

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



## **Vlastnosti a funkce glykokalyxu cercárií motolic**

Features and functions of glycocalyx of trematode cercariae

Bakalářská práce

Jana Chaloupecká

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

2010

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli RNDr. Liboru Mikešovi Ph.D. za cenné připomínky, odbornou pomoc a trpělivost při psaní mé bakalářské práce. Dále děkuji celé laboratoři prof. Petra Horáka za možnost účastnit se výzkumu a celému kolektivu této laboratoře za vřelé přijetí. Velmi děkuji také své rodině za podporu při studiu.

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Libora Mikeše Ph.D., na základě uvedené literatury.

V Praze dne 9. 8. 2010

.....

Jana Chaloupecká

## Abstrakt

Motolice jsou parazité z kmene Platyhelminthes, kteří mají složité vývojové cykly zahrnující dva až čtyři hostitele. Tato práce se zaměřuje především na motolice čeledi Schistosomatidae. Jejich cercárie, které opouštějí mezihostitelského plže, aktivně penetrují kůži definitivního hostitele a transformují se na schistosomuly. Proces transformace doprovází odhození ocásku a vyprázdnění penetračních žláz cercárií. Během transformace prochází tělo cercárie četnými ultrastrukturálními a molekulárními změnami. Jednou z těchto změn je ztráta povrchového glykokalyxu, který představuje ochrannou vrstvu ve vodním prostředí. Na jeho odvrhování se pravděpodobně podílí proteolytické enzymy z penetračních žláz cercárií během průniku parazita do hostitele. Glykokalyx má specifické složení sacharidových molekul, které jsou vázány k lipidům nebo proteinům membrány tegumentu. Tato práce popisuje vznik, ultrastrukturu, sacharidové složení, funkce a mechanismus odvrhování glykokalyxu cercárií.

### Klíčová slova:

Motolice, *Schistosoma mansoni*, *Trichobilharzia*, glykokalyx, cercárie, schistosomulum, glykoprotein, glykolipid

## Abstract

Trematodes are parasites from phylum Platyhelminthes which have complex life cycles involving two to four hosts. This work focuses especially on trematodes of the family Schistosomatidae. Their cercariae which leave the snail intermediate host, actively penetrate the skin of definitive hosts and transform into schistosomula. This is accompanied by detachment of cercarial tail and emptying of penetration glands. During transformation, cercarial bodies undergo extensive ultrastructural and molecular changes. One of these changes is the loss of surface glycocalyx which represents a protective coat in the aquatic environment. In glycocalyx shedding, participation of proteolytic enzymes from cercarial penetration glands is expected during invasion of the host. Glycocalyx has specific composition of saccharide molecules which are bound to lipids or proteins on the membrane of cercarial tegument. This work describes the origin, ultrastructure, saccharide composition, function and shedding mechanism of cercarial glycocalyx.

### Key words:

Trematode, *Schistosoma mansoni*, *Trichobilharzia*, glycocalyx, cercaria, schistosomulum, glycoprotein, glycolipid

# Obsah

Abstrakt .....	2
1 Úvod .....	4
2 Charakteristika motolic čeledi Schistosomatidae.....	5
2.1 Ontogeneze schistosom .....	5
2.2 Povrch těla a transformace cercárie při penetraci .....	7
3. Glykokalyx .....	10
3.1 Sacharidové složení glykokalyxu .....	10
3.2 Glykosylace .....	15
3.2.1 N-glykosylace, N-glykany .....	16
3.2.2 O-glykosylace, O-glykany .....	17
3.2.3 Přichycení proteinů k membráně.....	18
3.3 Proteiny rozpoznávající sacharidy .....	18
3.3.1 Charakteristika lektinů .....	18
3.3.2 Využití lektinů.....	19
4 Glykokalyx cercárií schistosom .....	20
4.1 Vznik glykokalyxu cercárií schistosom .....	20
4.2 Ultrastruktura glykokalyxu cercárií schistosom .....	20
4.3 Molekulární složení glykokalyxu cercárií schistosom.....	22
4.3.1 O-glykany.....	25
4.3.2 N-glykany.....	27
4.3.3 Glykolipidy.....	28
4.3.4 Lewis X antigen .....	29
4.3.5 Biosyntéza glykokonjugátů .....	29
4.4 Funkce glykokalyxu cercárií schistosom .....	30
4.5 Odvrhování glykokalyxu cercárií při transformaci na schistosomuly .....	31
4.5.1 Mechanismus odvrhování glykokalyxu .....	31
4.5.2 Molekuly podílející se na odvrhování glykokalyxu .....	32
5 Závěr.....	34
6 Použitá literatura .....	35
6.1 Literární zdroje .....	35
6.2 Internetové zdroje.....	40

# 1 Úvod

Motolice (Trematoda) jsou početnou třídou parazitických bezobratlých živočichů z kmene Platyhelminthes způsobujících závažná onemocnění jak z humánního, tak veterinárního hlediska (např. schistosomóza, fasciolóza). Motolice jsou schopné parazitovat ve všech orgánových soustavách, hlavně v trávicím systému, dýchacím systému, krevním řečišti, nervové soustavě a urogenitálním traktu. Jsou známy složitými vývojovými cykly, v jejichž průběhu vývojová stádia střídají velmi odlišná životní prostředí. Motolice se dokonale přizpůsobují odlišným podmínkám prostředí jak změnami ve fyziologických procesech, tak odlišnou stavbou povrchu těla. Kvůli velké variabilitě životních cyklů a s tím souvisejícími různými životními strategiemi cercárií je tato literární rešerše zaměřena na vlastnosti glykokalyxu cercárií motolic čeledi Schistosomatidae (výjimečně je uvedené srovnávání s motolicemi jiných čeledí). Tato čeleď je jednou z nejprozkoumanějších, protože někteří její zástupci způsobují schistosomózu – významné parazitární onemocnění člověka.

Výrazné změny prodělávají stádia žijící ve vodním prostředí a penetrující do meziphostitele nebo definitivního hostitele, u čeledi Schistosomatidae tedy miracidia a cercárie. Tato stádia se musí vyrovnat především se změnou osmotického potenciálu, přítomností imunitního systému hostitele a cercárie i se změnou teploty. Proto je tento přechod kritickým momentem v jejich vývoji. Významnou ochrannou bariérou mezi tělem miracidí a cercárií a vodním prostředím je mohutný povrchový glykokalyx. Je to vysoce antigenní struktura, a proto ji miracidia a cercárie při své penetraci do hostitele odvrhují, aby tak unikly imunitnímu systému hostitele.

Tato práce shrnuje dostupné informace o vzniku, ultrastruktuře, chemickém složení, funkcích a mechanismu svlékání glykokalyxu cercárií motolic, především čeledi Schistosomatidae. Velká většina použitých informací v této práci se týká druhu *Schistosoma mansoni*, který je asi nejvíce studovaným druhem z důvodu působení závažného lidského onemocnění (střevní schistosomózy).

## 2 Charakteristika motolic čeledi Schistosomatidae

Zástupci této čeledi jsou motolice s dvouhostitelskými životními cykly vázanými na vodu, kde mezihostiteli jsou vodní plži a definitivními hostiteli homoiotermní obratlovci, ptáci a savci. Ve většině případů se jedná o cizopasníky krevního systému, ale některé druhy žijí i v tkáních hostitele. Jejich protáhlé tělo může být až 20 mm dlouhé. Jsou to gonochoristické motolice s výrazným sexuálním dimorfizmem. Samičky bývají štíhlejší a delší v porovnání se samečkami. Podle lokalizace dospělců v definitivním hostiteli se zástupci rozdělují na druhy viscerální (obývající tkáň nebo cévy vnitřních orgánů) a nazální (žijící v tkáních nebo cévách okolo nosní dutiny).

Někteří zástupci této čeledi způsobují u lidí onemocnění zvané schistosomóza. Jsou to zástupci rodu *Schistosoma*, především *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi* a *S. intercalatum*. Podle Světové zdravotnické organizace je v současné době nakaženo nejméně 200 milionů lidí v 74 zemích světa a dalších více než 700 milionů lidí žije v místech s rizikem infekce (<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>). Mortalita způsobená touto nemocí se pohybuje okolo 200 tisíc úmrtí ročně (<http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>). Lidé mohou být nakaženi i zvířecími druhy schistosom, a to jak savčími (např. *S. bovis*, *S. margrebowiei*), tak ptačími (např. rod *Trichobilharzia*). Ptačí schistosomy nejsou schopné se po průniku do nescifického hostitele vyvinout v dospělé (Horák a kol. 2002). Opakované setkání imunitního systému hostitele s penetrujícími cercáriemi způsobuje zánětlivé kožní onemocnění, cercáriovou dermatitidu, které se projevuje jako svědivá vyrážka (Horák a kol. 2002).

### 2.1 Ontogeneze schistosom

Tato kapitola popisuje ontogenetický vývoj schistosom se zaměřením na vznik a vývoj cercárií a jejich transformaci na schistosomula po průniku do definitivního hostitele. Vajíčka schistosom odchází (s vyvinutým miracidium) z těla hostitele ve stolici nebo moči. Za optimálních podmínek, kterým je hlavně nízká osmotická hodnota vody, se miracidium líhne z vajíčka. Výjimkou je např. *Trichobilharzia regenti*, nazální druh, u kterého se miracidium líhne již v tkáních nosní dutiny hostitele, kde je izotonické prostředí (Horák a kol. 1998a). Uvolněné miracidium poté volně plave ve vodě, aktivně vyhledává svého mezihostitele a následně penetruje do jeho svalnaté nohy. Z miracidia se stává mateřská (primární) sporocysta, která je lokalizována v místě penetrace miracidia. Ze zárodečných buněk mateřských sporocyst vznikají dceřiné (sekundární) sporocysty, které putují tělem plže do hepatopankreatu, místa definitivní lokalizace.

Uvnitř dceřiných sporocyst ze zárodečných buněk vznikají další generace dceřiných sporocyst a později také stádia zvaná cercárie. Cercárie se vyvíjejí uvnitř tzv. zárodečných

komůrek dceřiných sporocyst. Cheng a Bier (1972) klasifikovali vývoj cercárií *Schistosoma mansoni* do 7 stádií (uvedeno v závorkách pod čísly 1-7). Po osídlení hepatopankreatu dceřinými sporocystami dochází uvnitř již zmíněné zárodečné komůrky k diferenciaci a dělení zárodečných buněk (1), následované vytvořením moruly (2). Morula se vyvíjí v tzv. „zárodečnou kouli“ (3). Na povrchu tohoto vývojového stádia se začíná vytvářet „primitivní epitel“, který podle Meuleman a Holzmann (1975) pochází z tegumentu dceřiných sporocyst. Pod tímto „primitivním epitelem“ se z periferních somatických buněk embrya cercárie, které se zvětšují a splývají, vytváří pravý tegument cercárií (pravděpodobně u stádia 5). Primitivní epitel poté degeneruje a ztrácí se z povrchu cercárie (Meuleman a Holzmann 1975). Postupně dochází k prodlužování zárodečné koule (4), která je posteriorním zúžením rozdělena do dvou odlišných částí (5). Ve větší anteriorní části se diferencují orgány těla cercárie, posteriorní část tvoří malý „pupen“ ocásku, který je dalším vývojem postupně prodlužován (6) až z něj vzniká vidličnatý ocásek. Výsledkem je kompletně vyvinutá cercárie (7), která opouští plže do vodního prostředí a infikuje definitivního hostitele.

Tělní část cercárie *S. mansoni* se transformuje po penetraci do definitivního hostitele na schistosomulum, které během migrace tělem hostitele dospívá. Ocásek cercárie slouží k pohybu ve vodním prostředí, při penetraci do hostitele je odhazován pomocí svalového límce, který je v zadní části těla. Obě tyto části cercárie jsou kryté tegumentem s velkým počtem trnů, který je ohraničený jednoduchou třívrstevnou membránou a relativně silným glykokalyxem (Morris 1971, Samuelson a Caulfield 1985, Horák a kol. 1998b, Dorsey a kol. 2002). Jako hlavní zdroj energie pro pohyb ve vodě, penetraci a transformaci cercárie *S. mansoni* využívají zásoby glykogenu nasyntetizované v mezihostiteli. Nemají funkční trávicí soustavu a nepřijímají potravu. Velikost zásob glykogenu ovlivňuje délku života cercárie po uvolnění z plže (Dorsey a kol. 2002).

Velmi důležitou součástí těl cercárií jsou jednobuněčné žlázy. Cercárie mají 5 párů penetračních žláz nazvaných podle polohy vůči břišní přísavce (acetabulu) – 2 páry preacetabulárních (circumacetabulárních) a 3 páry postacetabulárních žláz (Stirewalt a Kruidenier 1961). Obsahují látky umožňující přichycení, narušení povrchu těla hostitele a následnou první fázi migrace. Žlázy po vyprázdnění degenerují a v dalším vývoji neplní žádnou funkci (Cousin a kol. 1981).

Obsahem preacetabulárních žláz jsou mimo jiné serinové proteázy, např. 25-31 kDa cercariální elastáza u *Schistosoma mansoni* a *S. haematobium*, která štěpí epidermální a dermální proteiny jako je keratin, laminin, kolagen, elastin a fibronektin (McKerrow a kol. 1985, Salter a kol. 2000, McKerrow a Salter 2002). U jiných druhů se uplatňují cysteinové peptidázy typu katepsinu B a L, lokalizované v postacetabulárních žlázách. Katepsin L byl v postacetabulárních žlázách cercárií *S. mansoni* lokalizován jen na základě imunolokalizační

studie (Dalton a kol. 1997). Zatímco lokalizace katepsinu B byla potvrzena i molekulárními metodami. Byly popsány u *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* (Dalton a kol. 1997, Dvořák a kol. 2008), *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati* (Mikeš a kol. 2005, Kašný a kol. 2007, Dolečková a kol. 2009). Cysteinové peptidázy se nejspíše podílí na degradaci keratinu, kolagenu, fibronektinu, myelin basic proteinu, elastinu (Dalton a kol. 1997, Kašný a kol. 2007, Dolečková a kol. 2009). V obsahu postacetabulárních žláz *T. szidati* se také vyskytují lektiny se specifitou ke glykosaminoglykanům a  $\beta$ -1,3-glukanům (Horák a kol. 1997). Preacetabulárních žlázy obsahují relativně velké množství vápníku, který se patrně podílí na regulaci aktivity proteáz uvnitř žláz (Dresden a Edlin 1975, Modha a kol. 1998, Mikeš a kol. 2005). Cerkárie mají také jednobuněčnou hlavovou žlázu umístěnou mezi vývody penetračních žláz, která patrně obsahuje fosfolipidy a zřejmě slouží k opravě vnější membrány a vytváření sedmivrstevné membrány vyvíjející se schistosomuly (Dorsey 1976, Dorsey a kol. 2002).

Po úspěšném nalezení definitivního hostitele cercárií a přichycení se začíná proces penetrace. Penetrace je výsledkem spolupráce sekrečních a svalových procesů pod kontrolou nervového systému a má v zásadě 3 kroky (Haas a Schmidt 1982). Prvním krokem je přichycení cercárie na povrch kůže hostitele. Následuje plazení po povrchu kůže a hledání vhodného místa k penetraci do hostitele. Ve třetím kroku dochází k proniknutí do epidermis. Stimuly k prvnímu a druhému kroku jsou tepelného a chemického charakteru, ale u třetího kroku jen chemické povahy. Hlavními chemickými stimulanty penetrace jsou alifatické uhlovodíkové řetězce s polárními, ale i nepolárními skupinami, především nenasycené mastné kyseliny. Existují pouze drobné rozdíly v penetraci mezi jednotlivými druhy schistosom (Shiff a kol. 1972, Haas a Schmidt 1982).

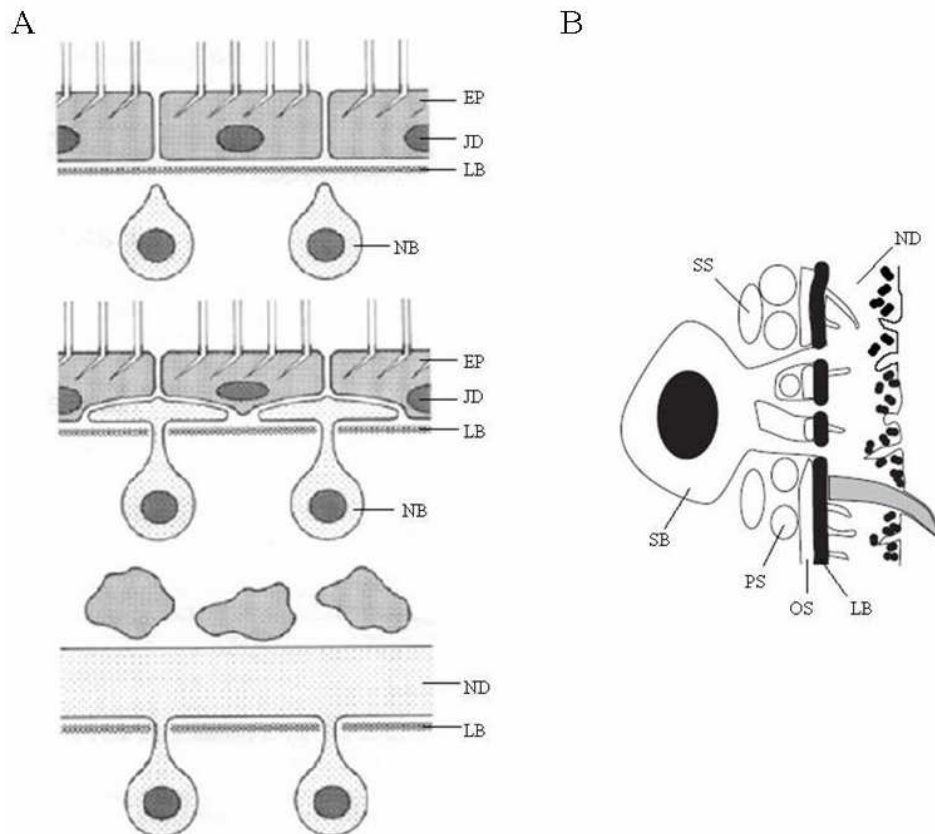
Penetrace indukuje transformaci cercárie na schistosomulum. Za možný stimul transformace lze považovat i zvýšení salinity z cca 18 mOsm sladké vody na 300 mOsm krve (Samuelson a Stein 1989), ale i změnu teploty z nižší hodnoty ve vodním prostředí na vyšší teplotu v těle hostitele (Wiest a kol. 1989). Během transformace dochází k strukturálním, fyziologickým a biochemickým změnám, a proto je tato část vývoje pro schistosomu kritická. Tyto změny umožňují přežití parazita uvnitř hostitele, kterými se mj. stává méně atraktivním pro imunitní systém hostitele. Nejdůležitější transformační změny se dějí během 3 hodin po penetraci (Wilson 1987).

## **2.2 Povrch těla a transformace cercárie při penetraci**

Povrch těla motolic je tvořen tegumentem (neodermis, Obr. 1B), který má řadu funkcí, jako např. trávení a přenos živin, ochrana proti imunitnímu systému hostitele a enzymům, osmoregulace, senzorická funkce, mechanická bariéra mezi organizmem a vnějším prostředím.



Tegument vzniká při přeměně miracidia na následující stádium (Obr. 1A). Povrch miracidia je pokryt pásy ciliárních buněk sloužícími k pohybu, mezi těmito buňkami jsou oblasti bez cilií – mezibuněčné valy. Při přeměně na další vývojové stádium kmenové buňky migrují do oblasti epitelu, přičemž část buněčných těl s jádry zůstává pod lamina basalis. Následně jsou ciliární buňky odvrženy a povrchová část původních kmenových buněk splývá a vytváří neodermis přítomnou ve všech následujících stádiích (Meuleman a kol. 1978).



Obr. 1. (A) Vznik neodermis přeměnou povrchového epitelu miracidia, EP – epiteliální ciliární buňka, JD – jádro buňky, LB – lamina basalis, NB – neoblast, kmenová buňka, ND – neodermis (převzato a upraveno dle Ax a kol. 1989). (B) Schématické znázornění povrchových struktur motolic podtřídy Digenea, ND – neodermis, LB – lamina basalis, OS – okružní podpovrchová svalovina, PS – podélná podpovrchová svalovina, SS – šikmá podpovrchová svalovina, SB – subtegumentální buňky (převzato a upraveno dle Tyler a Hooge 2004).

Součástí základní stavby tegumentu jsou: vnější cytoplazmatická membrána, jednoduchá nebo dvojitá, poskytující motolicím ochranu před vnějším prostředím a imunitními mechanizmy hostitele. Dvojitá membrána se vyskytuje u stádií motolic žijících v krevním řečišti (McLaren a Hockley 1977), např. čeledi Schistosomatidae. Dalšími částmi tegumentu jsou vnější bezjaderná vrstva cytoplazmy, cytoplazmatické spoje lemované mikrotubuly, které vybíhají z bezjaderné vrstvy, prostupují vrstvami lamina basalis a

podpovrchové svaloviny a napojující se na tzv. subtegumentální buňky („cytony“, „perikarya“) neboli buněčná těla s jádry. U motolic se často vyskytují tegumentální trny a výrazný glykokalyx. Celým tegumentem prostupují nervové buňky tvořící sensorické papily (Dorsey a kol. 2002). U jednotlivých vývojových stádií se může morfologie vnějších částí tegumentu odlišovat a stejně tak tloušťka glykokalyxu.

V průběhu transformace dochází k velkým změnám ve struktuře tegumentu (Hockley a McLaren 1973). Membránovité váčky putují ze subtegumentálních buněk cytoplazmatickými spoji do syncytia. Cytoplazmatické spoje jsou přítomné již v cercáriích, ale membránovité váčky jim chybí (Cousin a kol. 1981). Váčky se podílejí na vytváření zdvojené sedmivrstevné vnější cytoplazmatické membrány tegumentu, kterou mají jen schistosomuly a dospělci (Hockley a McLaren 1973, Horák a kol. 1998b). Poskytuje schistosomám ochranu před imunitním systémem hostitele. V průběhu života ji schistosomy obměňují a tím dochází např. ke svlékání navázaných protilátek (Wilson a Barnes 1977, Modha a kol. 1998). Velmi brzy po začátku transformace se vytváří na povrchu membrány mikroklky, které se prodlužují a brzy poté se z povrchu oddělují a tím se podílejí na svlékání glykokalyxu. (McLaren a Hockley 1976, Samuelson a Caulfield 1985).

V rámci transformace schistosoma přechází z aerobní respirace na anaerobní glykolýzu (Thompson a kol. 1984). Další změny doprovázející transformaci se týkají především zažívacího, osmoregulačního a reprodukčního systému, dochází např. ke ztrátě močového měchýře (Cousin a kol. 1981). Po dokončení transformace schistosomulum migruje převážně cévní nebo lymfatickou soustavou. V průběhu několika dní domigruje do plic, kde opustí cévní systém a zůstává v plicním alveolu, po určité době se vrací zpět do krevního řečiště, kterým je zanesena na místo definitivní lokalizace (kapiláry specifických orgánů), kde dochází k dokončení vývoje (výjimkou je např. *Trichobilharzia regenti*, která využívá k migraci do nazální oblasti nervovou soustavu (Horák a kol. 1999)).

### 3. Glykokalyx

Pojem glykokalyx je všeobecně používán pro tenký povrchový obal produkovaný samotnými buňkami, obsahující velké množství sacharidů (viz. dále) v podobě glykoproteinů, polysacharidů, proteoglykanů a glykolipidů, který se vyskytuje na extracelulárním části buněčné membrány mnoha typů buněk. Ve velké míře např. na povrchu některých bakterií, hub, epitelálních buněk, ale také na povrchu cercárií motolic. Glykokalyx poskytuje buňkám ochranu před mechanickým a chemickým poškozením. Mezi jeho další funkce patří např. schopnost buněk spojovat se mezi sebou a tím zabránit rozpadu tkání, také pomáhá spermiím rozpoznávat vajíčko při oplodnění. Glykokalyx jako vysoce antigenní struktura umožňuje imunitnímu systému rozpoznávat cizorodé organizmy, jejichž glykokalyx se ve svém složení liší od glykokalyxu těla vlastního. Stejně tak je to i se změnou vlastností glykokalyxu rakovinotvorných buněk. Dále např. ovlivňuje buněčnou permeabilitu a adhezi buňky. U některých bakterií brání glykokalyx fagocytóze, podílí se na tvorbě biofilmu a je zodpovědný za adhezi na povrchy, např. zubní sklovinu (Bennett 1963, Fawcett 1965, Roseman 2001).

#### 3.1 Sacharidové složení glykokalyxu

Sacharidy jsou v přírodě nejzastoupenější přírodní látky. Z chemického hlediska se dělí na aldosa nebo ketosa a podle počtu jednotek v molekule na monosacharidy (např. D-glukosa), oligosacharidy (do deseti jednotek, např. sacharosa) a polysacharidy (desítky, spíše tisíce jednotek, např. celuloza). Volné sacharidy jsou vysoce polární, biodegradabilní, chirální sloučeniny, dobře rozpustné ve vodě a prakticky nerozpustné v organických rozpouštědlech. Pro znázornění struktury sacharidů se používá několik druhů vzorců, např. Fischerovy, Harworthovy. V roztoku podléhají sacharidy tzv. mutarotaci (ustavení rovnováhy mezi formou acyklickou a pětičlenným – furanóza a šestičlenným kruhem – pyranóza).  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -anomery jsou diastereoizomery, které vznikají při reakci hydroxylové skupiny v poloze 4 nebo 5 s karbonylovou skupinu v poloze 1, v této poloze vzniká nové stereogenní centrum.

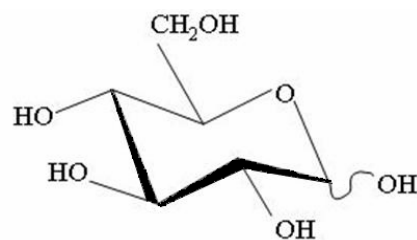
Sacharidy vytvářejí velmi rozmanité struktury, kromě lineárních oligomerů mohou tvořit i rozvětvené struktury, které nejsou jinak v biologickém systému běžné. Sacharidy jsou konformačně flexibilní, důležitá je zejména volná rotace kolem glykosidové vazby. Sacharidy plní funkci informačního systému, umožňují buněčnou komunikaci, která je založená na interakci receptoru s informačním glykopolymerem. Mezi ideální informační biopolymery patří sacharidy především díky velkému množství možných izomerů, které se např. liší konfigurací pyranóza/furanóza,  $\alpha/\beta$  anomerů, počtem míst pro přichycení dalšího sacharidu. Teoreticky by mohlo 20 monosacharidů poskytnout  $>6 \cdot 10^6$  lineárních struktur a okolo  $3 \cdot 10^6$  větvených struktur trisacharidů, zatímco 20 aminokyselin pouze 8 tisíc (Laine 1997).

## Nejběžnější sacharidy glykokalyxu

### D-glukosa (Glc)

Glc je aldohexosa s redukujícími účinky a chemickým vzorcem  $C_6H_{12}O_6$  (Obr. 2). Molekula glukosy se vyskytuje ve dvou stereoizomerech (pravotočivá a levotočivá forma), ale jen D-glukosa hraje důležitou roli v biologii. Vyskytuje se převážně v pyranózové cyklické formě. Glc je využívána buňkami především jako zdroj energie.

Glc může být přeměněna na jiné monosacharidy (např. galaktosu) nebo jejich deriváty (např. kyselinu glukuronovou). Glc je součástí řady oligosacharidů (např. maltosy, sacharosy, Gal), polysacharidů (např. škrobu, glykogenu, celulosy, glukanů), glykoproteinů a glykolipidů (Robyť 1998).

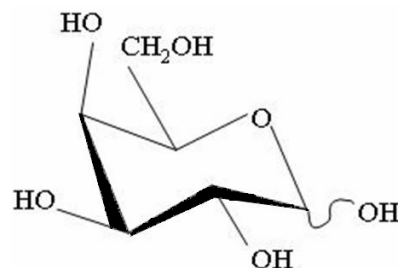


Obr. 2. Chemická struktura Glc.

### D-galaktosa (Gal)

Gal je hexosa s aldehydovou skupinou (aldohexosa) s chemickým vzorcem  $C_6H_{12}O_6$  (Obr. 3). Je diastereoizomerem glukosy odlišujícím se konfigurací na uhlíku ve 4. pozici. Vyskytuje se v lineární i cyklické formě. Čtyři izomery Gal jsou cyklické, dva s pyranózovým kruhem a dva s furanózovým.

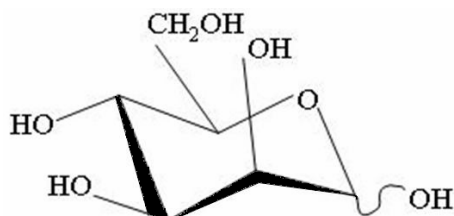
Gal má v přírodě velké rozšíření, jejím nejvýznamnějším zdrojem je laktosa neboli mléčný cukr, který je součástí mateřského mléka. Gal a její deriváty (L-fukosa, galaktosamin, N-acetylgalaktosamin) jsou běžnou složkou oligosacharidů, polysacharidů, glykoproteinů a glykolipidů. Mezi známé patří např. agar – rostlinný polysacharid, galaktan, který se nachází v hemicelulose, rafinosa, cerebrosidy a gangliosidy, které se vyskytují ve vnější vrstvě plazmatické membrány (Roseman 2001, Sunehag a kol. 2003).



Obr. 3. Chemická struktura Gal.

### D-manosa (Man)

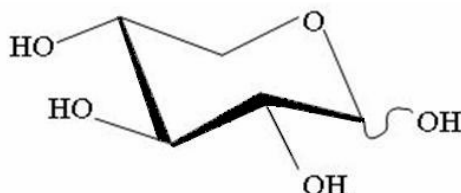
Man je stejně jako Gal aldohexosou s chemickým vzorcem  $C_6H_{12}O_6$  (Obr. 4). Je také stereoizomerem D-glukosy, od které se liší konfigurací na uhlíku ve 2. pozici. I když se jedná o jednoduché chemické změny, mají za následek různé chemické a fyzikální vlastnosti. Je dalším z biologicky významných monosacharidů, který je součástí mnoha polysacharidů (např. mananu) a glykokonjugátů (Roseman 2001).



Obr. 4. Chemická struktura Man.

### D-Xylosa (Xyl)

Xyl je monosacharid s pěti atomy uhlíku a aldehydovou funkční skupinou (aldopentosa), s chemickým vzorcem  $C_5H_{10}O_5$  (Obr. 5). Disacharidy vznikající z monosacharidů Xyl mají redukující vlastnosti. Xyl je součástí některých polysacharidů a proteoglykanů, z polysacharidů je to např. xylan, arabinoxylan, xyloglukan a z proteoglykanů je to především heparan sulfát a chondroitin sulfát, u kterých jsou některé seriny glykosylovány Xyl v Golgiho aparátu (Buskas a kol. 2006).



Obr. 5. Chemická struktura Xyl.

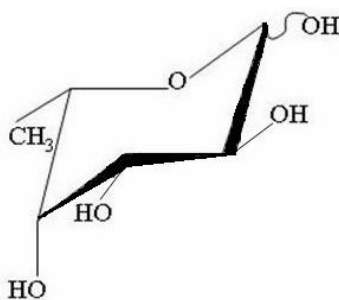
### L-fukosa (L-Fuc)

L-Fuc neboli 6-deoxy-L-galaktosa s chemickým vzorcem  $C_6H_{12}O_5$  (Obr. 6) je monosacharid přítomný v glykokonjugátech, jako jsou glykoproteiny a glykolipidy, objevující se v celé řadě organismů. Dvě strukturální vlastnosti odlišují Fuc od jiných běžně se vyskytujících hexos: postrádá hydroxylovou skupinu na uhlíku v 6. pozici a vyskytuje se v L-konfiguraci (Becker a Lowe 2003).

Ve fukosylovaných glykokonjugátech se L-Fuc nejvíce vyskytuje v  $\alpha$ -anomerické konfiguraci. Nejčastěji bývá přítomná na koncích sacharidových řetězců, kde bývá odštěpována fukosidázami, ale poměrně nedávno byla objevena glykosyltransferáza schopná připojovat sacharidy přímo k L-Fuc (Moloney a Haltiwanger 1999).

Glykolipidy a glykoproteiny, které obsahují L-Fuc, mají řadu biologických funkcí. Patří mezi ně důležitá úloha v mezibuněčné komunikaci, jako receptorů buněčného povrchu a

růstových regulátorů. Jsou antigenními determinanty a jsou nepostradatelné pro správnou funkci imunitního systému (Benešová a kol. 2005).

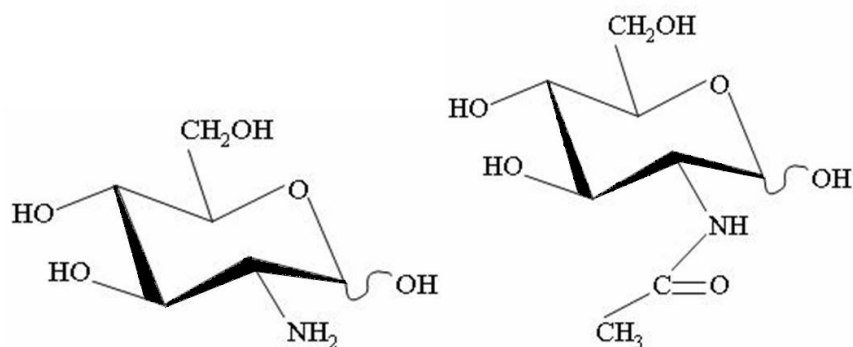


Obr. 6. Chemická struktura L-Fuc.

### D-glukosamin, N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc)

D-glukosamin (2-amino-2-deoxy-D-glukosa) je aminosacharid s chemickým vzorcem  $C_6H_{13}NO_5$  (Obr. 7). Je odvozený od Glc, na uhlíku v 2. pozici je hydroxylová skupina (OH) nahrazena aminovou skupinou ( $NH_2$ ), která může být acetylovaná za vzniku GlcNAc (N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glukosa), který má chemický vzorec  $C_8H_{15}NO_6$ . Glukosamin 6-P je prekurzorem všech sacharidů v jejichž struktuře je obsažen dusík (Roseman 2001).

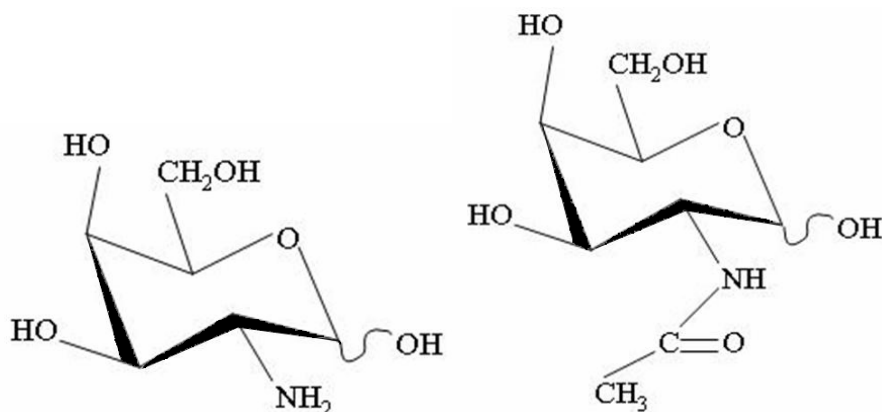
D-glukosamin i GlcNAc jsou složkami polysacharidů (glykosaminoglykanů), proteoglykanů a glykolipidů. Mezi polysacharidy obsahující GlcNAc a glukosamin patří chitosan a chitin, který vytváří exoskelet hmyzu, koryšů a buněčnou stěnu hub. Chitin je polysacharid složený z podjednotek GlcNAc spojených  $\beta$ -(1,4) glykosidickou vazbou. GlcNAc je součástí bakteriální buněčné stěny, společně s N-acetylmuramovou kyselinou (MurNAc) vytváří tzv. peptidoglykan a s kyselinou glukuronovou vytváří kyselinu hyaluronovou, která je součástí mezibuněčné hmoty pojivových, epiteliálních a nervových tkání (Pollard a kol. 2008).



Obr. 7. Chemická struktura D-glukosaminu a GlcNAc.

### D-galaktosamin, N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc)

D-galaktosamin (2-amino-2-deoxy-D-galaktosa), derivát galaktosy, je aminosacharid s chemickým vzorcem  $C_6H_{13}NO_5$  (Obr. 8). Tvoří součást některých glykoproteinů a hormonů (folikulo-stimulační a luteinisační hormon).  $NH_2$  skupina D-galaktosaminu může být acetylovaná, čímž vzniká GalNAc (N-acetyl-2-amido-2-deoxy-D-galaktosa) s chemickým vzorcem  $C_8H_{15}NO_6$ , ale také methylovaná nebo sulfonovaná (Rao 1998).



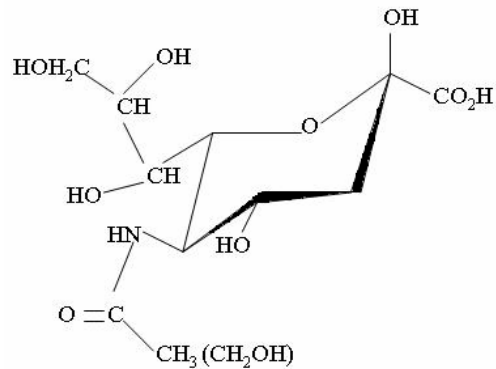
Obr. 8. Chemická struktura D-galaktosaminu a GalNAc.

### Kyseliny sialové (Sia)

Sia jsou rodinou monosacharidů, která má okolo 50 členů. Jsou to deriváty neuraminové kyseliny nebo-li 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonové kyseliny. Jednotlivé deriváty se liší v substituentech na aminových a hydroxylových skupinách neuraminové kyseliny. Amino skupiny mohou být acetylované nebo glykolylované. Mezi substituenty hydroxylové skupiny patří acetyl, laktyl, fosforyl, methyl a sulfát. Sia jsou negativně nabitě kyselé monosacharidy vyskytující se především u vyšších živočichů a některých mikroorganismů. Mezi nejčastěji se vyskytující Sia patří N-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac) (Obr. 9), N-glukolyneuraminová kyselina (Neu5Gc) (Obr. 9) a N-acetyl-9-O-acetylneuraminová kyselina (Neu5-9Ac<sub>2</sub>) (Schauer 2004).

Sia se běžně vyskytují v oligosacharidech, polysacharidech (polysialové kyseliny), glykoproteinech, gangliosidech a lipopolysacharidech, kde jsou často terminální částí oligosacharidových řetězců na vnějších buněčných membránách. Negativní náboj Sia umožňuje vázbu a transport pozitivně nabitých molekul, přispívá k anti-proteolytickému efektu Sia na glykoproteinech a inhibuje působení některých endoglykosidáz (Schauer 2004).

Sia snadno interagují se složkami jiných buněčných povrchů, extracelulárními látkami a efektorovými molekulami, účastní se řady buněčných signalizačních událostí. Sia se podílejí na maskování specifických center molekul a buněk. Na druhé straně jsou součástí receptorových struktur, které jsou rozpoznávané nejen proteiny (lektiny), ale i některými mikroorganismy, nejčastěji viry (např. virus chřipky). Mikroorganismy využívají Sia k adhezi s následné infekci buňky (Schauer 2004).



Obr. 9. Chemická struktura Neu5Ac (Neu5Gc).

### 3.2 Glykosylace

Glykosylace je kotranslační a postranslační modifikace, která probíhá zejména v drsném endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu za pomoci glykosylačních enzymů – glykosyltransferáz, které jsou většinou membránově vázané. Donorem glykosylu jsou vysoce energetické sacharidové nukleotidy (např. guanosin – difosfát (GDP) – Fuc, uridin – difosfát (UDP) – GalNAc), které jsou přenášeny na akceptorovou molekulu (např. proteiny, lipidy). Výsledkem tohoto procesu je vytvoření glykosidické vazby mezi jednotlivými molekulami za vzniku glykokonjugátů. Glykosidická vazba (acetalová vazba) je vytvářena stabilními cyklickými hemiacetaly, které reagují s hydroxylovými (-OH) nebo amidovými (-NH<sub>2</sub>) skupinami (proteinů, jiných sacharidů apod.) za vzniku acetalů (Varki a kol. 1999).

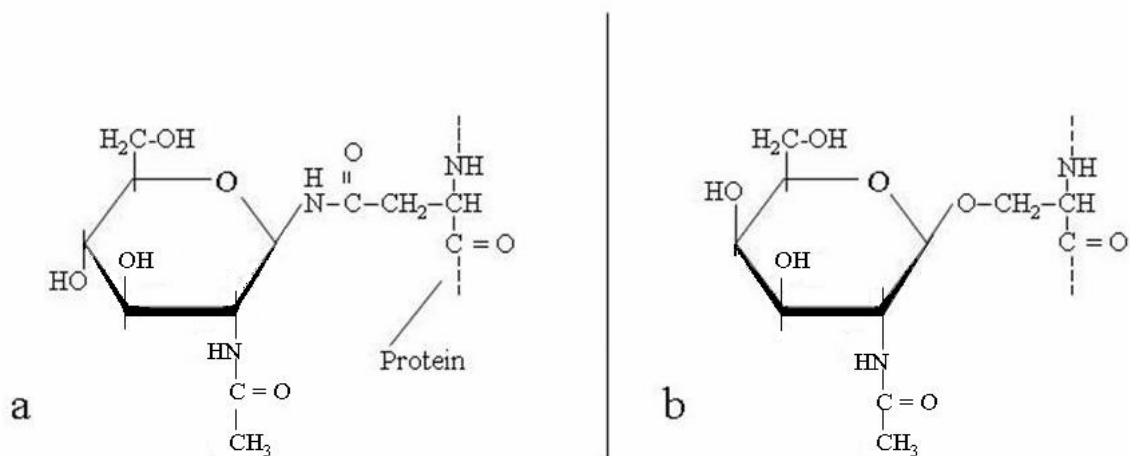
Příkladem glykokonjugátů jsou glykolipidy a glykoproteiny. U glykolipidů bývá sacharid nejčastěji připojován k acylglycerolu nebo ceramidu. Glykolipidy se vyskytují v buněčných membránách všech organismů a podílejí se např. na stabilizaci a pevnosti membrán, mají uplatnění v řadě biologických procesů (komunikace, modulace receptorů, diferenciací atd.). Mezi glykolipidy patří např. hopanoidy, lipoteichové kyseliny, lipoglykany a glykosfingolipidy. Glykoproteiny jsou také přítomné ve všech organizmech, jak v intracelulárním tak v extracelulárním prostoru, a stejně tak v buněčných membránách. Vyskytují se jako enzymy, receptory, hormony, strukturální proteiny apod. (Stick 2001).

Glykosylací vznikají glykany vázané na různé akceptory, které se dělí do několika tříd. Glykany se mohou vázat na amidovou skupinu asparaginu (Asn) za vzniku N-vázaných glykanů. Často se glykany navazují na hydroxylové skupiny serinu (Ser) a threoninu (Thr), ale také na stejné skupiny tyrosinu (Tyr), hydroxylysinu nebo hydroxyprolinu, čímž vznikají O-vázané glykany. Stejně tak se mohou glykany vázat i na hydroxylové skupiny lipidů, např. ceramidů. Vzácné jsou C-vázané glykany, u kterých je monosacharid (Man) navázán na uhlíkový atom tryptofanu (tzv. C-manosylace) (Furmanek a Hofsteenge 2000, Pollard a kol. 2008).



Zvláštní formou glykosylace je glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva, která umožňuje zakotvení proteinu do buněčné membrány. Proteiny kotvené GPI kotvou jsou svou karboxylovou skupinou připojeny přes fosfoethanolamin ke glykanu (3 Man a GlcNAc), který je připojen k fosfatidylinositolu. Fosfatidylinositol je zakotven svou hydrofobní částí do buněčné membrány. Takto kotvené proteiny mají díky GPI kotvě významné funkce, např. v signálních soustavách, kde mají schopnost převádět signál (Takeda a Kinoshita 1995).

Glykosylace proteinů a jiných molekul má řadu významných funkcí, např. bez glykosylace se některé proteiny správně neskládají, popř. jsou rychleji degradovány než proteiny glykosylované. Další významnou vlastností navázaných glykanů na protein může být zvýšení stability daného proteinu, poskytnutí adhezivních vlastností buňce, spoluúčast na vnitro- a mezibuněčném transportu molekul a signalizaci. V glykosylovaných molekulách existuje variabilita daná přítomností více glykosylačních míst, která se liší umístěním glykanů, stupni saturace a složením glykanových řetězců (Varki 1998, Varki a kol. 1999).



Obr. 10. Vazba sacharidu a peptidu v glykoproteinech, (a) N-glykosidová vazba mezi asparaginem a GlcNAc, (b) O-glykosidová vazba mezi Ser, popř. Thr a GalNAc (Převzato a upraveno podle Löffler a Petrides 1998)

### 3.2.1 N-glykosylace, N-glykany

U dosud studovaných eukaryot je N-glykosylace (Obr. 10) zahájena připojením 14-sacharidového prekurzoru (3 Glc, 9 Man a 2 GlcNAc) k amidovému dusíku L-asparaginu vznikajícího polypeptidu, obsaženého v sekvenci Asn-X-Ser/Thr, přičemž X může být jakákoli aminokyselina kromě prolinu. Následuje sestřih a zpracování přenášeného oligosacharidu a tak vzniká středová struktura 3 Man a 2 GlcNAc připojená k asparaginu. Tento pentasacharid tvoří základ struktury všech N-glykanů. K němu jsou připojené antenální oligosacharidy, které mohou být lineární i rozvětvené a obsahují různé monosacharidy. Podle struktury antén a způsobu jejich připojení se rozeznávají tři základní skupiny N-glykosylace: oligomanosová, komplexní a hybridní (Helenius a Aebi 2004, Buskas a kol. 2006).

N-glykosylace probíhá v drsném endoplazmatickém retikulu během syntézy proteinu. Důležitou roli v syntéze N-vázaných glykanů hraje dolichol, izoprenoidní látka zakotvená v membráně endoplazmatického retikula, která slouží jako přenašeč sacharidů při syntéze a je rozpoznáván enzymem oligosacharyltransferázou, který katalyzuje přenos oligosacharidu k asparaginu (Pollard a kol. 2008).

Oligosacharidy jsou polární látky a proto se glykosylované proteiny stávají více hydrofilními, čímž se snižuje pravděpodobnost agregace a zvyšuje se pravděpodobnost správného složení proteinu. Správně složený protein opouští endoplazmatické retikulum a je transportován do Golgiho systému, kde je dále modifikován (Pollard a kol. 2008).

### 3.2.2 O-glykosylace, O-glykany

O-glykosylace (Obr. 10) nejčastěji začíná přidáním monosacharidu GalNAc (z UDP-GalNAc) na hydroxylovou skupinu Ser nebo Thr za pomoci enzymu GalNAc transferázy. O-glykosylace se odlišuje od N-glykosylace tím, že není známa sekvence, která by rozhodovala o tom, který serin nebo threonin polypeptidu bude glykosylován, nicméně tyto seriny/threoniny se nalézají v oblastech bohatých na serin, threonin, alanin a prolin. Další odlišností od N-glykosylace je, že O-glykosylace probíhá většinou v Golgiho aparátu a podjednotky sacharidů jsou připojovány na protein postupně, bez dolicholového prekurzoru. O-glykany mají na rozdíl od N-glykanů méně rozvětvené struktury, běžně se u nich vyskytují biantennální struktury glykanů (Varki a kol. 1999).

O-GalNAc glykosylace může vést k vytvoření molekul mucinového typu. Muciny jsou sekretované nebo povrchově vázané glykoproteiny s velkým množstvím O-glykanů. Exprese mucinů je větší v epitelálních buňkách specializovaných na produkci hlenu a u buněk, které jsou ve styku s vnějším prostředím. Muciny, které byly sekretovány, zůstávají na apikálním povrchu epitelálních buněk s funkcí ochranných bariér. Muciny mohou např. měnit funkci proteinů a jejich glykanové části slouží jako ligandy pro buněčnou adhezi (Buskas a kol. 2006, Varki a kol. 1999).

Mezi O-glykany jiného typu patří proteoglykany, velké molekuly obsahující z 95% sacharidovou složku, které jsou součástí extracelulární hmoty, pojivových tkání a sekretů sliznic. Podílejí se na vazbě kationů (např. sodík, vápník) a vody, regulují pohyb molekul skrz matrix. Mezi nejznámější patří heparin a kyselina hyaluronová. Proteoglykany vznikají O-xylosylací, která začíná přidáním Xyl na serin. (Varki a kol. 1999).

Dalším typem O-glykosylace je O-fukosylace, které probíhá, na rozdíl od běžné O-glykosylace, v endoplazmatickém retikulu. Fukosyltransferázy katalyzují přenos Fuc z donoru GDP-Fuc na různé akceptorové molekuly-oligosacharidy, glykoproteiny a glykolipidy. Fukosylované struktury se účastní celé řady biologických a patologických procesů

v eukaryotických organizmech. Mezi ně patří např. vývoj tkání, angiogeneze, buněčná adheze (Ma a kol. 2006).

Neobvyklou O-glykosylací je O-GlcNAc glykosylace (vazba jediného GlcNAc na serin/threonin), která probíhá v cytoplasmě a jádře buňky a není trvale statickou modifikací. Podobně jako fosforylace /defosforylace proteinů se podílí na regulaci transkripčních aktivit, enzymatických aktivit, ochraně před degradací proteinů proteazomem apod. (Guinez a kol. 2005).

### **3.2.3 Přichycení proteinů k membráně**

Způsob přichycení proteinů k membráně může odrážet jejich funkce v buňce. Proteiny mohou být přichyceny k povrchu membrány, zanořeny do membrány a nebo procházejí celou dvouvrstevnou fosfolipidovou membránou (integrální membránové proteiny). Integrální membránové proteiny mají jeden nebo více segmentů procházející skrze hydrofobní střed membrány. Většina vnějších proteinů neinteraguje přímo s hydrofobním středem, ale váže se přímo přes interakci s lipidovou polární hlavičkou nebo nepřímo pomocí interakce s integrálními membránovými proteiny. Výjimku tvoří skupina proteinů, které jsou kotveny pomocí GPI (viz výše). Sacharidy a mastné kyseliny obsažené v GPI kotvách se odlišují v závislosti na typu proteinu (Ferguson a Williams 1988, Havercroft 1990).

## **3.3 Proteiny rozpoznávající sacharidy**

Pro interakce se sacharidy se jako receptory uplatňují především proteiny (imunoglobuliny, lektiny). Imunoglobuliny jsou produktem adaptivního imunitního systému a rozpoznávají i antigeny nesacharidového původu. Na druhou stranu lektiny (viz. dále) vážou jen sacharidy a to s vysokou specifitou, nevznikají činností adaptivního imunitního systému organismu. Díky své velké specifitě jsou lektiny využívány v nejrůznějších odvětvích biologického výzkumu. Interakce sacharidu s proteinem jsou realizovány prostřednictvím nekovalentních interakcí (např. vodíková vazba, nepolární a iontová interakce), v jejichž průběhu nedochází k transformaci sacharidu.

### **3.3.1 Charakteristika lektinů**

Lektiny jsou proteiny neenzymové a neimunoglobulinové povahy, schopné specificky rozeznávat a reverzibilně vázat sacharidy ať volné nebo vázané na lipidy nebo proteiny. Každý lektin obsahuje typicky dvě nebo více domén rozpoznávajících sacharidy (tzv. carbohydrate recognition domain, CRD) s různými specifitami. Některé lektiny mohou vedle CRD obsahovat i vazebné místo pro nesacharidový ligand, např. pro elastin (Ni a Tizard 1996, Barondes 1988).

Lektiny se účastní řady buněčných aktivit, mezi které patří např. aglutinace, adheze, migrace, aktivace, diferenciaci a apoptóza (Ni a Tizard 1996). V některých případech se

účastní fagocytózy jako opsoniny (Zelck a Becker 1992). Lektiny byly objeveny u většiny zkoumaných skupin organismů, od virů a bakterií přes rostliny až k živočichům. Většina známých lektinů je rostlinného původu (Sharon a Lis 2007).

Rozdělení lektinů do tří hlavních skupin (C, S a P) se provádí na základě porovnání primárních sekvencí CRD domén (Drickamer 1994 citace dle Ni a Tizard 1996), ale lektiny je možné dělit i na základě jiných vlastností, např. podle povahy sacharidových ligandů.

Početně nejvíce zastoupené jsou lektiny C-typu, které pro interakci se sacharidy vyžadují přítomnost vápenatých iontů (Drickamer 1988). Tento typ lektinů se na základě své lokalizace a specifity dále dělí do několika podskupin. Příkladem jsou selektiny, přítomné na endotelových buňkách a leukocytech, kolektiny a endocytické lektiny (Cummings a Smith 1992, Ni a Tizard 1996). Lektiny S-typu (galektiny) nevyžadují kationy pro svou aktivitu, ale jsou často závislé na přítomnosti redukčního činidla. Tato rodina lektinů je specifická pro  $\beta$ -galaktosidy (Drickamer 1995). P-typ lektinů je specifický pro rozpoznávání D-manosa-6-fosfátu a slouží pro nasměrování lysozomálních enzymů z Golgiho komplexu do lysozomů (Ni a Tizard 1996). K živočišným lektinům dále patří např. lektiny I-typu vázající kyselinou sialovou, a pentraxiny (Loris 2002).

### 3.3.2 Využití lektinů

Značené deriváty lektinů (radioaktivní, fluorescenční atd.) jsou často používané k detekci, izolaci a strukturálním studiím glykoproteinů, studiu glykosylace proteinů, charakterizaci sacharidů na buňkách a buněčných organelách, apod. Lektiny nabízejí řadu výhod, mezi které patří např. rychlá dostupnost, vysoká stabilita a odlišná specifita. (Sharon a Lis 2007).

Specifické interakce makromolekul nebo buněk s lektiny jsou důkazem, že dané struktury obsahují sacharidy. Lektiny mohou být značeny celou řadou způsobů, např. fluorescenční značení-fluoresceinem, rhodaminem, radioaktivně ( $^{125}\text{I}$ ), navázáním enzymu (např. alkalická fosfatáza) apod. (Sharon a Lis 2007).

Fluorescenčně značené lektiny (fluoresceinem-FITC) bývají např. využívány k identifikaci a vzájemnému druhovému i stadiálnímu porovnání sacharidové složení glykokalyxu motolic. U cercárií schistosom byla povrchová glykosylace popsána např. u *Schistosoma mansoni* (Linder 1985), *Trichobilharzia szidati* (Horák 1995, Horák a Mikeš 1995, Horák a kol. 1998b, Podhorský a kol. 2009), *T. regenti* (Blažová a Horák 2005, Podhorský a kol. 2009) a *T. franki* (Podhorský a kol. 2009).

## 4 Glykokalyx cercárií schistosom

Změny v kvantitativním a kvalitativním sacharidovém složení glykokalyxu u jednotlivých stádií životního cyklu schistosom souvisí s adaptací k životnímu prostředí. Ve vodním prostředí glykokalyx zprostředkovává svým majitelům osmotickou ochranu, zatímco uvnitř těl hostitelů interaguje s imunitním systémem rozpoznávajícím sacharidové molekuly. Velká rozmanitost ve složení povrchových molekul značně ovlivňuje interakce mezi hostitelem a parazitem (Boswell a kol. 1987). Glykokalyx tak představuje nepostradatelnou strukturu pro své majitele. Tato kapitola je zaměřená na ultrastrukturu, molekulární složení, funkce, vznik a odvrhování glykokalyxu při transformaci cercárií schistosom.

### 4.1 Vznik glykokalyxu cercárií schistosom

Glykokalyx je syntetizován v Golgiho komplexech subtegumentálních buněk cercárií a translokován na povrch cercárie elektron-densními váčky. Tento postulát je podpořen identifikací sacharidů ve váčcích barvením metodou PATCO (periodate-thiocarbohydrazide-osmium), která shodně barví váčky i glykokalyx na povrchu cercárií (Stein a Lumsden 1973). Glykokalyx pravděpodobně vzniká polymerizací jednoduchých podjednotek, naproti tomu je depolymerizován při transformaci cercárie na schistosomulum (Caulfield a kol. 1987, 1988).

Glykokalyx je přítomen až od stádií cercárií, která mají na svém povrchu vyvinutý pravý tegument a mají prodloužený ocásek, od chvíle, kdy už není embryo kryté primitivním epitelem (Stein a Lumsden 1973, Caulfield a kol. 1988). Glykokalyx se tedy objevuje na povrchu cercárie až v pozdějších fázích vývoje, odpovídajících stádiím 6 nebo 7 (podle klasifikace Cheng a Bier 1972 viz str. 6), jak ukazuje imunofluorescenční značení cercárií izolovaných z dceřiných sporocyst, kdy počáteční stádia toto značení postrádají. Přítomnost antigenů glykokalyxu jen na povrchu cercárií, a nikoliv v matrix zárodečných komůrek nebo v tkáních plže, dokazuje, že glykokalyx není vytvářen produkty buněk stěn sporocyst nebo hepatopankreatů plžů, ale samotnými cercáriemi. S postupným dozráváním tegumentu se zvětšuje i síla glykokalyxu. Ten je nejsilnější tehdy, když už je na tegumentu velké množství tegumentálních trnů (Caulfield a kol. 1988, Horák a kol. 1998b).

### 4.2 Ultrastruktura glykokalyxu cercárií schistosom

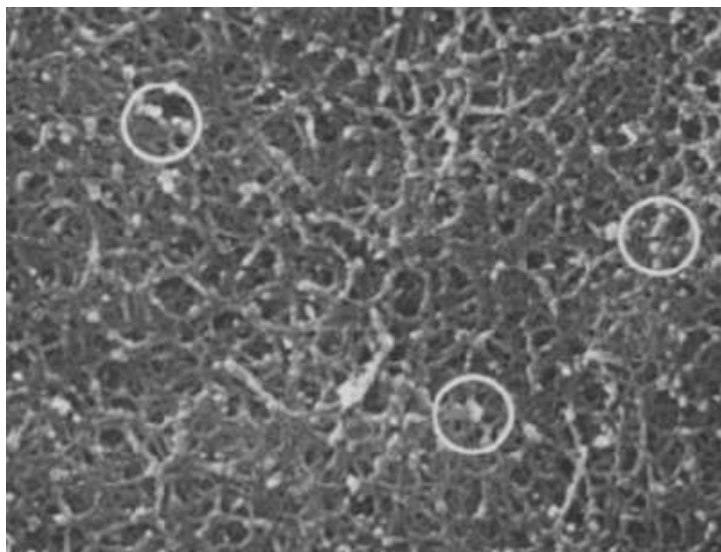
Ultrastruktura glykokalyxu cercárií *S. mansoni* byla zkoumána pomocí transmisního (TEM) a skanovacího elektronového mikroskopu (SEM). Na základě těchto studií se zdá, že glykokalyx je složen z fibril a částic (Samuelson a Caulfield 1985, Caulfield a kol. 1987).

Cercárie studované pomocí SEM (Obr. 11) byly fixované buď glutaraldehydem společně s osmiem nebo jinými aldehydy s následnou postfixací osmiem. V obou případech použité fixace se ukazuje, že glykokalyx je hustá síť složená z 15-30 nm fibril a částic s průměrem 20-50 nm, která pokrývá povrch cercárie, včetně tegumentálních trnů. Na ocásku

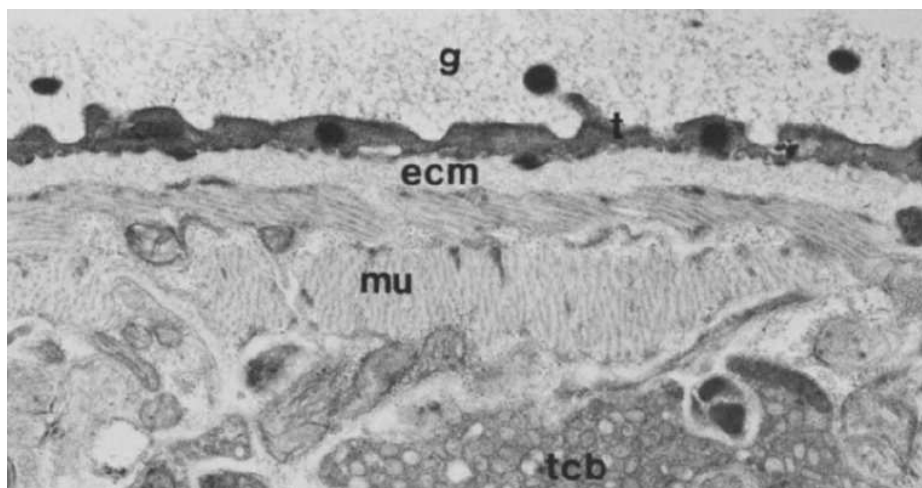
cerkárií je přítomná stejná fibrilární síť jako na těle cercárie, ale tenčí a s viditelnými konci trnů. Tenčí glykokalyx se také nachází na ventrální přísavce (Hockley 1970 citace dle Hockley 1973, Samuelson a Caulfield 1985). Glykokalyx není přítomen přes otvory vývodů penetračních žláz a přes sensorické papily (Robson a Erasmus 1970 cit. dle Hockley 1973, Morris 1971).

Caulfield a kol. (1987) ukázali, že fibrily jsou vytvářené z polymerů 20-50 nm částic. Tyto větší částice jsou často složeny z menších podjednotek s průměrem 15-20 nm. Síly, které drží polymerní fibrily pohromadě nejsou pravděpodobně kovalentní, protože glykokalyx je možné získat fenolovou extrakcí.

V případě studia TEM (Obr. 12) byly cercárie preinkubované v IRS (IgG protilátky získané z králíka hyperimunizovaného cercáriemi *S. mansoni*), fixované ve směsi různých aldehydů, nejčastěji formaldehydu a glutaraldehydu (s obsahem buď kyseliny tríslové nebo rutheniové červeně) a postfixované osmiem. Glykokalyx byl poté pozorován jako 1-2  $\mu\text{m}$  silná fibrilární síť tvořená 8-15 nm fibrilami (Samuelson a Caulfield 1985). Rozdíly v délce fibril jsou pravděpodobně dány pokovením povrchu cercárií tenkou souvislou vrstvou kovu (zde zlato nebo palladium) u vzorků pro SEM, a proto mají fibrily spíše délku 8-15 nm než 15-30 nm (Samuelson a Caulfield 1985).



Obr. 11. Fotografie z SEM, glykokalyx je fibrilární struktura, složená z 15-30 nm fibril a částic s průměrem 20-50 nm (v kroužku) (Samuelson a Caulfield 1985).



Obr. 12. Fotografie povrchu cercárie z TEM, glykokalyx (g) (detekován pomocí IRS), pod ním tegument (t), extracelulární matrix (ecm), svaly (mu) a subtegumentální buňky (tcb) (Samuelson a Caulfield 1985).

### 4.3 Molekulární složení glykokalyxu cercárií schistosom

Glykokalyx cercárií *S. mansoni* je komplexní struktura složená především z glykoproteinů a glykolipidů. Hlavní složka glykokalyxu cercárií má molekulovou hmotnost přesahující  $5 \times 10^6$  Da, ale byly zjištěny i další menší povrchové glykoproteiny s molekulovou hmotností 15-220 kDa (Caulfield a kol. 1987, Dalton a kol. 1987). Glykokalyx obsahuje především sacharidy (82%) a malé množství proteinů (18%) (Caulfield a kol. 1987). Xu a kol. (1994) ukazují, že poměr sacharidů k proteinům je až 300:1. Velké množství sacharidů zakrývá peptidové kostry, a proto je glykokalyx rezistentní proti některým proteázám. Tato vlastnost je důležitá pro přežití cercárií v jejich přirozeném životním prostředí (Nanduri a kol. 1991). Glykany glykokalyxu jsou nejčastěji připojené k serinu nebo threoninu proteinů (O-glykosylace) přes GalNac na redukujícím konci (Nanduri a kol. 1991, Khoo a kol. 1995).

Glykokalyx je získáván z cercárií fenolovou extrakcí a kombinací velikostní a lektinové (*Lotus* a *Anguilla* lektin) afinitní chromatografie na Sepharose CL-2B (Nanduri a kol. 1991, Xu a kol. 1994). K charakterizaci glykokalyxu byly použity metody (např. nukleární magnetická rezonance, chromatografie na tenké vrstvě), které sloužily k objasnění vlastností glykokalyxu, především sacharidového složení. Během značení glykokalyxu Caulfield a kol. (1987) a Nanduri a kol. (1991) použili k ošetření jodistan - triboritan sodnou redukcí, a proto glykokalyx nemusel být přítomen v nativním stavu. Xu a kol. (1994) tento krok ve svých pokusech vynechali.

Glykokalyx cercárií *S. mansoni* obsahuje hodně Fuc reprezentující více než 50% všech sacharidů (Nanduri a kol. 1991, Khoo a kol. 1995). Mezi další sacharidy vyskytující se v glykokalyxu cercárií *S. mansoni* patří Gal, Glc, GlcNac a GalNac. Fuc, Gal, GalNac a GlcNac se nacházejí v molárním poměru 3:1:1:1 (pozdější studie udává 5:1:1:1) (Xu a kol.

1994, Khoo a kol. 1995). Caulfield a kol. (1987) uvádí ještě přítomnost Man. Přítomnost sialových kyselin nebyla prokázána (Nanduri a kol. 1991).

Data z nukleární magnetické rezonance (NMR) ukazují, že galaktosamin a glukosamin se vyskytují ve formě N-acetylů. NMR spektrum ukazuje na přítomnost  $\alpha$  i  $\beta$  spojení ve struktuře glykokalyxu (Xu a kol. 1994). Většinu aminokyselin v proteinech glykokalyxu reprezentují serin, threonin, glycin a kyselina glutamová (Caulfield a kol. 1987).

Nanduri a kol. (1991) pozorovali rozdíly mezi glykosylací těla a ocásku cercárií *S. mansoni*. Lektiny specifické pro Fuc se vázaly jen na těla cercárií (na dostupnou terminální neredukující Fuc), ale ne na ocásky. Glykokalyx těla cercárie je bohatší na Fuc než glykokalyx ocásku, který obsahuje hodně Glc. Glykokalyx nese celkový záporný náboj, který je větší na ocásku než na těle cercárie. Odlišné složení sacharidů ocásku a tělípka cercárií se odráží i vazbou protilátek, protože ocásek nepenetruje do definitivního hostitele a ani nesvléká glykokalyx během transformace (Samuelson a Caulfield 1985, 1986).

Také cercárie *Trichobilharzia szidati*, *T. regenti*, *T. franki* a *Schistosoma margrebowiei* obsahují na svém povrchu Fuc (Daniel a kol. 1992, Horák 1995, Horák a Mikeš 1995, Podhorský a kol. 2009). Fuc se jeví jako charakteristický sacharid vyskytující se v glykokalyxu cercárií schistosom, ale nevyskytuje se v glykokalyxu cercárií jiných skupin motolic (Horák a Mikeš 1995).

Na základě fluorescenčně značených lektinů byla popsána glykosylace povrchů cercárií i jiných druhů motolic – např. *Echinostoma revolutum*, *Diplostomum pseudospathaceum*. Srovnání glykosylace povrchů cercárií 9 druhů motolic je shrnuto v tabulce 1. I u jiných motolic byly pozorovány rozdíly mezi glykosylací ocásku a tělípka cercárie, např. u druhu *D. pseudospathaceum* se odlišuje tělípko a ocásek cercárie ve vazbě lektinu WGA (úplné názvy lektinů jsou uvedené pod tabulkou), který specificky rozpoznává GlcNAc nebo ve vazbě lektinu HPA rozpoznávajícího GalNAc. Oba tyto lektiny se vážou k tělu, ale ne k ocásku cercárie (Horák a Mikeš 1995). Podobný efekt byl sledován i u *T. szidati* v odlišné vazbě lektinů WGA a SBA (Horák 1995).

*D. pseudospathaceum* je motolice z čeledi Diplostomatidae, její cercárie stejně jako cercárie schistosom penetrují do svého hostitele. Odlišují se od schistosom tím, že nepenetrují do definitivního hostitele, ale do druhého meziphostitele (především ryby a obojživelníci). Povrch *D. pseudospathaceum* silně reagoval s lektiny se specifitou pro GlcNAc (WGA), Gal (PNA, RCA-I), GalNAc (HPA, SBA) a slaběji s lektinem specifickým pro Man/Glc (PSA) (Horák a Mikeš 1995). Porovnání glykosylace povrchů cercárií druhů *T. szidati* a *D. pseudospathaceum* (studie Horák a Mikeš 1995) ukazuje shodu ve vazbě šesti lektinů (BS-II, ConA, PSA, RCA-I, SBA, WGA). Porovnání *D. pseudospathaceum* s *T. regenti* ukazuje shodu ve vazbě tří lektinů (PSA, RCA-I, WGA), s *T. franki* ve vazbě čtyř lektinů (PSA, RCA-



I, SBA, WGA) a se *S. mansoni* se shoduje ve vazbě čtyř lektinů (HPA, RCA-I, SBA, WGA) (Linder 1985, Horák a Mikeš 1995, Podhorský a kol. 2009).

Tabulka 1: Porovnání glykosylace povrchů těla cercárií 9 druhů motolic pomocí 13 fluorescenčně značených lektinů. Shrnutí šesti studií.

Lektin	<i>S.m.</i> <sup>1</sup>	<i>T.s.</i> <sup>2,3,4/6</sup>	<i>T.r.</i> <sup>5,6</sup>	<i>T.f.</i> <sup>6</sup>	<i>E.r.</i> <sup>3</sup>	<i>P.sp.</i> <sup>3</sup>	<i>H.c.</i> <sup>3</sup>	<i>E.a.</i> <sup>3</sup>	<i>D.p.</i> <sup>3</sup>
BS-II	+	-	0	0	-	-	++	++	-
ConA	+	-/+++	+	+	-	+	++	++	-
HPA	+	-	-	-	++	++	++	++	++
LCA	0	++	+	++	-	-	-	++	-
LTA	-	++	++	++	0	0	0	0	0
PNA	-	-/+	-	-	++	++	++	-	++
PSA	0	++	++	++	-	-	-	++	+
PWM	0	±‡	0	0	0	0	0	0	0
RCA-I	+	+++‡	+	++	++	++	-	-	++
SBA	+	+/-	-	+	++	++	++	+	++
UEA-I	-	+	++	++	0	0	0	0	0
WGA	+	++/+	±	+	++	-	++	++	++
TPA	0	++	0	0	-	-	-	-	-

**Reakce lektinů:** ++ silná reakce, + slabá reakce, ± velmi slabá reakce, - žádná reakce, 0 netestováno, ‡ nespecifická reakce.

**Lektiny:** BS-II – *Bandeiraea simplicifolia* (GlcNAc), ConA – *Canavalia ensiformis* ( $\alpha$ -D-methylmannopyranosid – MetMan,  $\alpha$ -D-methylglukopyranosid – MetGlc), HPA – *Helix pomatia* (GalNAc), LCA – *Lens culinaris* (MetMan, MetGlc), LTA – *Lotus tetragonolobus* (Fuc), PNA – *Arachis hypogaea* (Gal), PSA – *Pisium sativum* (MetMan, MetGlc), PWM – *Phytolacca americana* (oligo-GlcNAc), RCA-I – *Ricinus communis* (laktosa – Lac), SBA – *Glycine max* (GalNAc), UEA-I – *Ulex europaeus* (Fuc), WGA – *Triticum vulgare* (oligo-GlcNAc), TPA – *Tetragonobulus purpureus* (Fuc). V závorkách jsou uvedené sacharidové inhibitory jednotlivých lektinů.

**Zkoumané druhy motolic:** *S.m.* – *Schistosoma mansoni*, *T.s.* – *Trichobilharzia szidati*, *T.r.* – *Trichobilharzia regenti*, *T.f.* – *Trichobilharzia franki.*, *E.r.* – *Echinostoma revolutum*, *P.sp.* – *Paryphostomum sp.*, *H.c.* – *Hypoderaeum conoideum*, *E.a.* – *Echinoparyphium aconiatum*, *D.p.* – *Diplostomum pseudopathaceum*,

**Citace:** <sup>1</sup> Linder (1985), <sup>2</sup> Horák 1995. <sup>3</sup> Horák a Mikeš (1995), <sup>4</sup> Horák a kol. (1998b), <sup>5</sup> Blažová a Horák 2005, <sup>6</sup> Podhorský a kol. (2009).

Glykosylace povrchů těl cercárií druhů *T. regenti* a *T. szidati* byla popsána v řadě prací (Horák 1995, Horák a Mikeš 1995, Horák a kol. 1998b, Blažová a Horák 2005, Podhorský a kol. 2009). Porovnáním studií byly odhaleny značné rozdíly ve vazbě identických lektinů na povrch cercárií *T. szidati* a *T. regenti* (v tabulce není ukázáno). Rozdíly mohly být způsobeny odlišným zpracováním materiálu nebo použitím jiné šarže lektinů. Publikované výsledky glykosylace povrchů cercárií *T. szidati* se významně lišily ve vazbě lektinů ConA, PNA a SBA, ale i intenzitou reakcí lektinů např. WGA (viz. tabulka).

Na základě studie Podhorského a kol. (2009) cercárie *T. szidati* na svůj povrch silně vázaly lektiny se specifitou pro L-Fuc (LTA, slabě UEA-I), pro Man/Glc (PSA, LCA, ConA) a pro GalNAc/Gal (RCA-I, JAC, slabě PNA). U cercárií *T. regenti* byla zjištěna silná vazba lektinů se specifitou pro L-Fuc (LTA, UEA I), pro Man/Glc (PSA, LCA, slabě ConA) a GalNAc/Gal (RCA-I, JAC). Kromě lektinu PNA, u kterého se jednalo jen o velmi slabou vazbu, byla zjištěná vazba lektinů u těchto dvou druhů identická. Glykosylace povrchu cercárií *T. franki* se velmi podobala glykosylaci předešlých dvou druhů. Cercárie *T. franki* silně vázaly lektiny se specifitou pro L-Fuc (LTA, UEA-I), pro Man/Glc (PSA, slabě ConA a LCA) a GalNAc/Gal (JAC, slabě RCA-I). Odlišná reakce byla získána s lektinem SBA, který rozpoznával povrch *T. franki*, ale ne povrch dvou předešlých druhů. Na základě reakcí lektinů s povrchy cercárií těchto tří druhů nebyly nalezeny signifikantní rozdíly a proto se zdá být povrchová glykosylace rodu *Trichobilharzia* uniformní. Naproti tomu lektinová analýza cercárií rodu *Schistosoma* a *Trichobilharzia* ukazuje na odlišný motiv glykosylace – a to ve vazbě lektinů LTA, HPA, UEA-I. (Linder a kol. 1985, Podhorský a kol. 2009).

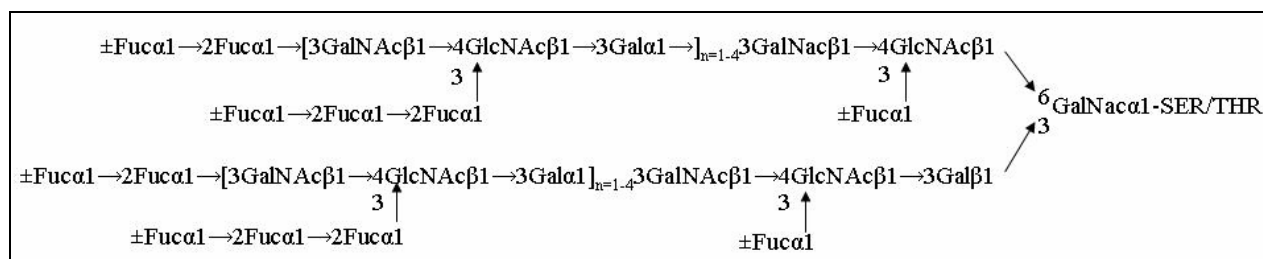
#### 4.3.1 O-glykany

Detailní strukturální studie glykokalyxu získaného z cercárií *S. mansoni* fenolovou extrakcí a následně lektinovou afinitní chromatografií ukázala přítomnost velmi heterogenní skupiny vysoce fukosylovaných O-glykanů, jejichž velikost se pohybuje od 12 do více než 60 sacharidových reziduí (Obr. 13). Mají neobvyklou opakující se trisacharidovou strukturu  $[-\rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow]_n$ , která tvoří oporu oligosacharidu. Tri- až penta-fukosylované epitopy jsou nesené na dvou typech středových struktur, typ 1:  $\text{R} \rightarrow \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$  a typ 2:  $\text{R} \rightarrow \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{R} \rightarrow \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6)\text{GalNAc}$ . Vážou se na jejich interní GlcNAc a terminální GalNAc (Khoo a kol. 1995).

Heterogenní polyfukosylace O-glykanů přispívá k jejich strukturální různorodosti. K té dále přispívá i různý počet opakujících se trisacharidových podjednotek v každém O-glykanu a přítomnost nebo absence glykosylových řetězců na 6-rameni (vzniká buď lineární nebo větvená středová struktura). Jedinečnost O-glykanů glykokalyxu spočívá v opakování LacdiNAc (N,N'-diacetyl laktosamin,  $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ ), které jsou oddělené Gal, a

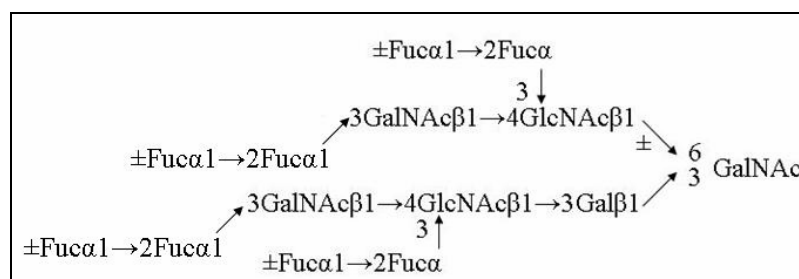
proto netvoří poly-LacdiNAc. Výskyt Gal uvnitř řetězce je neobvyklý, protože galaktosylace obvykle řetězce glykanů zakončuje a ne prodlužuje (Khoo a kol. 1995).

Tyto vysoce fukosylované O-glykany jsou rozpoznávány monoklonální protilátkou (mAb) namířenou proti epitopu v glykokalyxu cercárií *S. mansoni* (Dalton a kol. 1987). Imunolokalizace touto mAb ukazuje, že tyto fukosylované epitopy byly exprimovány na povrchu cercárií a nově transformovaných schistosomul, ale ne na povrchu dospělých schistosom (Köster a Strand 1994 cit. dle Khoo a kol. 2001).



Obr. 13. O-glykany z glykokalyxu cercárií *S. mansoni* (Khoo a kol. 1995).

Pomocí lektinové chromatografie byly také izolovány vysoce fukosylované O-glykany s menším počtem glykosylových zbytků, které jsou opět založené na středových strukturách typu 1 a 2. Nejmenší struktura O-glykanu byla definována jako  $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$  s 2 až 4 Fuc připojenými k terminální LacdiNAc (Obr. 14). Nejmenší struktury postrádají rozšíření z C6 GalNAc a opakující se podjednotku (čtyřsacharidová kostra s maximálně 4 připojenými Fuc). Nejmenší větvená struktura má připojen další LacdiNAc na C6 GalNAc s maximálně 8 navázanými Fuc (Huang a kol. 2001).



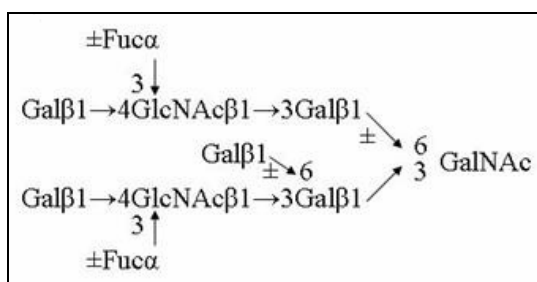
Obr. 14. Vysoce fukosylované O-glykany s menším počtem glykosylových zbytků z cercárií *S. mansoni* (Huang a kol. 2001).

Analýza extraktů glykoproteinů z cercárií *S. mansoni*, které se nevyvázaly na lektin *Anguilla anguilla* během afinitní chromatografie vedla k identifikaci menších O-glykanů s neobvyklou středovou strukturou a N-glykanů se středovou xylosylací. Tyto 2 typy glykoproteinů obsahují velké množství Lewis X antigen na terminální pozici ( $\text{Le}^x$ ,  $\text{CD15}$ ,  $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3] \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ ) (Obr. 17) (Huang a kol. 2001, Khoo a kol. 2001).

Huang a kol. (2001) charakterizovali nové skupiny O-glykanů jednoduššího složení, v rozmezí od 2 do 10 glykosylových zbytků. Tyto O-glykany nejsou vysoce fukosylované a

mají jiný typ středové struktury, který dává vzniknout jak monoantenálním, tak biantenálním strukturám. O-glykany jsou připojeny k peptidům přes GalNAc na redukujícím konci, vytváří tak buď lineární  $R \rightarrow 3GalNAc$  nebo větvenou  $R_1 \rightarrow 3(R_2 \rightarrow 6)GalNAc$  strukturu (Obr. 15).

Tyto jednoduché O-glykany nejsou založeny na obvyklých typech středových struktur (viz. výše), ale mají jiný typ středové struktury,  $R \rightarrow 3(\pm Gal\beta 1 \rightarrow 6)Gal\beta 1 \rightarrow 3(R \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 6)GalNAc$ . R může být  $Le^x$ , LacNAc (N-acetyllaktosamin,  $Gal\beta 1 \rightarrow 4GlcNAc$ ) nebo samostatný GlcNAc. Tato středová struktura se pravděpodobně nachází i v O-glykanech cercárií *S. haematobium* a *S. japonicum* (Huang a kol. 2001).



Obr. 15. Menší O-glykany cercárií *S. mansoni* založené na nové středové struktuře s navázaným  $Le^x$ . Větvení 6-ramena může chybět nebo může být prodlouženo samostatným  $\beta$ -Gal (Huang a kol. 2001).

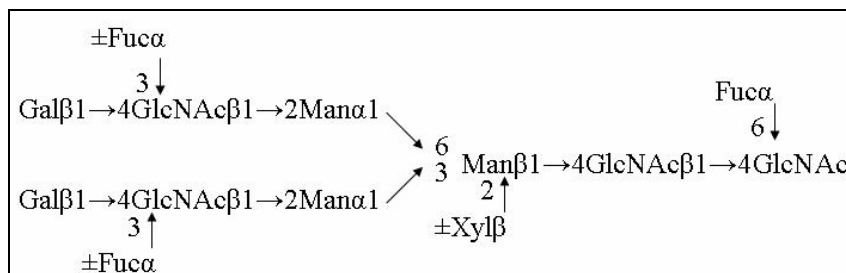
#### 4.3.2 N-glykany

N-glykany cercárií *S. mansoni* (Obr. 16) a *S. japonicum* se z velké části nevážou na lektin *Anguilla anguilla* při afinitní chromatografii (Khoo a kol. 2001).

Struktury N-glykanů cercárií *S. mansoni* nesou  $\beta 2$ -xylosylaci a  $\alpha 6$ -fukosylaci na středu se třemi manosovými zbytky. Většina těchto glykanů nese terminální  $Le^x$ , který může být také nepřímo připojen ke středu přes GlcNAc. Hlavními složkami jsou tak dvojice xylosylovaných a nexylosylovaných zkrácených, hybridních a komplexních středových typů  $\alpha 6$ -fukosylovaných struktur, s dominantním terminálním  $Le^x$  na neredučujících koncích mono- a biantenálních struktur (Khoo a kol. 2001).

N-glykany cercárií *S. japonicum* se značně podobají N-glykanům cercárií *S. mansoni*: mají terminální  $Le^x$  epitop, na středové struktuře nesou  $\alpha 6$ -fukosylaci, ale postrádají  $\beta 2$ -xylosylaci (Khoo a kol. 2001).

N-glykany schistosomul a dospělců *S. mansoni* a *S. japonicum* se odlišují od N-glykanů cercárií v signifikantně větším množství oligomanosových a fukosylovaných oligomanosových struktur a nepřítomností  $\beta 2$ -xylosylace středové struktury (Khoo a kol. 2001).



Obr. 16. Navrhovaná struktura N-glykanů cercárií *S. mansoni* (Khoo 2001).

### 4.3.3 Glykolipidy

Glykolipidy izolované z cercárií *S. mansoni* byly rozděleny pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Glykolipidy byly vizualizovány chemicky (barvení orcinol/ $H_2SO_4$ ) nebo prostřednictvím imunoznačení protilátkami ze sér myši s chronickou nákazou *S. mansoni* nebo pomocí myši mAb anti-CD15 (Weiss a kol. 1986, Wuhrer a kol. 2000). Mezi převládající chemické struktury glykolipidů cercárií *S. mansoni* s disacharidovou středovou strukturou GalNAcβ1→4Glc1→ patří (Makaaru a kol. 1992, Wuhrer a kol. 2000):

1. GalNAcβ1→4Glc1→ceramid
2. GlcNAcβ1→3GalNAcβ1→4Glc1→ceramid
3. Galβ1→4GlcNAcβ1→3GalNAcβ1→4Glc1→ceramid
4. Galβ1→4(Fuca1→3)GlcNAcβ1→3GalNAcβ1→4Glc1→ceramid (pentasacharidová struktura s  $Le^x$ )
5. Galβ1→4(Fuca1→3)GlcNAcβ1→3GlcNAcβ1→3GalNAcβ1→4Glc1→ceramid (hexasacharidová struktura s  $Le^x$ ) – dříve nepopsán u schistosom
6. Fuca1→3Galβ1→4(Fuca1→3)GlcNAcβ1→3GalNAcβ1→4Glc1→ceramid (hexasacharidová struktura s pseudo-Lewis Y [pseudo- $Le^y$ , Fuca1→3Gal])

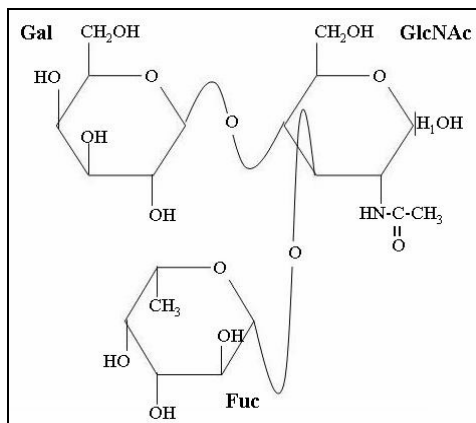
Glykolipidy exprimované *S. mansoni* jsou vysoce antigenní struktury. Struktury  $Le^x$  a pseudo- $Le^y$  jsou exprimovány cercáriemi, ale ne dospělci. (Weiss a kol. 1986, Wuhrer a kol. 1999, 2000). Fuca1→3Galβ1→4(Fuca1→3)GlcNAc→ (pseudo- $Le^y$ ) je strukturální izomer Lewis Y epitopu ( $Le^y$ , Fuca1→2Galβ1→4(Fuca1→3)GlcNAc→), kde se Fuc váže k Gal ve 3. pozici, zatímco v případě  $Le^y$  ve 2. pozici, proto je také nová struktura nazývána pseudo- $Le^y$  (Wuhrer a kol. 2000).

Cercárie exprimují glykolipidy podobné těm exprimovaným vajíčky *S. mansoni*. Odlišují se od nich v přítomnosti velkého množství terminální a 3-substituované Gal, která se v glykolipidech vajíček nenachází. U glykolipidů vajíček se rovněž vyskytují odlišné N-acetylhexosaminové kostry. U cercárií se pravděpodobně nachází β4-galaktosyltransferáza, která se účastní galaktosylace – biosyntézy glykolipidů cercárií. Galaktosylace může být doprovázená fukosylací za tvorby  $Le^x$  struktur (Khoo a kol. 1997a, Wuhrer a kol. 2000).

#### 4.3.4 Lewis X antigen

Le<sup>x</sup> antigen je především důležitou součástí povrchů různých lidských i myších buněk, kde se podílí na buněčné signalizaci (Fox a kol. 1983). Byl také identifikován jako dominantní epitop cercárií *S. mansoni*, který může být nesen na N-glykanech (Khoo a kol. 2001), O-glykanech (Huang a kol. 2001) a glykolipidech (Wuhrer a kol. 2000). Na základě použití mAb specifické pro Le<sup>x</sup> můžeme sledovat výskyt tohoto epitopu u stádií *S. mansoni*. Le<sup>x</sup> byl takto detekován na povrchu dospělých schistosom a transformovaných schistosomul, na glykoproteinech vajíček, na vývodech acetabulárních žláz, na orální a ventrální přísavce cercárií (Srivatsan a kol. 1992, Köster a Strand 1994 cit. dle Khoo 2001, Khoo a kol. 1997b, Nyame a kol. 1998, van Remoortere a kol. 2000). Schistosomy ho příhodně využívají jako mimikry a unikají tak imunitnímu systému hostitele (Wuhrer a kol. 2000). Další funkcí Le<sup>x</sup> je regulace imunitní odpovědi hostitele (viz dále).

Z reakce mAb proti Le<sup>x</sup> je zřejmé, že je přítomen i na povrchu cercárií, nicméně je pravděpodobně maskován vysoce fukosylovanými strukturami glykokalyxu (Huang a kol. 2001, Khoo a kol. 2001, Wuhrer a kol. 2000). Nejvíce imunopatogenních aktivit glykanů schistosom je přisuzováno vajíčkům, ale i invadující cercárie, které jsou kromě přítomného imunopotentního glykokalyxu důležitým zdrojem Le<sup>x</sup>, mohou přispívat k vyvolávání humorální odpovědi při infekci (Khoo a kol. 2001).



Obr. 17. Chemická struktura Lewis X epitopu.

#### 4.3.5 Biosyntéza glykokonjugátů

Na biosyntéze glykokonjugátů schistosom se pravděpodobně podílí mnoho různých glykosyltransferáz v závislosti na pestrosti glykonjugátů různých vývojových stádií, zcela jistě ale nebyly všechny popsány (Marques a kol. 2001). U cercárií *Trichobilharzia* sp. (autoři uvádějí *T. ocellata*, který pravděpodobně není validní a zdá se být komplexem druhů, viz. Rudolfová a kol. 2005) byly identifikovány  $\alpha$ 2- a  $\alpha$ 3-fukosyltransferázy, které se podílejí na syntéze sekvence Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3[Gal(NAc) $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4]GlcNAc (Hokke a kol. 1998).  $\alpha$ 2-fukosyltransferáza je zodpovědná za syntézu oligofukosylovaných postranních řetězců

(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Fuc $\rightarrow$ ).  $\alpha$ 3-fukosyltransferáza se účastní biosyntézy (oligomerické) Le<sup>x</sup> sekvence. (Khoo a kol. 1995, Hokke a kol. 1998). Neeleman a kol. (1994) u cercárií *Trichobilharzia* sp. dále identifikovali  $\beta$ 4-N-acetylgalaktosaminyltransferázu, která se pravděpodobně podílí na syntéze Lac $\alpha$ NAc, přesněji katalyzuje přenos GalNAc z UDP-GalNAc na oligosacharidy, glykopeptidy a glykoproteiny, které nesou terminálně připojený  $\beta$ -GlcNAc.

Syntéza trisacharidu GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$  $\rightarrow$ R, která reprezentuje nefukosylovanou část glykanu glykokalyxu cercárií *S. mansoni* (Halkes a kol. 1998), syntéza difukosylovaného GalNAc epitopu jako terminální části oligosacharidů *S. mansoni* (Kamath a Hindsgaul 1996) a syntéza Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ , GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4[Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$  $\rightarrow$  a Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4[Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$  $\rightarrow$ , které reprezentují fukosylované fragmenty oligosacharidů glykanů glykokalyxu cercárií *S. mansoni* (Ágoston a kol. 2002) mohou urychlit vývoj diagnostiky a potenciální vakcíny proti schistosomóze (Cummings a Nyame 1999).

#### 4.4 Funkce glykokalyxu cercárií schistosom

Jak již bylo řečeno, glykokalyx představuje pro cercárie motolic velmi důležitou a nepostradatelnou strukturu, kde se odehrávají zásadní biochemické a fyziologické interakce parazita a hostitele. Tyto interakce vedou k adaptivním modifikacím u parazitů i hostitelů. Cercáriím poskytuje ochranu proti nepříznivým vnějším podmínkám, především vytváří bariéru mezi vodním prostředím s nízkou hodnotou osmotického tlaku a tělem cercárie se zcela odlišným osmotickým tlakem (Morris 1971). Po svléknutí glykokalyxu se povrch schistosom rychle adaptuje na prostředí definitivního hostitele a schistosomuly již nejsou schopné přežít ve vodním prostředí. Složení glykokalyxu se liší u jednotlivých vývojových stádií schistosom, a tak umožňuje fyziologickou adaptaci současně se změnou prostředí (Stirewalt 1963, Morris 1971, Stein a Lumsden 1973).

Glykokalyx se podílí na mechanické stabilizaci povrchu cercárie během jejího vývoje v mezihostitelském plži, přes sladkovodní prostředí až do definitivního hostitele (Khoo a kol. 1995). Cercáriím pravděpodobně poskytuje ochranu před enzymatickými sekrety samotných cercárií, enzymy trávicích žláz plžů a podílí se na mechanické ochraně proti částicím, které by jinak povrch cercárie poškodily (Hockley 1973). Glykokalyx se evidentně podílí na kontrole permeability povrchu cercárií při pobytu ve vodním prostředí (Morris 1971, Stein a Lumsden 1973). Současně se ztrátou glykokalyxu dochází ke zvýšení permeability membrán schistosomul (Stirewalt 1963). Vytvoření glykokalyxu na povrchu cercárií je možným stimulem k uvolnění cercárií z mezihostitelských plžů, protože dochází k redukci permeability a tím ke snížení absorpce živin (Stirewalt 1974).

Glykokalyx je antigenní struktura s imunomodulační aktivitou, je jedním z prvních antigenů parazita, který je imunitnímu systému definitivního hostitele odhalen (Xu a kol.

1994, Khoo a kol. 1995). Epitopy glykokalyxu mohou být detekovány jak monoklonálními protilátkami (mAb) (Harn a kol. 1984), tak protilátkami, které vznikají během přírodní infekce (Kemp 1970). Navozuje humorální odpověď hostitele a aktivuje alternativní dráhu komplementu pravděpodobně bez účasti protilátek. Jeho svlékání v průběhu penetrace představuje výhodnou strategii úniku imunitnímu systému hostitele (Samuelson a Caulfield 1986, Hussein a kol. 1997). Je schopný vyvolat proliferaci B buněk, antigen prezentujících buněk (u některých linií myší, které jsou rezistentní k proliferativní stimulaci lipopolysacharidem), ale nestimuluje proliferaci T buněk (Xu a kol. 1993, Khoo a kol. 1995, Hussein a kol. 1997). Glykokalyx je zodpovědný za zpoždění hypersenzitivity objevující se brzy po infekci. Je rozpoznáván séry z pacientů nakažených schistosomózou (Khoo a kol. 1995). Je také jednou z příčin vzniku zánětlivé odpovědi, která se odehrává v kůži hostitele po penetraci cercárie, tzn. účastní se vzniku cercárie dermatitidy (Cummings a Nyame 1999).

Klabunde a kol. (2000) ukázali, že povrchové sacharidy cercárií jsou vazebnými ligandy pro „mannose binding lectin“ (MBL), sérový protein, který je součástí přirozeného imunitního systému. MBL má velké množství sacharidových ligandů, a proto je schopný adherovat k většině sacharidů na povrchu cercárií. *In vitro* pokusy této skupiny ukazují, že komplement by mohl být aktivován přes MBL cestu, tzv. lektinovou cestu, která probíhá podobně jako cesta klasická (Turner 1996, Klabunde a kol. 2000).

Infekce schistosomami je známa vyvoláním Th2 typu imunitní odpovědi a signifikantní produkcí IgE protilátek. Jedním z aktivátorů Th2 imunitní odpovědi je  $Le^x$ , protože indukuje myší B buňky k sekreci velkého množství IL-10 (interleukin 10) a prostaglandinu  $E_2$ , který reguluje diferenciaci  $CD4^+$  T-buněk (Th1 typ imunitní odpovědi) (Velupillai a Harn 1994). Podobným mechanismem Th1 typ imunitní odpovědi reguluje i glykokalyx (Khoo a kol. 1995). Ovšem je více než pravděpodobné, že doposud nebyly odhaleny všechny děje, kterých se glykokalyx účastní.

## **4.5 Odvrhování glykokalyxu cercárií při transformaci na schistosomuly**

### **4.5.1 Mechanismus odvrhování glykokalyxu**

Během transformace cercárie *S. mansoni* na schistosomulum dochází i k odvrhování glykokalyxu. Mechanismus odvrhování je komplexní proces, který není dosud zcela prozkoumán, ale na základě nejrůznějších studií bylo doposud zjištěno, že odvrhování glykokalyxu zahrnuje nejméně tři mechanismy: 1) Glykokalyx se na povrchu cercárií ztenčuje, když se cercárie agregují ve vodě se sekretovaným obsahem penetračních žláz. Ztráta glykokalyxu je tedy patrně způsobená žlázovými sekrety. 2) 30-50% glykokalyxu je odvrženo během první hodiny, kdy se vytvářejí a následně oddělují mikroklky z povrchu schistosomy. 3) I po ztrátě mikroklků pokračuje odvrhování cercariálního glykokalyxu, dochází k úplnému odvržení postupně během několika příštích hodin. K odvržení



glykokalyxu může dojít nejen kvůli žlázné sekreci, ale také díky periodické obměně povrchové membrány, ke které dochází s poločasem 10-12 hodin (Hockley a McLaren 1973, Samuelson a Caulfield 1985).

I poté co byl odvržený glykokalyx izolován z média, má stále velkou molekulární hmotnost, proto je pravděpodobné, že je svlékán převážně neporušený (Samuelson a Caulfield 1982). Naproti tomu Caulfield a kol. (1987) ukázali, že glykokalyx je odvrhován v partikulární formě, tedy depolymerizací glykokalyxu, protože jen malé částice a ne celé fibrily byly nacházeny v médiu po transformaci. Nelze vyvrátit, že depolymerizace je indukovaná médiem, ve kterém byla transformace prováděna *in vitro*, protože má větší iontovou sílu než voda. Druhou možností je, že parazit sekretuje látky, které depolymerizují glykokalyx. Stejní autoři navrhuje, že fibrily by mohly být fyzicky lámány mikroklky do malých podjednotek.

Po úplné ztrátě cercariálního glykokalyxu z povrchu schistosomul dochází k redukcí vazby protilátek, rezistenci protilátkově zprostředkovanému zabíjení a k rezistenci schistosomul k zabíjení alternativní cestou komplementu v nepřítomnosti protilátek. Proto ztráta glykokalyxu přispívá k imunitnímu úniku transformované schistosomuly (Samuelson a Caulfield 1985, 1986, Marikovsky a kol. 1986). Při transformaci dochází k velkým změnám ve složení povrchu, především k syntéze mnoha nových látek, např. glykoproteinů. Důkazem může být např. vazba lektinu ConA (*Canavalia ensiformis*), který se váže jen na povrch schistosomul, ale ne na povrch cercárie *S. mansoni* (podobně také u rodu *Trichobilharzia*) (Samuelson a Caulfield 1985, Horák a kol. 1998b). Schistosomuly během svého vývoje získávají molekuly hostitele (např. antigeny krevních skupin), které jim poskytují ochranu před imunitním systémem hostitele. V některých případech schistosomy syntetizují na svém povrchu glykokonjugáty, které jsou podobné hostitelským molekulám (molekulární mimikry) (Simpson a Smithers 1985, Pearce a Sher 1987, Damian 1989).

#### **4.5.2 Molekuly podílející se na odvrhování glykokalyxu**

Detekce povrchové transformace pomocí lektinů a protilátek proti hemagglutininům cercárií začíná na anteriorním konci těla cercárie, kde vyúsťují vývody penetračních žláz. Tato detekce naznačuje, že právě obsah penetračních žláz se podílí na odvrhování glykokalyxu (Marikovsky a kol. 1988a, 1990, Fishelson a kol. 1992, Horák a kol. 1998b). Tato hypotéza je podpořena časově synchronizovaným výskytem svlékání glykokalyxu, dalších „aktivátorů“ komplementu a sekrece serinových proteáz (28 kDa, 60 kDa) (Marikovsky a kol. 1988a). Většina (90-95%) proteolytické aktivity v sekretech transformujících se schistosomul je přisuzována 28 kDa proteáze, zbývající aktivita 60 kDa proteáze. 28 kDa proteáza štípe kasein, želatinu, a komplementové proteiny C3 a C3b, 60 kDa proteáza štípe kasein a želatinu (Marikovsky a kol. 1988b).

Kvalitativní analýzy materiálu z povrchu schistosomul štípaného těmito proteázami ukazují podobný fragmentární vzor, který byl pozorován v samovolně svlékaném materiálu z transformující se schistosomuly. Proto autoři navrhují, že tyto 2 proteázy přispívají k štěpení povrchových molekul transformujících se schistosomul včetně glykokalyxu a tak k urychlení transformace cercárie na schistosomulum. Jelikož se schistosomulum stává po ošetření 28 kDa proteázou méně citlivou k zabíjení komplementem, je zřejmé, že tato proteáza uvolňuje povrchové molekuly, které aktivují komplement. Štípe C3b komplementové molekuly, které se váží na povrch schistosomul a tím zabraňuje aktivaci komplementu a opsonizaci schistosom (Marikovsky a kol. 1988a).

28 kDa serinová proteáza je uvolňována i z cercárií *S. mansoni*, kde byla lokalizována za pomoci monospecifické králičí protilátky v preacetabulárních a postacetabulárních žlázách, ale i v samotném glykokalyxu (Marikovsky a kol. 1990). Prozatím není jasné, ve kterém vývojovém stádiu je proteáza začleněna do glykokalyxu. Možná během vývoje glykokalyxu uvnitř zárodečné komůrky dceřiné sporocysty (Caulfield a kol. 1988) anebo okamžitě po uvolnění cercárie z plže, kdy je 28 kDa proteáza uvolněna z penetračních žláz a integrována do glykokalyxu. Enzymy přítomné v glykokalyxu mohou katalyzovat společně se sekrečními enzymy svlékání glykokalyxu z transformujících se schistosomul. Pro schistosomy může být výhodné mít některé proteázy na nebo uvnitř glykokalyxu, protože se tak stávají nedostupné pro inhibitory proteáz (např.  $\alpha$ 1-antitrypsin), které blokují jejich činnost akci a mohou tak zabránit svlékání glykokalyxu a transformaci (Marikovsky a kol. 1988a, 1990).

U cercárií se 28 kDa proteáza podílí nejen na uvolňování glykokalyxu, ale i na degradaci proteinů pojivových tkání a tak podporuje kožní penetraci. Po transformaci a svléknutí glykokalyxu byla tato proteáza nalezena na povrchové membráně transformovaných schistosomul, které jsou rezistentní k destrukci imunitním systémem. U 28 kDa membránové proteázy byla *in vitro* prokázána degradace komplementových proteinů C3, C3b a C9, a proto by mohla podporovat *in vivo* imunorezistenci *S. mansoni* (Marikovsky a kol. 1990).

Podle některých autorů hraje důležitou roli při odvrhování glykokalyxu vápník. Předpokládají, že vápník stimuluje odstranění glykokalyxu z povrchu cercárie za pomoci proteáz, které jsou při penetraci uvolněné z penetračních žláz (Modha a kol. 1998).

Hypotéza předpokládající odvrhování glykokalyxu pomocí proteáz potvrzuje, že glykokalyx je kotven do tegumentu přes proteiny nebo polypeptidové řetězce, které mohou sloužit jako substráty sekretovaným proteázám (Marikovsky a kol. 1988a). Ale některé povrchové molekuly cercárií a schistosomul jsou kotvené do membrány tegumentu přes GPI kotvu. Tyto povrchové molekuly jsou poté nejspíše uvolňovány fosfatidylinositol-specifickou fosfolipázou (Espinoza a kol. 1988, Pearce a Sher 1989, Sauma a Strand 1990).

## 5 Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje poznatky z oblasti ultrastruktury, chemického složení, vzniku a funkcí glykokalyxu cercárií čeledi Schistosomatidae.

Glykokalyx představuje pro cercárie nepostradatelnou strukturu, která jim poskytuje ochranu před mechanickými a chemickými vlivy prostředí. Je složený z velkého množství vysoce fukosylovaných O-glykanů, které byly donedávna považované za hlavní složku glykokalyxu cercárií, avšak hmotnostní spektrometrie extraktů glykoproteinů cercárií ukazuje jako hlavní složku menší struktury O- a N- glykanů s Le<sup>x</sup> epitopem. Další nepostradatelnou součástí jsou glykolipidy s Le<sup>x</sup> a pseudo Le<sup>y</sup> epitopy. Fukosylované glykokonjugáty jsou významné v imunitní odpovědi hostitele na parazitický organizmus. Příkladem není jen glykokalyx, ale také fukosylované epitopy na vajíčkách schistosom, která jsou zachycena v tkáních hostitele, imunitní odpověď na tyto epitopy má za následek tvorbu granulomů. Detailní poznání struktury glykokalyxu a porozumění molekulárním mechanismům pomocí kterých glykokalyx ovlivňuje imunitní systém hostitele může potenciálně vést k novým terapeutickým cílům. Jako vhodným terapeutickým cílem se jeví být i fukosyltransferázy podílejících se na syntéze Le<sup>x</sup> a oligofukosylovaných řetězců glykokalyxu.

Na tuto bakalářskou práci bude navazovat má diplomová práce, která bude zaměřená na studium glykokalyxu cercárií ptačích schistosom, konkrétně druhů *T. szidati* a *T. regenti*. Dosavadní výsledky studia glykokalyxu cercárií ptačích schistom se týkají především lektinové charakterizace terminálních sacharidů glykokalyxu neboť pro kompletní analýzu glykokonjugátů je zapotřebí náročné metodiky práce. Cílem diplomové práce bude charakterizovat průběh a mechanismus svlékání glykokalyxu cercárií při transformaci na schistosmuly a studium enzymů podílejících se na odvrhování glykokalyxu (katepsin B2, dosud neidentifikované proteázy a lipázy z penetračních žláz, popř. hlavové žlázy).

## 6 Použitá literatura

### 6.1 Literární zdroje

- Ágoston K., Kerékgyártó J., Hajkó J., Batta G., Lefeber D. J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G. (2002):** Synthesis of fragments of the glycocalyx glycan of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Chemistry – A European Journal* 8: 151-161.
- Ax P. (1989):** Basic phylogenetic systematization of the Metazoa. In: Fernholm B., Bremer K., Jörnvall H. (Eds.), “The Hierarchy of Life” Nobel Symposium 70, Elsevier, Amsterdam.
- Barondes S. H. (1988):** Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences* 13: 480-482.
- Becker D. J., Lowe J. B. (2003):** Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13: 41-53.
- Benešová E., Marková M., Lipovová P., Králová B. (2005):** Fukosidasy a oligosacharidy obsahující fukosu. *Chemické Listy* 99: 324-329.
- Bennett H. S. (1963):** Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 11: 14-23.
- Blažová K., Horák P. (2005):** *Trichobilharzia regenti*: the developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* 54: 167-172.
- Boswell C. A., Yoshino T. P., Dunn T. S. (1987):** Analysis of tegumental surface proteins of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. *The Journal of Parasitology* 73: 778-786.
- Buskas T., Ingale S., Boons G. J. (2006):** Glycopeptides as versatile tool for glycobiology. *Glycobiology* 16: 113-136.
- Caulfield J. P., Cianci C. M. L., McDiarmid S. S., Suyemitsu T., Schmid K. (1987):** Ultrastructure, carbohydrate, and amino acid analysis of two preparations of the cercarial glycocalyx of *Scistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 73: 514-522.
- Caulfield J. P., Yuan H. C., Cianci C. M. L., Hein A. (1988):** *Schistosoma mansoni*: Development of the cercarial glycocalyx. *Experimental Parasitology* 65: 10-19.
- Cheng T. C., Bier J. W. (1972):** Studies on molluscan schistosomiasis: An analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 64: 129-141.
- Cousin C. E., Stirewalt M. A., Dorsey C. H. (1981):** *Schistosoma mansoni*: ultrastructure of early transformation of skin- and shear-pressure-derived schistosomules. *Experimental Parasitology* 51: 341-365.
- Cummings R. D., Nyame A. K. (1999):** Schistosome glycoconjugates. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 1455: 363-374.
- Cummings R.D., Smith D.F. (1992):** The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssays* 14: 849-856.
- Dalton J. P., Clough K. A., Jones M. K., Brindley P. J. (1997):** The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 114: 105-112.
- Dalton J. P., Lewix S. A., Aronstein W. S., Strand M. (1987):** *Schistosoma mansoni*: Immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalyx. *Experimental Parasitology* 63: 215-226.
- Damian R. T. (1989):** Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 145: 101-115.
- Daniel B. E, Presto T. M., Southgate V. R. (1992):** The *in vitro* transformation of the miracidium to the mother sporocyst of *Schistosoma margrebowiei*: changes in the parasite surface and implications for interactions with snail plasma factors. *Parasitology* 104: 41-49.
- Dolečková K., Kašný M., Mikeš L., Cartwright J., Jedelský P., Schneider E. L., Dvořák J., Mountford A. P., Craik CH. S., Horák P. (2009):** The functional expression and characterization of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology* 39: 201-211.
- Dorsey C. H. (1976):** *Schistosoma mansoni*: description of the head gland of cercariae and schistosomules at the ultrastructural level. *Experimental Parasitology* 39: 444-459.

- Dorsey C. H., Cousin C. E., Lewis F. A., Stirewalt M. A. (2002):** Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33: 279-323.
- Dresden M. H., Edlin E. M. (1975):** *Schistosoma mansoni*: calcium content of cercariae and its effects on protease activity *in vitro*. *The Journal of Parasitology* 61: 398-402.
- Drickamer K. (1988):** Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 9557-9560.
- Drickamer K. (1994):** Molecular structure of animal lectins. In: Fukuda M., Hindsgaul O. (Eds.), *Frontiers in Molecular Biology*. IRL Press, Oxford.
- Drickamer K. (1995):** Increasing diversity of animal lectin structures. *Current Opinion in Structural Biology* 5: 612-616.
- Dvořák J., Mashiyama S. T., Braschi S., Sajid M., Knudsen G. M., Hansell E., Lim K. C., Hsieh I., Bahgat M., Mackenzie B., Medzihradzky K. F., Babbitt P. C., Caffrey C. R., McKerrow J. H., (2008):** Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90: 345-358.
- Espinoza B., Tarrab-Hazdai R., Silman I., Arnon R. (1988):** Acetylcholinesterase in *Schistosoma mansoni* is anchored to the membrane via covalently attached phosphatidylinositol. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29: 171-179.
- Fawcett D. W. (1965):** Surface specializations of absorbing cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 13: 75-92.
- Ferguson M. A., Williams A. F. (1988):** Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annual Review of Biochemistry* 57: 285-320.
- Fishelson Z., Amiri P., Friend D. S., Marikovsky M., Pettitt M., Newport G., Mckerrow J. H. (1992):** *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Experimental Parasitology* 75: 87-98.
- Fox N., Damjanov I., Knowles B.B., Solter D. (1983):** Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Research* 43: 669-678.
- Furmanek A., Hofsteenge J. (2000):** Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochimica Polonica* 47: 781-789.
- Guinez C., Morelle W., Michalski J.C., Lefebvre T. (2005):** O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 765-774.
- Halkes K. M., Lefebvre D. J., Fransen C. T. M., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G. (1998):** Synthesis of the spacer-containing  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Galp moiety, representing the non-fucosylated backbone trisaccharide of the glycolyx glycan of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Carbohydrate Research* 308: 329-338.
- Harn D. A., Mitsuyama M., David J. R. (1984):** *Schistosoma mansoni*: anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine* 159: 1371-1387.
- Haas W., Schmidt R. (1982):** Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. 1. Effective substances, host specificity. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 66: 293-307.
- Havercroft J. C. (1990):** Schistosome surface protein anchors. *Parasitology Today* 6: 142.
- Helenius A., Aebi M. (2004):** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Reviews Biochemistry* 73:1019-1049.
- Hockley D. J. (1970):** An ultrastructural study of the cuticle of *Schistosoma mansoni* Sambon 1907. PhD. Thesis, University of London.
- Hockley D. J. (1973):** Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. *Advances in Parasitology* 11: 233-305.
- Hockley D. J., McLaren D. J. (1973):** *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal of Parasitology* 3: 13-25.
- Hokke C. H., Neeleman A. P., Koeleman C. A., van den Eijnden D. H. (1998):** Identification of an  $\alpha$ 3-fucosyltransferase and a novel  $\alpha$ 2-fucosyltransferase activity in cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*: biosynthesis of the Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3[Gal(NAc) $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4]GlcNAc sequence. *Glycobiology* 8: 393-406
- Horák P. (1995):** Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. *Folia Parasitologica* 42: 255-265.

- Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. (1999):** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology* 119: 577-581.
- Horák P., Grubhofer L., Mikeš L., Tichá M. (1997):** Lectins of *Trichobilharzia szidati*. *Parasite* 1: 27-35.
- Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002):** Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology* 52: 155-233.
- Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998a):** *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5: 349-357.
- Horák P., Kovář L., Kolářová L., Nebesářová J. (1998b):** Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116: 139-147.
- Horák P., Mikeš L. (1995):** Cercarial surface saccharides of six Trematode species from the pond snail, *Lymnea stagnalis*. *Parasite* 2: 419-421.
- Huang H., Tsai P., Khoo K. (2001):** Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of *Schistosoma mansoni* cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X antigen. *Glycobiology* 11: 395-406.
- Hussein A. H., Kaddah M. A., Hamadto H. H., El-Hayawan I. A., Strickland P. T., Abubaker S., Shift C. J. (1997):** *Schistosoma mansoni*: the immune response against cercarial glycocalyx. *The Journal of Parasitology* 83: 424-429.
- Kamath V. P., Hindsgaul O. (1996):** Synthesis of alpha and beta-L-Fuc p-(1→2)-alpha-L-Fuc p-(1→3)-beta-D-Gal pNAc glycosides identified as terminal of *Schistosoma mansoni* oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 280: 323-330.
- Kašný M., Mikeš L., Dalton J. P., Mountford A. P., Horák P. (2007):** Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134: 1599-1609.
- Kemp W. M. (1970):** Ultrastructure of the cercarialhüllen reaktion of *Schistosoma masoni*. *The Journal of Parasitology* 56: 713-723.
- Khoo K.-H., Sarda S., Xu X., Caulfield J. P., McNeil M. R., Homans S. W., Morris H. R., Dell A. (1995):** A unique multifucosylated-3GalNAcβ1→4GlcNAcβ1→3Galα1-motif constitutes the repeating unit of the complex O-Glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17114-17123.
- Khoo K.-H., Chatterjee D., Caulfield J. P., Morris H. R., Dell A. (1997a):** Structural characterization of glycosphingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Glycobiology* 7: 653-661.
- Khoo K.-H., Chatterjee D., Caulfield J. P., Morris H. R., Dell A. (1997b):** Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology* 7: 663-677.
- Khoo K.-H. (2001):** Structural variations in schistosomal glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13: 493-506.
- Khoo K.-H., Huang H.-H., Lee K.-M. (2001):** Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* 11: 149-163.
- Klabunde J., Berger J., Jensenius J. C., Klinkert M., Zelck U. E., Kreamsner P. G., Kun J. F. J. (2000):** *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins to cercariae and adult worms. *Experimental Parasitology* 95: 231-239.
- Köster B., Strand M. (1994):** *Schistosoma mansoni*: immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology* 108: 433-446.
- Laine R. A. (1997):** The information-storing potential of the sugar code. In: Gabius H. J., Gabius S. (Eds.), *Glycosciences: status and perspectives*. Chapman & Hall an International Thompson Publishing company.
- Linder E. (1985):** *Schistosoma mansoni*: visualization with fluorescent lectins of secretions and surface carbohydrates of living cercariae. *Experimental Parasitology* 59: 307-312.
- Löffler G., Petrides P. E. (1998):** *Optimax Biochemie und Pathobiochemie*. SpringerVerlag, Berlin.
- Loris R. (2002):** Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572: 198-208.
- Ma B., Simala-Grant J.L., Taylor D.E. (2006):** Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* 16: 158-184.

- Makaaru C. K., Damian R. T., Smith D. F., Cummings R. D. (1992):** The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes a novel type of glycosphingolipid. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 2251-2257.
- Marikovsky M., Arnon R., Fishelson Z. (1988a):** Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* 141: 273-278.
- Marikovsky M., Arnon R., Fishelson Z. (1990):** *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted pretease in cercaria. *Parasite Immunology* 12: 389-401.
- Marikovsky M., Fishelson Z., Arnon R. (1988b):** Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30:45-54
- Marikovsky M., Levi-Schaffer, Arnon R., Fishelson Z. (1986):** *Schistosoma mansoni*: killing of transformed schistosomula by the alternative pathway of human complement. *Experimental Parasitology* 61: 86-94
- Marques E. T. A., Ichikawa Y., Strand M., August J. T., Hart G. W., Schnaar R. L. (2001):** Fucosyltransferases in *Schistosoma mansoni* development. *Glycobiology* 11: 249-359.
- McKerrow J. H., Pino-Heiss S., Linquist R., Werb Z. (1985):** Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 3703-3707.
- McKerrow J. H., Salter J. (2002):** Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. *Trends in Parasitology* 18:193-195.
- McLaren D. J., Hockley D. J. (1976):** *Schistosoma mansoni*: the occurrence of microvilli on the surface of the tegument during transformation from cercaria to schistosomulum. *Parasitology* 73: 169-187.
- McLaren D. J., Hockley D. J. (1977):** Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* 269: 147-149.
- Meuleman E. A., Holzmann P. J. (1975):** The development of the primitive epithelium and true tegument in the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 45: 307-318.
- Meuleman E. A., Lyaruu D. M., Khan M. A., Holzmann P. J., Sminia T. (1978):** Ultrastructural changes in body wall of *Schistosoma mansoni* during transformation of miracidium into mother sporocyst in snail host *Biomphalaria pfeifferi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 56: 227-242.
- Mikeš L., Zídková L., Kašný M., Dvořák J., Horák P. (2005):** *In vitro* stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology Research* 96: 230-241.
- Modha J., Redman C. A., Thornhill J. A., Kusel J. R. (1998):** Schistosomes: unanswered questions on the basic biology of the host-parasite relationship. *Parasitology Today* 14:396-401.
- Moloney D. J., Haltiwanger R. S. (1999):** The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose- $\beta$ 1,3-glycosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 9: 679-687.
- Morris G. P. (1971):** The fine structure of the tegument and associated structures of the cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 36: 15-31.
- Nanduri J., Dennis J. E., Rosenberrys T. L., Mahmoud A. A. F., Tartakoffn A. M. (1991):** Glycocalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae lectin-binding, size, charge, and electron microscopic characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 1341-1347.
- Neeleman A. P., van der Knaap W. P. W and van den Eijnden D. H. (1994):** Identification and characterization of a UDP-GalNAc: GlcNAc $\beta$ -R  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4-Nacetylgalactosaminyltransferase from cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Catalysis of a key step in the synthesis of *N,N'*-diacetyllactosedi amino (lacdiNAc)-type glycans. *Glycobiology*, 4: 641-651.
- Ni Y., Tizard I. (1996):** Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 55: 205-223.
- Nyame A. K., Debose-Boyd R., Long T. D., Tsang V. C., Cummings R. D. (1998):** Expression of Le<sup>x</sup> antigen in *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* and immune responses to Le<sup>x</sup> in infected animals: lack of Le<sup>x</sup> expression in other trematodes and nematodes. *Glycobiology* 8: 615-624.
- Pearce E. J., Sher A. (1987):** Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. *Contributions to Microbiology and Immunology* 8: 219-232.
- Pearce E. J., Sher A. (1989):** Three major surface antigens of *Schistosoma mansoni* are linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. *The Journal of Immunology* 142: 979-984.

- Podhorský M., Hůzová Z., Mikeš L., Horák P. (2009):** Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp. *Acta Parasitologica* 54: 28-36.
- Pollard T. D., Earnshaw W. C., Lippincott-Schwartz J. (2008):** Cell Biology. Elsevier Inc.
- Rao V. S. R., Qasba P. K., Balaji P. V., Chandrasekaran R. (1998):** Conformation of Carbohydrates. Overseas Publisher Association.
- Robson R. T., Erasmus D. A. (1970):** The ultrastructure, based on Stereoscan observations, of the oral sucker of *Schistosoma mansoni* with special reference to penetration. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 35: 76-86.
- Robyt J. F. (1998):** Essentials of carbohydrate chemistry. Springer –Verlag New York, Inc.
- Roseman S. (2001):** Reflections on glycobiology. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 41527–41542.
- Rudolfová J., Hampl V., Bayssade-Dufour C., Loker A. E., Littlewood D. T. J., Horák P. (2005):** Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research* 95: 79-89.
- Salter J.P., Lim K.C., Hansell E., Hsieh I., McKerrow J.H., (2000):** *Schistosoma* invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 38667–38673.
- Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1982):** Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Cell Biology* 94: 363-369.
- Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1985):** The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Cell Biology* 100: 1423-1434.
- Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1986):** Cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni* activates human complement. *Infection and Immunity* 51 (1): 181-186.
- Samuelson J. C., Stein L. D. (1989):** *Schistosoma mansoni*: increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. *Experimental Parasitology* 69: 23-29.
- Sauma S. Y., Strand M. (1990):** Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 38: 199-209.
- Schauer R. (2004):** Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* 107: 49-64.
- Sharon N, Lis H. (2007):** Lectins, 2nd edition. Springer.
- Shiff C. J., Ley H. E., Kriel R. L., Cmelik S. H. W. (1972):** Influence of human skin lipids on cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni*. *The Journal of Parasitology* 58: 476-480.
- Simpson A. J. G., Smithers S. R. (1985):** Schistosomes: surface, egg and circulating antigens. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 120: 205-239.
- Srivatsan J., Smith D. F., Cummings R. D. (1992):** The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis<sup>x</sup> antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 20196-20203.
- Stein P. C., Lumsden R. D. (1973):** *Schistosoma mansoni*: topochemical features of cercariae, schistosomula, and adults. *Experimental Parasitology* 33: 499-514.
- Stick R. V. (2001):** Carbohydrates, The sweet molecules of life. Academic Press.
- Stirewalt M. A. (1963):** Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*): absence of pericercarial envelope *in vivo* and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. *Experimental Parasitology* 13: 395-406.
- Stirewalt M. A. (1974):** *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. *Advances in Parasitology* 12: 115-182.
- Stirewalt M. A., Kruidenier F. J. (1961):** Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Experimental Parasitology* 11: 191-211.
- Sunehag A., Tigas S., Haymond M. W. (2003):** Contribution of plasma galactose and glucose to milk lactose synthesis during galactose ingestion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 225–229.
- Takeda J., Kinoshita T. (1995):** GPI-anchor biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 367-371.
- Thompson D. P., Kortison D. D., Pax R. A., Bennett J. L. (1984):** Changes in glucose metabolism and cyanide sensitivity in *Schistosoma mansoni* during development. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13: 39-52.
- Turner M. W. (1996):** Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 17: 532-540.



- Tyler S., Hogge M. (2004):** Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes). *Canadian Journal of Zoology* 82: 194–210
- van Remoortere A., Hokke C. H., van Dam G. J., van Die I., Deelder A. M., van der Eijnden D. H. (2000):** Various stages of *Schistosoma* express Lewis<sup>x</sup>, LacdiNAc, GalNAc $\beta$ 1-4(Fuca1-3)GlcNAc and GalNAc $\beta$ 1-4(Fuca1-2Fuca1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology* 10: 601-609.
- Varki A. (1998):** Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Cell Biology* 8: 34-40.
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999):** Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Velupillai P., Harn D. A. (1994):** Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (Immunology)* 91: 18-22.
- Weiss J. B., Magnani J. L., Strand M. (1986):** Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *The Journal of Immunology* 136: 4275-4282.
- Wiest P. M., Kossmann R. J., Tartakoff A. M. (1989):** Determinants of surface membrane maturation during the cercarial-schistosomula transformation of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 70-77.
- Wilson R. A., Barnes P. E. (1977):** The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 74: 61-71.
- Wilson R. A. (1987):** Cercaria to liver worms: development and migration in the mammalian host In: Rollins D. (Eds): *The biology of schistosomes from genes to latrines*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Wuhrer M., Dennis R. D., Doenhoff M. J., Bickle Q., Lochnit G., Zeyer R. (1999):** Immunochemical characterization of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 103: 155-169.
- Wuhrer M., Dennis R. D., Doenhoff M. J., Lochnit G., Geyer R. (2000):** *Schistosoma mansoni*: cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. *Glycobiology* 10: 89-101.
- Xu X. F., Holm M. J., Chiu L., Devens B. H., Caulfield J. P. (1993):** The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni* is a lymphocyte mitogen. *Molecular Biology of the Cell* 4: 455a.
- Xu X. F., Stack R. J., Rao N., Caulfield J. P. (1994):** *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. *Experimental Parasitology* 79: 399-409.
- Zelck U, Becker W. (1992):** *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins, and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni* – infected snails. *Experimental Parasitology* 75: 126-136.

## 6.2 Internetové zdroje

Světová zdravotnická organizace, schistosomóza:

<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>

Světová zdravotnická organizace, schistosomóza, epidemiologická situace:

<http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en>