako je věk (Volf a kol., 2000; Prates a kol., 2008), teplota (Volf a kol., 2000) a doba mezi sáním krve a pitvou slinných žláz (Prates a kol., 2008).

Hlavní nevýhodou rekombinantní výroby proteinů je neschopnost některých expresních systémů post-translačně modifikovat proteiny. Takovou post-translační modifikací

je i glykosylace proteinů, přičemž cukerná složka může mimo jiné hrát roli v imunogenicitě vzniklého glykoproteinu. To znamená, že pro rekombinantní výrobu je vhodné buď vybrat imunogenní protein, který není glykosylován, nebo takový glykoprotein, u něž je za imunogenní vlastnosti zodpovědná pouze bílkovinná část molekuly. Příkladem takového glykoproteinu je zřejmě mucin exprimovaný ve slinných žlázách glosiny *G. m. morsitans* (Alves-Silva a kol., 2010). Tento mucin byl vyroben rekombinantně v bakterii *E. coli*, která není schopna glykosylovat proteiny. Přesto rekombinantní mucin reagoval se sérem králíků, kterým byly injikovány sliny glosin. Z toho lze odvodit, že za antigenní vlastnosti je odpovědná proteinová část tohoto glykoproteinu.

Jinou možností, jak se vyrovnat s glykosylací vybraných imunogenních proteinů, je vybrat expresní systém schopný stejné nebo alespoň podobné glykosylace proteinů jako v nativních podmínkách. Expresní systém bakterie *E. coli* a hmyzích buněk (DS-2) srovnává Hofinger a kol. (2007) v práci zabývající se expresí lidské hyaluronidázy (Hyal-1). Hyal-1 exprimovaná v *E. coli* měla molekulovou hmotnost 48 kDa, nebyla glykosylována, špatně se skládala a její aktivita byla 80krát nižší než při expresi v hmyzím systému. Výhodou prokaryotního systému byla jeho jednoduchost, rychlost, relativně nízká cena a vysoký výtěžek. Exprese Hyal-1 v hmyzích buňkách byla díky jejich pomalému růstu časově náročnější, ale umožňovala získat glykoprotein s glykosylačním vzorem podobným savčímu, s molekulovou hmotností 54 kDa a aktivitou odpovídající nativní Hyal-1. Hyal-1 obsahuje 3 potenciální N-glykosylační místa a velikost její cukerné složky odpovídá 3-4 kDa. Po deglykosylaci rekombinantní Hyal-1 došlo k podstatnému snížení její enzymatické aktivity, za kterou je tedy zřejmě ze značné části odpovědná její N-glykanová složka. Pro enzymatické pokusy je tedy v tomto případě vhodnější použít hmyzí expresní systém. Obdobné srovnání bylo provedeno i pro hyaluronidázu izolovanou z včelího jedu (Soldatova a kol., 1998). Hyaluronidáza exprimovaná v hmyzích buňkách (Sf9) měla podobnou aktivitu jako nativní hyaluronidáza (nHya), zatímco rekombinantní hyaluronidáza z *E. coli* (EcHya) dosahovala pouze 20-30% aktivity nHya. Zároveň se na EcHya vázalo méně protilátek IgE ze séra pacientů alergických na včelí bodnutí oproti nativní i rekombinantní hmyzí hyaluronidáze. Hyaluronidáza získaná z hmyzích buněk i nHya obsahovaly 4 N-acetylglukosaminy na protein, zatímco EcHya glykosylována nebyla. V obou systémech byl přítom obdobný výtěžek proteinu, takže v tomto případě je výhodnost hmyzího systému zcela zjevná.

V prokaryotním i eukaryotním systému byl exprimován antihemostaticky působící protein izolovaný ze slinných žláz ováda rodu *Chrysops* (Reddy a kol., 2000). Tento protein, nazývaný chrysoptin, je inhibítozem ADP indukovaného shlukování krevních destiček.

Nativní chrysoptin byl izolován a purifikován pomocí HPLC. Rekombinantní protein byl exprimován v hmyzích (Sf21) buňkách. Molekulová hmotnost nativního i rekombinantního proteinu byla podle postavení na elektroforetickém gelu i podle absorbance stanovena na 65 kDa. Z nukleotidové sekvence byla ale očekávána o 6 kDa menší hmotnost proteinu. Za rozdíl v hmotnosti může být zodpovědná předpokládaná N-glykosylace chrysoptinu. Pro ověření funkce 5 potenciálních N-glykosylačních míst byl na místo jednotlivých asparaginů vnášen alanin. Mutace jednoho asparaginu neměla na aktivitu proteinu žádný vliv. Naproti tomu, substituce ve všech potenciálních N-glykosylačních místech najednou vedla ke ztrátě aktivity chrysoptinu. Z těchto výsledků je pravděpodobné, že cukerná složka tohoto glykoproteinu je nezbytná pro jeho aktivitu. Tomu odpovídá i to, že pokud byl chrysoptin exprimován v hmyzích buňkách, tak vykazoval aktivitu srovnatelnou s nativním chrysoptinem, zatímco expresí chrysoptinu v bakterii *E. coli* byl získán zcela neaktivní protein. To, že v prokaryotním expresním systému byl vyroben nefunkční produkt může být ale dáno i chybným sbalením proteinu v bakterii. To může, ale také nemusí, být způsobeno chybějící glykosylací. Rekombinantní chrysoptin exprimovaný v hmyzích buňkách je schopen inhibovat agregaci trombocytů indukovanou ADP, kolagenem nebo trombinem. Chrysoptin pravděpodobně interaguje s receptorem pro fibrinogen na krevních destičkách a brání tak vazbě fibrinogenu. Skutečnost, že antigeny vyrobené v eukaryotickém expresním systému odpovídají ve svých vlastnostech nativním proteinům lépe, byla popsána i u klíštěcích proteinů. Rekombinantní glykoprotein klíštěte *Boophilus microplus*, exprimovaný v kvasince *Pi. pastoris*, vyvolával silnější imunitní odpověď než neglykosylovaný protein (de la Fuente a kol., 2006).

Některá prokaryota jsou schopna syntetizovat glykany eukaryotického typu. Glykosylační systém těchto bakterií může být přenesen do *E. coli*, jak bylo prvně prokázáno v práci Wacker a kol. (2002). Autoři přenesli N-glykosylační systém patogenní bakterie *Campylobacter jejuni* do *E. coli*, která díky tomu získala schopnost syntézy N-glykanů. Tento výsledek naznačuje teoretickou možnost využití expresního systému transgenní *E. coli* k výrobě glykosylovaných proteinů.

Eukaryotní expresní systémy zahrnují buněčné linie izolované z různých druhů živočichů, rostlin a hub. Z nižších eukaryot se k expresi rekombinantních proteinů nejčastěji využívá kvasinek. Výhodou je jejich jednoduchá kultivace, relativně nízká cena, rychlý růst a vysoké výtěžky. Na rozdíl od bakterie *E. coli* jsou kvasinky schopny sekrece rekombinantních proteinů do média (Yin a kol., 2007). Kvasinky jsou také schopny post-translačních modifikací proteinů, a to včetně glykosylace. N- i O-glykany kvasinek jsou ale na rozdíl od

vyšších eukaryot tvořeny především manosou. Kvasinka navíc může O-glykosylovat i protein, který v nativních buňkách glykosylován není, a jako O-glykosylační místa může rozeznávat jiné threoniny a seriny než ty, které jsou glykosylovány v nativním proteinu (Cregg a kol., 2000). Nejčastěji se využívají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Pi. pastoris*. Z vyšších eukaryot jsou hojně využívány hmyzí a savčí buňky. Expresní systém hmyzích buněk je založen na infekci těchto buněk rekombinantním bakulovirem. Výhodou tohoto systému oproti savčímu je jeho relativní jednoduchost, bezpečnost, rychlost a vysoká produktivita. Nevýhodou oproti kvasinkovému a prokaryotnímu systému není jen vyšší cena, ale i nemožnost kontinuální kultivace hmyzích buněk infikovaných bakulovirem. Nejčastěji se využívá buněk Sf9 získaných z housenky motýla *Spodoptera frugiperda* (Altmann a kol. 1999; Tomiya a kol. 2004; Yin a kol., 2007). Savčí expresní systém využívá nejsložitější technologie, je nejpomalejší a nejdražší. Zároveň u tohoto systému hrozí nebezpečí kontaminace exprimovaných proteinů zvířecími viry. Běžně se používají savčí buňky izolované z ledvin kočkodana zeleného (*Chlorocebus sabaues*, COS buňky) infikované opičím virem SV40 (Yin a kol., 2007). Rekombinantní protein exprimovaný savčími buňkami má často větší molekulovou hmotnost než protein exprimovaný v hmyzích buňkách (Altmann a kol., 1999). To může být mimo jiné způsobeno i odlišnou strukturou glykanů. Příkladem může být exprese výše zmíněného rekombinantního slinného glykoproteinu *T. infestans* (rTiSP14,6) v savčím expresním systému. V savčích buňkách zřejmě došlo k jiné glykosylaci než u nativního proteinu. Molekulová hmotnost rTiSP14,6 odhadnutá podle jeho polohy v elektroforetickém gelu totiž odpovídá 28 kDa, zatímco nativní protein se pohybuje kolem 14 kDa. Po deglykosylaci rTiSP14,6 N-glykosidázou F byl získán protein o molekulové hmotnosti odpovídající nativnímu proteinu. Jelikož antigenní vlastnosti rTiSp14,6 a nativního 14 kDa proteinu si odpovídají, je možné, že za jejich imunogenicitu je v tomto případě odpovědná spíše proteinová část molekuly (Schwarz a kol., 2009b).

Srovnáním všech výše popsaných expresních systémů se zabývá práce Morton a Potter (2000). Exprimovaným glykoproteinem byla jaterní karboxylesteráza králíka. Protein exprimovaný v *E. coli* dosahoval malé nebo žádné enzymatické aktivity, což může být způsobeno mimo jiné i tím, že byl exprimován převážně v nerozpustné formě. Karboxylesteráza exprimovaná v *Saccharomyces cerevisiae* nebyla, na rozdíl od *Pi. pastoris*, enzymaticky aktivní. Expres v *Pi. pastoris* byla ale málo produktivní, vzniklý glykoprotein by dostačoval pouze pro biochemické studie. Pro strukturní analýzu se ukázala jako vhodnější exprese v hmyzích (Sf21) nebo savčích (COS7) buňkách. Největších výtěžků bylo dosaženo při použití hmyzího expresního systému.

6. Závěr

Ve své práci se zabývám glykoproteiny identifikovanými ve slinných žlázách krevsajících členovců. Jejich přítomnost byla detekována pomocí specifického barvení glykoproteinů separovaných na elektroforetickém gelu (ProQ Emerald) nebo inkubací s komerčně dostupnými lektiny. Třetí používanou možností byla detekce O- a N-glykosylačních míst (programy NetOGlyc a NetNGlyc) podle aminokyselinové sekvence glykoproteinu. Tato glykosylační místa jsou ovšem pouze potenciální, protein, který je obsahuje, nemusí být ve skutečnosti vůbec glykosylován. Glykoproteiny byly nejčastěji izolovány za využití afinitní chromatografie a složení jejich cukerné složky bylo charakterizováno pomocí různých kombinací lektinů. Kromě základních N- a O-glykosylací existují ještě další typy vazby sacharidového řetězce na protein, a to včetně S-glykosylace, která byla popsána teprve v roce 2011. V tělech členovců, a zřejmě i v obsahu jejich slinných žláz, však zřejmě převažují N-glykoproteiny.

Významnou část identifikovaných slinných glykoproteinů členovců tvoří muciny, jejichž funkcí je zřejmě lubrikace slinných kanálků a ústního ústrojí. Některé muciny mohou interagovat s proteiny hostitelské extracelulární matrix nebo působit antimikrobiálně. Několik slinných glykoproteinů krevsajících členovců je schopno modulovat imunitní odpověď hostitele nebo působit proti srážení krve.

Řada slinných glykoproteinů krevsajících členovců vyvolává u hostitelů protilátkovou odpověď. Antigenní glykoproteiny se proto jeví jako makromolekuly vhodné ke sledování expozice hostitelů jednotlivým druhům krevsajících členovců. K detekci protilátkové odpovědi hostitelů je vhodné využít rekombinantní glykoproteiny. Při expresi rekombinantních glykoproteinů je důležité si uvědomit, že složení jejich cukerné složky se liší nejen mezi prokaryoty a eukaryoty, ale i v rámci eukarot. Výrazné rozdíly ve struktuře glykanů lze nalézt např. mezi nižšími eukaryoty (jako jsou kvasinky) a hmyzem. Díky tomu se liší i úroveň glykosylace v různých expresních systémech pro syntézu rekombinantních glykoproteinů. Nevýhodou eukaryotních expresních systémů je jejich větší časová náročnost i finanční nákladnost. V několika studiích ale bylo prokázáno, že rekombinantní glykoprotein syntetizovaný v expresních systémech odvozených od buněčných linií vyšších eukaryot odpovídal ve svých vlastnostech lépe nativnímu hmyzímu, či savčímu proteinu, než protein exprimovaný v systému odvozeném od prokaryotních, či kvasinkových buněk.

7. Seznam použité literatury

- Abu-Qarn M., Eichler J., Sharon N. (2008). Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Current Opinion in Structural Biology*, 18: 544-550.
- Allen A.K., Desai N.N., Neuberger A. (1978). Properties of potato lecithin and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochemical Journal*, 171: 665-674.
- Altmann F., Staudacher E., Wilson I.B.H., März L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, 16: 109-123.
- Alves-Silva J., Ribeiro J.M.C., Abbeele Van Den J., Attardo G., Hao Z., Haines L.R., Soares M.B., Berriman M., Aksoy S., Lehane M.J. (2010). An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics*, 11: e213.
- Anatriello E., Ribeiro J.M.C., de Miranda-Santos I.K.F., Brandão L.G., Anderson J.M., Valenzuela J.G., Maruyama S.R., Silva J.S., Ferreira B.R. (2010). An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*, 11: e450.
- Andersen J.F., Hinnebusch B.J., Lucas D.A., Conrads T.P., Veenstra T.D., Pham V.M., Ribeiro J.M.C. (2007). An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). *BMC Genomics*, 8: e102.
- Andersen J.F., Pham V.M., Meng Z., Champagne D.E., Ribeiro J.M.C. (2009). Insight into the sialome of the black fly, *Simulium vittatum*. *Journal of Proteome Research*, 8: 1474-1488.
- Anderson J.M., Oliviera F., Kamhawi S., Mans B.J., Reynoso D., Seitz A.E., Lawyer P., Garfield M., Pham M.V., Valenzuela J.G. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, 7: e52.
- Andrews L., Laughinghouse A., Sina B.J. (1997). Lectin binding characteristics of male and female salivary gland proteins of *Anopheles gambiae*: identification and characterization of female specific glycoproteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 159-166.
- Arcà B., Lombardo F., Francischetti I.M.B., Pham V.M., Mestres-Simon M., Andersen J.F., Ribeiro J.M.C. (2007). An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 107-127.
- Arcà B., Lombardo F., Valenzuela J.G., Francischetti I.M.B., Marinotti O., Coluzzi M., Ribeiro J.M.C. (2005). An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 3971-3986.
- Assumpção T.C.F., Francischetti I.M.B., Andersen J.F., Schwarz A., Santana J.M., Ribeiro J.M.C. (2008). An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 213-232.

- Barral A., Honda E., Caldas A., Costa J., Vinhas V., Rowton E.D., Valenzuela J.G., Charlab R., Barral-Netto M., Ribeiro J.M.C. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 740-745.
- Bishop J.V., Mejia J.S., Pérez de León A.A., Tabachnick W.J., Titus R.G. (2006). Salivary gland extracts of *Culicoides sonorensis* inhibit murine lymphocyte proliferation and NO production by macrophages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 532-536.
- Bobrowicz P., Davidson R.C., Li H., Potgieter T.I., Nett J.H., Hamilton S.R., Stadheim T.A., Miele R.G., Bobrowicz B., Mitchell T., Rausch S., Renfer E., Wildt S. (2004). Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology*, 14: 757-766.
- Brooks S.A. (2004). Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. *Molecular Biotechnology*, 28: 241-255.
- Calvo E., Dao A., Pham V.M., Ribeiro J.M.C. (2007). An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 164-175.
- Campbell C.L., Vandyke K.A., Letchworth G.J., Drolet B.S., Hanekamp T., Wilson W.C. (2005). Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Insect Molecular Biology*, 14: 121-136.
- Clements A.N. (2000). *The Biology of Mosquitoes, Volume 1*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 511pp.
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 23-52.
- de Beer T., Vliegenthart J.F.G., Löffler A., Hofsteenge J. (1995). The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase U_s is α -mannopyranose. *Biochemistry*, 34: 11785-11789.
- de la Fuente J., Canales M., Kocan K.M. (2006). The importance of protein glycosylation in development of novel tick vaccine strategies. *Parasite Immunology*, 28: 687-688.
- Dhar R., Kumar N. (2003). Role of mosquito salivary glands. *Current Science*, 85: 1308-1313.
- Doucey M.-A., Hess D., Cacan R., Hofsteenge J. (1998). Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichol-phosphate-mannose as a precursor. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 291-300.
- Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Le Mire J., Dos-Santos M.A., Sow C.S., Cornélie S., Foumane V., Toto J.C., Sembene M., Boulanger D., Simondon F., Fortes F., Carnevale P., Remoue F. (2010). Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-

- treated nets in malaria vector control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 115-121.
- Francischetti I.M.B., Calvo E., Andersen J.F., Pham V.M., Favreau A.J., Barbian K.D., Romero A., Valenzuela J.G., Ribeiro J.M.C. (2010). Insight into the sialome of the bed bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Proteome Research*, 9: 3820-3831.
- Francischetti I.M.B., Mans B.J., Meng Z., Gudderra N., Veenstra T.D., Pham V.M., Ribeiro J.M.C. (2008b). An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 1-21.
- Francischetti I.M.B., Meng Z., Mans B.J., Gudderra N., Hall M., Veenstra T.D., Pham V.M., Kotsyfakis M., Ribeiro J.M.C. (2008a). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *Journal of Proteomics*, 71: 493-512.
- Fukuda M. (2000). Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. In: Fukuda M, Hindsgaul O. (Eds.). *Molecular and cellular glycobiology*. Oxford University Press Inc., New York, USA. 1-61.
- Gage K.L. (2004). Fleas, the Siphonaptera. In: Marquardt W.C., Black IV W.C., Freier J.E., Hagedorn H.H., Hemingway J., Higgs S., James A.A., Kondratieff B., Moore C.G. (Eds.). *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. 77-92.
- Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
- Grubhoffer L., Dusbábek F. (1991). Lectin binding analysis of *Argas polonicus* tissue glycoproteins. *Veterinary Parasitology*, 38: 235-247.
- Gustafson G.L., Milner L.A. (1980). Occurrence of N-acetylglucosamine-1-phosphate in Proteinase I from *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 255: 7208-7210.
- Hansen J.E., Lund O., Tolstrup N., Gooley A.A., Williams K.L., Brunak S. (1998). NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconjugate Journal*. 15: 115-130.
- Harris R.J., Leonard C.J., Guzzeta A.W., Spellman M.W. (1991). Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry*, 30: 2311-2314.
- Haynes P.A. (1998). Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, 8: 1-5.
- Hofinger E.S.A., Spickenreither M., Oschmann J., Bernhardt G., Rudolph R., Buschauer A. (2007). Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. *Glycobiology*, 17: 444-453.

- Hostomská J., Volfová V., Mu J., Garfield M., Rohoušová I., Volf P., Valenzuela J.G., Jochim R.C. (2009). Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. BMC Genomics, 10: e282.
- Chmelař J., Anderson J.M., Mu J., Jochim R.C., Valenzuela J.G., Kopecký J. (2008). Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. BMC Genomics, 9: e233.
- Ilg T., Overath P., Ferguson M.A.J., Rutherford T., Campbell D.G., McConville M.J. (1994). O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. The Journal of Biological Chemistry, 269: 24073-24081.
- Jariyapan N., Baimai V., Poovorawan Y., Roytrakul S., Saeung A., Thongsahuan S., Suwannamit S., Otsuka Y., Choochote W. (2010). Analysis of female salivary gland proteins of the *Anopheles barbirostris* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitology Research, 107: 509-516.
- Jobling B., Lewis D.J. (1987). Anatomical drawings of biting flies. British Museum (Natural History), London, UK. 119pp.
- Julenius K., Mølgaard A., Gupta R., Brunak S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Glycobiology, 15: 153-164.
- Kato H., Jochim R.C., Gomez E.A., Sakoda R., Iwata H., Valenzuela J.G., Hashiguchi Y. (2010). A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. Infection, Genetics and Evolution, 10: 184-191.
- Kelly W.G., Hart G.W. (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: Localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. Cell, 57: 243-251.
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annual Review of Biochemistry, 54: 631-664.
- Krieg J., Gläsner W., Vicentini A., Doucey M.-A., Löffler A., Hess D., Hofsteenge J. (1997). C-mannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. The Journal of Biological Chemistry, 272: 26687-26692.
- Krieg J., Hartmann S., Vicentini A., Gläsner W., Hess D., Hofsteenge J. (1998). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. Molecular Biology of the Cell, 9: 301-309.
- Lidholt K., Riesenfeld J., Jacobsson K.G., Feingold D.S., Lindahl U. (1988). Biosynthesis of heparin. Modulation of polysaccharide chain length in a cell-free system. Biochemical Journal, 254: 571-578.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000). Molecular cell biology, 4th edition. W.H. Freeman and Company, New York, USA. 1084pp.
- Lommel M., Strahl S. (2009). Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans.

Glycobiology, 19: 816-828.

- Mařha V., Weiser J., Soldán T., Švec P., Weyda F. (1986). Isolation of tsetse fly salivary gland antigens by affinity chromatography on purified IgG from exposed rabbits. *Acta entomologica bohemoslovaca*, 83: 321-326.
- McKenna R.V., Riding G.A., Jarmey J.M., Pearson R.D., Willadsen P. (1998). Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, 20: 325-336.
- Mejia J.S., Bishop J.V., Titus R.G. (2006). Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? *Trends in Parasitology*, 22: 367-370.
- Montero-Solis C., Gonzalez-Ceron L., Rodriguez M.H., Cirerol B.E., Zamudio F., Possanni L.D., James A.A., de la Cruz Hernandez-Hernandez F. (2004). Identification and characterization of gp65, a salivary-gland-specific molecule expressed in the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Insect Molecular Biology*, 13: 155-164.
- Morton C.L., Potter P.M. (2000). Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. *Molecular Biotechnology*, 16: 193-202.
- Munte C.E., Gäde G., Domogalla B., Kremer W., Kellner R., Kalbitzer H.R. (2008). C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect *Carausius morosus*. *FEBS Journal*, 275: 1163-1173.
- Nishimura H., Kawabata S., Kisiel W., Hase S., Ikenaka T., Takao T., Shimonishi Y., Iwanaga S. (1989). Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl₂-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 20320-20325.
- Oman T.J., Boettcher J.M., Wang H., Okalibe X.N., van der Donk W.A. (2011). Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chemical Biology*, 7: 78-80.
- Pérez de León A.A., Lloyd J.E., Tabachnick W.J. (1994). Sexual dimorphism and developmental change of the salivary glands in adult *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 31: 898-902.
- Piller F., Piller V. (1993). Structural characterization of mucin-type O-linked oligosaccharides. In: Fukuda M., Kobata A. (Eds.). *Glycobiology: A practical Approach*. Oxford University Press Inc., New York, USA. 291-328.
- Prates D.B., Santos L.D., Miranda J.C., Souza A.P.A., Palma M.S., Barral-Netto M., Barral A. (2008). Changes in amount of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *Journal of Medical Entomology*, 45: 409-413.
- Reddy V.B., Kouniga K., Mariano F., Lerner E.A. (2000). Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 15861-15867.

- Reid K.B.M. (1979). Complete amino acid sequences of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochemical Journal*, 179: 367-371.
- Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J.P., Boulanger D., Simondon F. (2006). Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 363-370.
- Ribeiro J.M.C, Francischetti I.M.B. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48: 73–88.
- Ribeiro J.M.C., Alarcon-Chaidez F., Francischetti I.M.B., 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 111-129.
- Ribeiro J.M.C., Charlab R., Pham V.M., Garfield M., Valenzuela J.G. (2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 543-563.
- Ribeiro J.M.C., Mans B.J., Arcà B. (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 767-784.
- Russell C.L, Heesom K.J., Arthur C.J., Helps C.R., Mellor P.S., Day M.J., Torsteinsdottir S., Björnsdóttir T.S., Wilson A.D. (2009). Identification and isolation of cDNA clones encoding the abundant secreted proteins in the saliva proteome of *Culicoides nubeculosus*. *Insect Molecular Biology*, 18: 383-393.
- Santos A., Ribeiro J.M.C., Lehane M.J., Gontijo N.F., Veloso A.B., Sant'Anna M.R.V., Araujo R.N., Grisard E.C., Pereira M.H. (2007). The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 702-712.
- Schwartz B.S., Ford D.P., Childs J.E., Rothman N., Thomas R.J. (1991). Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *American Journal of Epidemiology*, 134: 86-95.
- Schwartz B.S., Ribeiro J.M.C, Goldstein M.D. (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiological tool in Lyme disease research. *American Journal of Epidemiology*, 132: 58-66.
- Schwarz A., Helling S., Collin N., Teixeira C.R., Medrano-Mercado N., Hume J.C.C. Assumpção T.C., Marcus K., Stephan C., Meyer H.E., Ribeiro J.M.C., Billingsley P.F., Valenzuela J.G., Sternberg J.M., Schaub G.A. (2009b). Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of Triatomines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3: e532.
- Schwarz A., Medrano-Mercado N., Billingsley P.F., Schaub G.A., Sternberg J.M. (2010). IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early

- biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal for Parasitology*, 40: 1295-1302.
- Schwarz A., Sternberg J.M., Johnston V., Medrano-Mercado N., Anderson J.M., Hume J.C.C., Valenzuela J.G., Schaub G.A., Billingsley P.F. (2009a). Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal for Parasitology*, 39: 1021-1029.
- Seppo A., Tiemeyer M. (2000). Function and structure of *Drosophila* glycans. *Glycobiology*, 10: 751-760.
- Skallová A., Iezzi G., Ampenberger F., Kopf M., Kopecký J. (2008). Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *The Journal of Immunology*, 180: 6186-6192.
- Soldatova L.N., Crameri R., Gmachl M., Kemeny D.M., Schmidt M., Weber M., Mueller U.R. (1998). Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101: 691-698.
- Souza A.P., Andrade B.B., Aquino D., Entringer P., Miranda J.C., Alcantara R., Ruiz D., Soto M., Teixeira C.R., Valenzuela J.G., de Oliveira C.I., Brodskyn C.I., Barral-Netto M., Barral A. (2010). Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4: e649.
- Stepper J., Shastri S., Loo T.S., Preston J.C., Novak P., Man P., Moore C.H., Havlíček V., Patchett M.L., Norris G.E. (2011). Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Letters*, 585: 645-650.
- Teixeira C., Gomes R., Collin N., Reynoso D., Jochim D., Oliviera F., Seitz A., Elnaiem D.E., Caldas A., de Souza A.P., Brodskyn C.I., de Oliveira C.I., Mendonca I., Costa C.H.N., Volf P., Barral A., Kamhawi S., Valenzuela J.G. (2010). Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4: e638.
- Titus R.G., Bishop J.V., Mejia J.S. (2006). The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 28: 131-141.
- Tomiya N., Narang S., Lee Y.C., Betenbaugh M. (2004). Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconjugate Journal*, 21: 343-360.
- Trimble R.B., Maley F., Chu F.K. (1983). GlycoProtein biosynthesis in yeast. protein conformation affects processing of high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and invertase. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 2562-2567.

- Trueheart J., Fink G.R. (1989). The yeast cell fusion protein FUS1 is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9916-9920.
- Uhlíř J., Grubhoffer L., Borský I., Dusbábek F. (1994). Antigens and glycoproteins of larvae, nymphs and adults of the tick *Ixodes ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8: 141-150.
- Valenzuela J.G. (2004). Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. In: Marquardt W.C., Black IV W.C., Freier J.E., Hagedorn H.H., Hemingway J., Higgs S., James A.A., Kondratieff B., Moore C.G. (Eds.). *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. 377-386.
- Valenzuela J.G., Charlab R., Mather T.N., Ribeiro J.M.C. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 18717-18723.
- Venugopal H., Edwards P.J.B., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M. (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, 50: 2748-2755.
- Volf P., Rohoušová I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology*, 122: 37-41.
- Volf P., Grubhoffer L., Hošek P. (1993). Characterization of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. *Veterinary Parasitology*, 47: 327-337.
- Volf P., Tesařová P., Nohýnková E. (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 251-256.
- Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Aebi M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 298: 1790-1793.
- Wilson I.B.H. (2002a). Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 569-577.
- Wilson I.B.H. (2002b). Functional characterization of *Drosophila melanogaster* peptide O-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/I N-acetylglucosaminyltransferase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 21207-21212.
- Yin J., Li G., Ren X., Herrler G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127: 335-347.