

UNIVERZITA KARLOVA  
**Přírodovědecká fakulta**  
**katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Markéta Černíková

**Inhibitory Kunitzova typu u *Eudiplozoon nipponicum***  
Kunitz-type inhibitors in *Eudiplozoon nipponicum*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

**Praha 2021**

## **Prohlášení:**

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

**V Praze dne 10. 08. 2021**

.....

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Liboru Mikešovi, Ph.D. za odborné vedení a veškerou pomoc s dokončením této práce. Dále děkuji Hance Dvořákové za pomoc a trpělivost v počátečních experimentech. A hlavně chci poděkovat všem, kteří mi poskytli podporu a čas na dokončení práce, především svému manželovi a mamince. A děkuji Petrovi, že poslední noc dlouho spal.

## Abstrakt

Proteiny obsahující Kunitz domény jsou nejčastěji inhibitory serinových proteáz. Jejich obecnou charakteristikou je přítomnost tří disulfidových vazeb a relativně malá velikost kolem 6–10 kDa, ale nezdědka se objevují velké proteiny s několika Kunitz doménami nebo jsou tyto domény součástí komplexnějších proteinů. Jejich funkce obvykle souvisí s regulací fyziologických a proteolytických procesů, ale i s interakcí s patogeny nebo jinými obrannými mechanismy, např. jako součást hlenu sasanek nebo jedu hadů a jiných bezobratlých živočichů.

Zaměřili jsme se na Kunitz proteiny u *Eudiplozoon nipponicum*, parazita třídy Monogenea ze žaber kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V transkriptomu tohoto parazita bylo identifikováno na základě podobnosti s již popsaným Kunitz proteinem *EnKT1* několik dalších podobných sekvencí, z čehož lze usuzovat, že tento parazit využívá pro svou specifickou potravní strategii, podobně jako i jiní krevsající paraziti, celou sadu inhibitorů serinových proteáz s různými konkrétními funkcemi.

Pomocí PCR bylo několik sekvencí s Kunitz doménou nalezených v transkriptomu ověřováno a případně doplněno pomocí RACE-PCR. Jeden protein, nazvaný *EnKC1*, byl následně produkován rekombinantně expresí v buňkách bakterie *E. coli* kmenů SHuffle<sup>TM</sup> a Rosetta Gami B.

U rekombinantního proteinu s Kunitz doménou byla zjištěna inhibiční aktivita proti chymotrypsinu (ve shodě se specifitou determinovanou určující aminokyselinou v aktivním místě domény) a faktoru Xa. Naopak žádný vliv nebyl pozorován na thrombin, kallikrein a plasmin, ani na funkci rybího či lidského komplementu při lyzi králičích erytrocytů.

Nově charakterizovaný protein z parazita *E. nipponicum* má v porovnání s předchozím *EnKT1* jinou specifitu, je tzv. chymotrypsin-like, tedy inhibuje chymotrypsin, a dále nemá tak široké spektrum účinku. Mohl by se však podílet na schopnosti parazita zabránit srážení krve při sání na kapřích žábrách nebo při jejím zpracování ve střevě.

**Klíčová slova:** Kunitz, antikoagulant, rekombinantní protein, Diplozoidiae, inhibitor, peptidáza, proteáza, chymotrypsin, faktor X

## Abstract

Proteins containing Kunitz domain are mostly inhibitors of serine proteases. Their general characteristic is the presence of three disulfide bonds and small sizes around 6–10 kDa, although sometimes they consist of several Kunitz domains or they are part of more complex proteins. Their function is usually related to the regulation of physiological and proteolytic processes, but also to an interaction with pathogens or other defense mechanisms, such as being part of the sea anemone mucus or the venom of snakes and other invertebrates.

We focused on Kunitz proteins in *Eudiplozoon nipponicum*, a helminth of the class Monogenea parasiting on gills of common carp (*Cyprinus carpio*). In the transcriptome of this parasite, several sequences with Kunitz domain have been identified based on similarities with the one already described Kunitz protein, *EnKT1*, suggesting that this parasite, like other bloodfeeding parasites, uses a whole set of these serine protease inhibitors with other specific functions.

Several sequences with the Kunitz domain found in the transcriptome were verified by PCR and optionally supplemented by RACE-PCR. One protein, called *EnKC1*, was subsequently produced by recombinant expression in *E. coli* cells of SHuffle™ and Rosetta Gami B strains.

Recombinant protein with the Kunitz domain was found to have inhibitory activity against chymotrypsin (in accordance with the specificity determining aminoacid at the active site of the domain) and factor Xa. In contrast, no effect was observed on thrombin, kallikrein and plasmin, nor on the function of fish or human complement in the lysis of rabbit erythrocytes.

The newly characterized protein from the parasite *E. nipponicum* has a different specificity compared to the previously described *EnKT1*. It is so-called chymotrypsin-like, ie it inhibits chymotrypsin, and furthermore it does not have such a wide spectrum of action like *EnKT1*. However, it could contribute to the ability of blood intake when sucking on carp gills or processing it in the intestine of the parasite.

**Key words:** Kunitz, anticoagulant, recombinant protein, Diplozoidae, inhibitor, peptidase, protease, chymotrypsin, factor X

# Obsah

Seznam zkratk	3
Úvod a cíle práce	4
1 Literární úvod	5
1.1 Struktura Kunitz proteinů skupiny I2	5
1.2 Vztah struktury a funkce	7
1.2.1 Blokování iontových kanálů	7
1.2.2 Inhibice (serinových) proteáz	8
1.2.2.1 Inhibované proteázy	8
1.2.2.2 Mechanismus inhibice	10
1.3 Biologické funkce	11
1.3.1 Parazitární Kunitz proteiny	12
1.3.1.1 Kunitz proteiny klíš'at	12
1.3.1.2 Kunitz proteiny helmintů	14
1.4 Praktické využití/význam	16
2 Materiál a metodika	18
2.1 Sběr biologického materiálu	18
2.2 Bioinformatická analýza transkriptomu <i>E. nipponicum</i>	18
2.3 Izolace RNA	18
2.4 Syntéza ss cDNA	18
2.5 Úprava RNA pro RACE-PCR	19
2.6 PCR a elektroforéza	19
2.7 Extrakce z gelu	21
2.8 Ligace do vektoru pGEM®-T	21
2.9 Transformace do kompetentních buněk <i>E. coli</i>	22
2.9.1 PCR test kolonií	22
2.9.2 Izolace a purifikace plazmidu	22
2.10 Analýzy sekvencí z plazmidů	23
2.11 Expres rekombinantního proteinu	23
2.11.1 Vektor a bakteriální kmeny	23
2.11.1.1 Transformace vektoru do kompetentních buněk	23
2.11.2 Kultivace a exprese	23
2.11.3 Čištění solubilní fáze	24
2.11.4 Zpracování peletu obsahujícího inkluzní tělíska	24
2.12 Purifikace rekombinantního proteinu	24
2.12.1 Chromatografické metody	25
2.12.2 Niklová afinitní chromatografie (Immobilized Metal Affinity Chromatography – IMAC)	25
2.12.3 Iontově výměnná chromatografie	25

2.13	Měření koncentrace proteinů.....	25
2.14	Analýza frakcí na přítomnost rekombinantních proteinů.....	25
2.14.1	Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE.....	25
2.14.2	Hmotnostní spektrometrie.....	26
2.14.3	Detekce His-tagovaných rekombinantních proteinů na blotu.....	26
2.15	Testování schopnosti rekombinantních proteinů inhibovat komplement v séru.....	26
2.15.1	Biologický materiál.....	26
2.15.2	Test inhibice komplementu.....	26
2.16	Test inhibiční aktivity proti vybraným proteázám.....	27
2.17	Test stability komplexu rEnKC1-chymotrypsin a rEnKC1-FXa.....	27
3	Výsledky.....	28
3.1	Bioinformatická analýza transkriptomu <i>E. nipponicum</i> a sekvencí z plazmidů.....	28
3.2	Purifikace rekombinantního proteinu.....	30
3.2.1	Prepurifikace proteinů pomocí IMAC.....	30
3.2.2	Purifikace pomocí IMAC.....	30
3.2.3	Iontově výměnná chromatografie.....	32
3.3	Testování získaných vzorků na přítomnost rekombinantních proteinů.....	33
3.3.1	Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE.....	33
3.3.2	Hmotnostní spektrometrie.....	33
3.3.3	Detekce na blotu.....	34
3.4	Testování schopnosti rekombinantních rEnKT1 a rEnKC1 inhibovat komplement v séru.....	34
3.5	Test inhibiční aktivity rEnKC1 proti vybraným proteázám.....	34
3.6	Test stability komplexu rEnKC1-chymotrypsin a rEnKC1-FXa.....	36
4	Diskuse.....	37
4.1	Bioinformatická analýza sekvencí Kunitz proteinů <i>E. nipponicum</i> .....	38
4.2	Exprese a purifikace rEnKC1.....	40
4.3	Inhibiční testy.....	41
5	Závěr.....	44
6	Seznam literatury.....	45
6.1	Online zdroje.....	56
7	Příloha č. 1.....	57
8	Příloha č. 2.....	60
9	Příloha č. 3.....	63
10	Příloha č. 4.....	65
11	Příloha č. 5.....	67

# SEZNAM ZKRATEK

(r)EnKT1	(rekombinantní) <i>Eudiplozoon nipponicum</i> Kunitz trypsin inhibitor 1
(r)EnKC1	(rekombinantní) <i>Eudiplozoon nipponicum</i> Kunitz chymotrypsin inhibitor 1
KTT	kunitz type toxin
sig.	signální
ntd	nukleotidy
Mw	molekulová hmotnost
pI	izoelektrický bod
aa (AA)	aminokyselina
RSL	reactive site loop
AMP	Ampicillin sodium salt
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactoside
rpm	otáčky za minutu
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TGS	Tris-Glycine-SDS pufr pro elektroforézu
PBS	Phosphate Buffered Saline
kDa	kilo Dalton; atomová hmotnostní konstanta
SOC	Super Optimal Broth, kultivační médium

# ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Kunitz proteiny jsou jednou z nejstudovanějších skupin inhibitorů proteáz, neboť se nacházejí v celé škále eukaryotických organismů a díky svým vlastnostem představují nejen vhodný cíl pro podrobné studium k pochopení principů mnoha fyziologických i patologických procesů a interakcí patogen – hostitel, ale také nabízejí potenciál užití ve farmakologii.

Tato práce přispívá k rozšíření poznatků o Kunitz proteinech krevsajících parazitů, jejichž specifický způsob příjmu potravy s sebou nese potřebu vypořádat se především s imunitními reakcemi a reakcemi zabraňujícími ztrátám krve hostitele. Zánětlivé procesy, koagulační kaskáda a reakce komplementu jsou předními známými cíli těchto inhibitorů především serinových proteáz, neboť právě v těchto procesech jsou serinové proteázy zapojeny v udržování stálosti vnitřního prostředí (hostitelského) organismu.

*Eudiplozoon nipponicum* (Goto, 1891) je ektoparazitický helmint čeledi Diplozoidae (třída Monogenea) s přímým vývojem vázaným na vodní prostředí. V dospělosti saje krev na žábách karasů (*Carassius* sp.) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (Matějusková *et al.*, 2001). V této souvislosti je ovšem nutné zmínit recentní práci, která izoláty *E. nipponicum* z kaprů přerazuje do nového druhu *E. kamegaii* a izolátům z karasů (typový hostitel) ponechává jméno *E. nipponicum* (Nishihira a Urabe, 2020). Nicméně, v této práci se přidržím jména *E. nipponicum*, a to zejména z toho důvodu, že veškeré biochemické a molekulární práce (týkající se pouze izolátů z ČR) byly publikovány s původním názvem organismu. Kromě toho, izoláty použité v této studii nebyly sekvenovány, což neumožňuje srovnání se sekvenčními daty výše zmíněných autorů.

*E. nipponicum* obvykle nezpůsobuje u závažné patologie, pouze u menších ryb byla popsána hypochromní mikrocytická anemie (Kawatsu, 1978). Studium tohoto parazita na biochemické úrovni, včetně interakcí s hostitelem, je oproti objektivně významnějším krevsajícím parazitům v počátcích. Analýzy transkriptomu a sekretomu *E. nipponicum* však dokazují přítomnost řady proteinů potenciálně se účastnících regulace hostitelské imunitní odpovědi, koagulační kaskády a zánětlivých procesů (Vorel *et al.*, 2021). Kunitz inhibitory jsou nanejvýš pravděpodobně také zapojeny v těchto reakcích, jak bylo např. potvrzeno u prvního charakterizovaného Kunitz proteinu z tohoto druhu parazita, nazvaného *EnKT1* (*Eudiplozoon nipponicum* Kunitz trypsin inhibitor 1) (Jedličková *et al.*, 2019). Cílem této práce bylo najít a charakterizovat další z těchto proteinů, neboť variabilita Kunitz proteinů souvisí i se spektrem inhibovaných proteáz a spektrem dalších vlastností majících vliv na homeostázu hostitelského organismu i fyziologické funkce parazita.

Pro tuto práci byly vytyčeny následující cíle:

1. Vytipování dalších potenciálních Kunitz proteinů z transkriptomové databáze *E. nipponicum*.
2. Ověření sekvencí DNA kódujících potenciální Kunitz proteiny pomocí PCR a Sangerova sekvenování.
3. Exprese vybraného Kunitz proteinu v rekombinantní podobě v buňkách *E. coli*.
4. Charakterizace inhibičních vlastností rekombinantního proteinu:
  - a. Schopnost rekombinantního proteinu inhibovat rybí/lidský komplement.
  - b. Schopnost rekombinantního proteinu inhibovat vybrané serinové proteázy zapojené např. v regulaci hemostáze a zánětu.



# 1 LITERÁRNÍ ÚVOD

Proteiny označované jako „Kunitz inhibitor“, či „inhibitor Kunitzova typu“ (Kunitz domain proteins or inhibitors) tvoří velkou rodinu inhibitorů serinových proteáz. Serinové proteázy jsou regulační proteiny vyskytující se u všech živých organismů a participují na řadě biologických funkcí, jako jsou například zánětlivé a další imunitní reakce, srážení krve, trávení, tkáňové remodelace, invaze parazitů do hostitele/buňky atd. (např. review Shigetomi *et al.*, 2010; Ranasinghe *et al.*, 2015). Zároveň však mohou za určitých okolností svými účinky pro organismus představovat významné riziko. Proto jsou inhibitory těchto proteáz důležitými regulátory fyziologických funkcí (Laskowski & Kato, 1980). Proteiny označované jako Kunitz (Kunitzova typu apod.) jsou řazeny do dvou skupin. Jedná se o skupiny I2 a I3 (dle databáze MEROPS; Rawlings *et al.*, 2018). Skupina I3 jsou především proteiny původem z rostlin charakterizované dle proteinu izolovaného ze sóji (Kunitz, 1946). Od následující skupiny se kromě výskytu a funkce liší především strukturně (Rawlings *et al.*, 2004).

Skupina I2 je zastoupená prvním definovaným inhibitorem tohoto typu, inhibitorem trypsinu izolovaným z hovězí slinivky (bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI), později pojmenovaným aprotinin (Kunitz & Northrop, 1936). Pro tento ikonický protein byla dále jako první z dané skupiny získána proteinová sekvence (Kassell & Laskowski, 1965), trojrozměrná struktura pomocí krystalografie (např. Huber *et al.*, 1975; Rühlmann *et al.*, 1973) a byl také jako první uměle syntetizován (Noda *et al.*, 1971). Následující přehled se blíže zabývá pouze touto skupinou inhibitorů, do níž patří i námi studované proteiny.

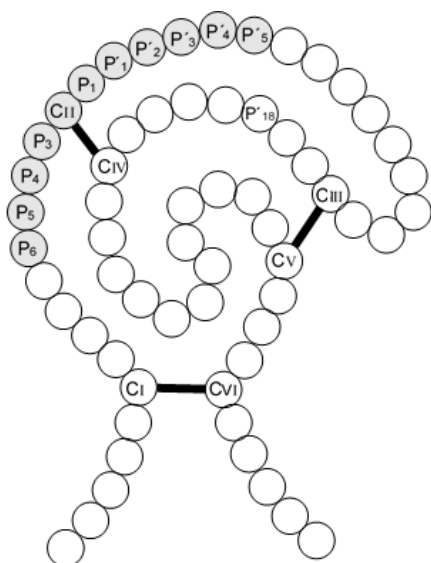
Kunitz proteiny byly popsány u většiny významných skupin organismů, kromě archeí (Archaea) a hub (Fungi) (Rawlings *et al.*, 2004). Ze živočichů lze jako významné zástupce jmenovat sasanky, u kterých je nalézáno značné množství Kunitz proteinů s neobvyklou funkcí (např. Gladkikh *et al.*, 2012; Schweitz *et al.*, 1995; Wunderer *et al.*, 1981), stejně jako v jedu jiných bezobratlých – např. štírů, pavouků, plžů. Velkou skupinu tvoří také hematofágní parazité, jejichž Kunitz proteiny jsou spojované právě se specifickým způsobem zdroje obživy. U obratlovců mají Kunitz proteiny, kromě jedů (hlavně hadích - např. Tasoulis & Isbister, 2017) a sekretů tělesného povrchu (Dong *et al.*, 2019), většinou funkci regulační. Byly popsány u ryb (např. Bathige *et al.*, 2015), ptáků (např. Nile *et al.*, 2005) i savců (např. Ascenzi *et al.*, 2003; Wun *et al.*, 1988). Kromě hadích jedů a lidských regulačních proteinů však nejsou obratlovčí Kunitz proteiny příliš studovány.

## 1.1 Struktura Kunitz proteinů skupiny I2

Obecnou charakteristikou Kunitz proteinů skupiny I2 je většinou relativně malá velikost (60–80 aminokyselinových zbytků), jedna aktivní doména a stabilizace pomocí 3 disulfidických můstků rozložených v sekvenci v typické topologii (Kunitz & Northrop, 1936; Laskowski & Kato 1980; Pritchard & Dufton, 1999), čímž se také zásadně liší od výše jmenované skupiny převážně rostlinných inhibitorů I3 (180 aminokyselinových zbytků a 2 disulfidické můstky; Laskowski & Kato, 1980).

Sekvence aminokyselin formující primární strukturu sleduje u Kunitz proteinů jistý vzorec s několika více či méně konzervovanými místy. Aktivní smyčka Kunitz domény vázající se do aktivního místa proteázy na základě strukturní podobnosti s přirozeným substrátem, je definována centrálním úsekem P6–P5' (Chand *et al.*, 2004; S. Ranasinghe & McManus, 2013). Za inhibici určitých proteáz je

zodpovědné především okolí aktivního místa P1 a P1' (Krowarsch *et al.*, 2003), vliv má však i širší okolí, kdy vazbu na proteázu mohou jiné aminokyseliny posilovat či oslabovat (Ascenzi *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2008). Fenylalanin v pozici P18 figuruje jako stabilizátor vazby, pokud je přítomen (Obr. 1).



**Obr. 1** Struktura domény Kunitz proteinu (Chand *et al.*, 2004, upraveno). Aminokyseliny aktivního místa P6-P5' jsou vyznačeny šedě, cysteiny tvořící disulfidické můstky jsou označeny CI-CVI.

Primární struktura Kunitz inhibitorů je napříč všemi doposud popsanými zástupci neobvykle variabilní. Malé změny v aminokyselinové sekvenci mohou zásadně ovlivňovat jak sílu inhibujícího účinku, tak i samotnou specifitu k proteáze (případně jinému proteinu) (např. Chand *et al.*, 2004; Grzesiak *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu není neobvyklé, že jeden organismus disponuje větším množstvím velmi podobných Kunitz proteinů, které mohou mít různé funkce (např. González *et al.*, 2009).

Sekundární/terciární strukturu standardního Kunitz proteinu lze porovnávat se strukturou popsanou u BPTI. Jedná se o jeden zakřivený skládaný  $\beta$ -list uchycený ve smyčce pomocí disulfidických můstků s krátkými  $\alpha$ -helixy na koncích. Drobné modifikace v tomto základním motivu pak mohou vést ke změně funkce proteinu až do takové míry, že ztrácí svou inhibiční schopnost vůči proteázám, a přesto je stále řazen mezi Kunitz-like proteiny (např. Paesen *et al.*, 2009).

Disulfidické můstky obecně proteinům zajišťují vyšší stabilitu a formují reaktivní smyčku (Creighton, 1984). Zpravidla 6 cysteinových zbytků vyskytujících se ve struktuře Kunitz domény je označováno CI–CVI a disulfidické vazby se tvoří v charakteristické topologii CI-CVI, CII-CIV a CIII-CV (Obr. 1).

Výše popsané charakteristické znaky nejsou však díky širokému spektru Kunitz proteinů stoprocentně konzervované. Velikost proteinu může zásadně narůst s vyšším počtem aktivních domén, které mohou být 2, 3, nebo jich může být i mnohem více, jako v případě hlístice *Ancylostoma caninum*, jejíž Kunitz protein obsahuje 12 domén, přičemž ne všechny musí být vždy funkční ve smyslu inhibice proteáz (Hawdon *et al.*, 2003). Kunitz domény také mohou být jen součástí většího proteinu s jinými doménami (např. Nile *et al.*, 2005).

Typická trojice disulfidických můstků také není naprostou samozřejmostí. Inhibitory serinových proteáz z hlístice *Ascaris suum* mají zcela odlišnou topologii, navíc v počtu pěti párů cysteinů (Bernard & Peanasky, 1993). Podobnost dalších Kunitz proteinů s touto zvláštností vedlo k vytvoření celé skupiny Kunitz proteinů typu *Ascaris*.

Conkunitzin, Kunitz protein z jedu mořského měkkýše *Conus striatus*, obsahuje jenom 4 cysteiny. Třetí vazba je zastoupena pouze molekulárními interakcemi (van der Waalsovy síly) a sítí vodíkových můstků, které ji však zřejmě mohou plně nahradit (Dy *et al.*, 2006). Přestože tento protein ztratil svou původní funkci inhibitoru, získání nové funkce (blokace iontových kanálů) pravděpodobně s touto anomálií přímo nesouvisí, neboť experimenty s modifikovaným BPTI potvrdily, že vazba cysteinů CII-CIV není pro správnou konformaci molekuly za přirozených podmínek zásadní a protein se i bez ní složí správně (Marks *et al.*, 1987).

Některé Kunitz proteiny obsažené v jedech členovců zase mají sice 6 cysteinů, topologie disulfidických můstků však klasickému modelu neodpovídá, a přesto jsou silným inhibitorem serinových proteáz (Yuan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011).

## 1.2 Vztah struktury a funkce

Inhibice serinových proteáz je zřejmě evolučně původní funkcí Kunitz proteinů (Pritchard & Dufton, 1999). Drobné mutace v aminokyselinové sekvenci vedou ke změně specifity nebo síle účinku, vznikly však celé podrodiny Kunitz proteinů, které mutacemi mimo aktivní místo získaly novou funkci – blokují iontové kanály.

### 1.2.1 Blokování iontových kanálů

Malé peptidy, řazené díky podobnosti ve struktuře do skupiny Kunitz proteinů, jsou nalézány v sekretech mnoha bezobratlých i obratlovců. Jedná se o jedy a slizové ochranné vrstvy na pokožce. U těchto Kunitz proteinů dochází v evoluci ke změnám funkce, a to v natolik průběžném měřítku, že se zde mohou nalézat Kunitz proteiny jako inhibitory proteáz, ale i Kunitz proteiny současně různou měrou blokující iontové kanály (Kodama *et al.*, 2020; Tasoulis & Isbister, 2017), a nakonec také Kunitz proteiny, které již funkci inhibice proteáz zřejmě ztratily a již mají pouze účinek právě na iontové kanály.

Kunitz proteiny zvané dendrotoxiny, které se nalézají v hadích jedech, jsou typické specifické blokátory iontových kanálů (Harvey & Robertson, 2004), nicméně stále není vyloučené, že některé z nich jsou také schopné inhibovat nějakou serinovou proteázu, se kterou jen nebyly zatím testované, jak už bylo jednou potvrzeno (Yang *et al.*, 2014). Novou funkci malého peptidu zapříčinily pouze drobné změny v oblasti N-konce aminokyselinové sekvence, případně změny v  $\beta$ -listu (Katoh *et al.*, 2000). Určitý KTT (Kunitz type toxin) jedu pavouka *Ornithoctonus huwena* má schopnost jak inhibice serinových proteáz, tak blokování iontových kanálů. Bodovými mutacemi bylo zjištěno, že pro funkci blokování iontových kanálů je esenciální jedna určitá aminokyselina – Leu6. Mutanti v této pozici o danou funkci částečně nebo úplně přišli. Nemělo to však žádný vliv na funkci inhibice proteáz. Tyto dvě vlastnosti jsou tedy v rámci molekuly peptidu pozičně oddělené, a proto mohlo v evoluci docházet k postupnému přidání nové funkce a posléze ztrátě té původní, aniž by docházelo k zásadní změně v sekundární či terciární struktuře (Yuan *et al.*, 2008). Díky obecné strukturální podobnosti patří

dendrotoxiny mezi Kunitz proteiny, ačkoliv již proteázy (pravděpodobně) neinhibují (Dreyer, 1990; Dufton, 1985).

Oddělenost dvou funkčních oblastí v rámci jedné proteinové struktury umožňuje selekci ve dvou směrech. KTT v jedech pavouků jsou silnější inhibitory proteáz v porovnání s BPTI, jejich schopnost blokovat iontové kanály je slabá (Yuan *et al.*, 2008). Naopak u hadích jedů je silnější tlak na blokování iontových kanálů, proto se zde objevují právě výše zmíněné dendrotoxiny. Hadi mají evidentně vyšší evoluční nároky na efektivitu vlastních obranných mechanismů, protože blokáce iontových kanálů zvyšuje destrukční účinek jedu (Fry, 2005).

První KTT byl popsán z hada (Strydom, 1973). Právě v jedech hadů čeledi Elapidae je nalézáno značné množství Kunitz proteinů, které jsou součástí jedových koktejlů složených z desítek proteinových rodin. Inhibitory proteáz zde zřejmě plní i jistou ochrannou funkci ostatních složek (Župunski *et al.*, 2003). Přestože Kunitz proteiny tvoří obvykle jen pár procent z celkového složení, v jedu mamby černé (*Dendroaspis polylepsis*) je to celých 61 % (Dufton, 1985; Tasoulis & Isbister, 2017).

Další blokátory iontových kanálů z Kunitz rodiny byly nalezeny např. v jedech zmijovitých hadů (Banijamali *et al.*, 2019), pavouků (Yuan *et al.*, 2008), štírů (Chen *et al.*, 2013), mořského plže *Conus striatus* (Bayrhuber *et al.*, 2005; Dy *et al.*, 2006), ve slinách klíštěte *Rhipicephalus microplus* a *R. appendiculatus* (Lima *et al.*, 2010; Paesen *et al.*, 2009), v exkrementech-sekrecích produktech tasemnice *Echinococcus granulosus* (Fló *et al.*, 2017) a početná skupina byla popsána z povrchového slizu mořských sasank (např. Schweitz *et al.*, 1995; Sintsova *et al.*, 2018; Wunderer *et al.*, 1981). Tyto zvláštní popsané skupiny peptidů dostávají některé vlastní specifické názvy: dendrotoxiny (hadí jedy),  $\delta$ -KTx (štíří jedy), konkunitzin (homolice *Conus striatus*) nebo kalicludiny (mořské sasanky).

V naprosté většině se tyto Kunitz proteiny zaměřují na draslíkové kanály. Výjimkou je dvojice peptidů tasemnice *E. granulosus* blokující pH-dependentní sodíkové kanály (Fló *et al.*, 2017) a lidský bikunin blokující nenapěťové kanály reagující na hladinu vápenatých kationtů (Delaria *et al.*, 1997). Nejběžněji lze tyto kanály nalézt na cytoplazmatických membránách nervových buněk, proto zmíněné jedy působí nejčastěji jako neurotoxiny. Draslíkové kanály mají zásadní roli i při koagulaci a fibrinolyzi. Jednotlivé Kunitz proteiny blokující iontové kanály jsou specifické na konkrétní typ draslíkového kanálu, čehož se využívá ke studiu funkcí těchto kanálů ve fyziologii a patofyziologii (Chen *et al.*, 2013; Harvey, 2001).

## 1.2.2 Inhibice (serinových) proteáz

Značné množství různých Kunitzových inhibitorů serinových proteáz bylo rozděleno dle strukturní podobnosti, pozice reaktivní smyčky a mechanismu inhibice (Laskowski & Kato, 1980). Kunitz proteiny fungují především jako reverzibilní kompetitivní inhibitory serinových proteáz. Reaktivní smyčka – tzv. RSL („reactive-site loop“) domény Kunitz proteinů se zasouvá do aktivního centra proteázy obdobně jako její přirozený substrát (Bode & Huber, 1993; Pasqualoto *et al.*, 2014). V jiných případech interaguje s aktivním místem proteázy N-konec inhibitoru a dochází k silným sekundárním interakcím obou proteinů. Takové inhibitory pak bývají specifické k jiným proteázám, než je obvyklé (Wei *et al.*, 1998).

### 1.2.2.1 Inhibované proteázy

Kunitz proteiny inhibují především proteázy z rodiny S1, které se na základě specifické aminokyseliny v aktivním místě dělí na trypsin-like (podobné trypsinu), chymotrypsin-like (podobné chymotrypsinu)

a elastase-like (podobné elastáze) (dle databáze MEROPS; Rawlings *et al.*, 2018). V souvislosti s tímto rozdělením se Kunitz inhibitory označují jako trypsin-like (inhibující trypsin) a chymotrypsin-like (inhibující chymotrypsin), nicméně toto rozdělení jednoznačně neznamená, že daný je účinný pouze na vybrané (např. trypsin-like) proteázy.

Jelikož specifitu proteázy určuje konkrétní aminokyselina v aktivní smyčce, je možné specifitu inhibitoru též odhadnout dle výskytu jistých aminokyselin v pozici P1. Pro Kunitz proteiny inhibující trypsin je v místě P1 typický arginin (R) nebo lysin (K). Leucin (L) se objevuje u Kunitz proteinů inhibujících chymotrypsin, nebo u těch, které inhibují obě dané proteázy, ale i těch, které naopak neinhibují ani jednu z nich. Kromě uvedených nejčastějších aminokyselin se v místě P1 objevuje několik dalších ojedinělých mutací. Účinek Kunitz proteinu na konkrétní proteázy tak nelze s jistotou odhadnout pouze na základě známé sekvence, a především vliv na jiné proteázy než samotný trypsin a chymotrypsin je nutně experimentálně ověřit. Označení trypsin-like a chymotrypsin-like tedy nerozděluje proteiny do dvou oddělených kategorií.

Další proteázy, které jsou Kunitz proteiny často inhibované, jsou např. elastáza, kallikrein, faktor X, plasmin, v menší míře trombin, serinové katepsiny, popř. i další. Tab. 1 ukazuje, že daný Kunitz protein může inhibovat různé serinové (i cysteinové) proteázy i iontové kanály bez ohledu na aminokyselinu v pozici P1.

Dle samotné sekvence aminokyselin reaktivní smyčky Kunitz proteinu nemůžeme přesně určit, jaké proteázy je protein schopen inhibovat. Jak bylo prokázáno v mnoha studiích (např. Grzesiak *et al.*, 2000), každá bodová mutace v okolí P1 a P1' může vést ke snížení, zvýšení i ztrátě inhibiční schopnosti, případně i k získání funkce nové. V určité míře je možné Kunitz proteiny rozdělit do skupin dle podobnosti sekvencí (tzv. klastrů na základě homologie), a v rámci těchto skupin lze vyzorovat podobnější vlastnosti (Pritchard & Dufton, 1999). Jednotlivé proteiny z takovýchto skupin však pocházejí i ze zcela nepříbuzných živočichů, což znamená, že v evoluci Kunitz proteiny mutují poměrně rychle a snadno, a tak dochází k funkční konverzi.

Navzdory původnímu předpokladu, že Kunitz proteiny jsou výhradně inhibitory serinových proteáz, jsou již známy také, které inhibují cysteinové proteázy, nebo dokonce obojí (Kodama *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2016). Rekombinantní proteiny s bodovými mutacemi prokázaly, že za vazbu na cysteinové proteázy může být zodpovědná jediná aminokyselina – v případě Kunitz proteinu FhKT1.1 inhibujícího výhradně katepsiny (včetně cysteinové proteázy katepsinu L) se jedná o arginin v místě P4' (Smith *et al.*, 2020). Zároveň popsána inhibice nikoliv reaktivní smyčkou, ale N-koncem (viz kap. 1.2.2.2 Mechanismus inhibice), nebo získání nové funkce – blokování iontových kanálů, vede k závěru, že variabilita účinků Kunitz proteinů může být mnohem větší, než zjišťujeme omezeně cílenými pokusy.

**Tab. 1 Kunitz proteiny a jejich inhibiční aktivity.** Vybrané Kunitz proteiny (pro kompletní tabulku viz Přílohu 2) jsou rozděleny do skupin dle aminokyseliny v pozici P1. Červené pole = inhibitor byl testován s negativním výsledkem; zelené pole = inhibitor byl testován s pozitivním výsledkem, modré pole = potvrzená inhibice iontových kanálů.

název	zdrojový organismus	trypsin	chymotrypsin	FXa	elastáza	kallikrein	plasmin	cathepsin G/K	cathepsin L	trombin	iontové kanály	aa v P1				
												Arg (R)	Lys (K)	Leu (L)	jiné	
Ra-KLP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>												R			
Bikunin	<i>Homo sapiens</i>												R			
En KT1	<i>Eudiplozoon nipponicum</i>												R			
FhKT1.3	<i>Fasciola hepatica</i>												R			
disagregin	<i>Ornithodoros moubata</i>												R			
Amblin	<i>Amblyomma hebraeum</i>													K		
HNTX-XI	<i>Ornithoconus sp.</i>													K		
TdPI	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>													K		
NNAh	<i>Naja naja</i>													K		
dendrotoxin	<i>Dendroaspis sp.</i>													K		
Fh-KTM	<i>Fasciola hepatica</i>														L	
Eg KI-1	<i>Echinococcus granulosus</i>														L	
Eg KU-3	<i>Echinococcus granulosus</i>														L	
C/E-1	<i>Ascaris suum</i>														L	
FhKT1.2	<i>Fasciola hepatica</i>														L	
TAP	<i>Ornithodoros moubata</i>															D
savignin	<i>Ornithodoros kalahariensis</i>															E
BmCI	<i>Rhipicephalus microplus</i>															Y
AceKI-1	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>															M
bicolin	<i>Vespa bicolor</i>															Q
Eg KU-1	<i>Echinococcus granulosus</i>															Q
conkunitzin	<i>Conus striatus</i>															T

### 1.2.2.2 Mechanismus inhibice

Kunitz proteiny obecně patří do skupiny kompetitivních inhibitorů (Laskowski & Kato, 1980). Jejich smyčka aktivní domény funguje podobně jako substrát pro cílovou proteázu, přičemž silná nekovalentní vazba nevede ke strukturálním změnám a časem dochází k její disociaci. Vazebné místo proteázy pro substrát je tak po určitý čas blokováno, a proto nedochází k zastavení reakce, ale pouze k jejímu zpomalení. Variace aminokyselin v aktivním místě pak představují různé konformace aminokyselinových zbytků, které interagují s okolím aktivního místa proteázy a ovlivňují vazebnou konstantu komplexu pro určitou proteázu (Grzesiak *et al.*, 2000).

Jiným způsobem však funguje TAP faktor inhibující fXa, a také ornithodorin a další ortologní proteiny inhibující trombin (Mans *et al.*, 2008). Do aktivního místa proteázy se neváže smyčka aktivní domény těchto Kunitz proteinů, ale jejich N-konec (Van De Locht *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998), případně další části proteinu mimo Kunitz domény (Mans *et al.*, 2002b). Dochází k nekompetitivní inhibici, které se účastní i široké okolí této aktivní oblasti inhibitoru, a dochází tak k velmi silné vazbě. U těchto Kunitz proteinů zatím ani nebyla odhalena reakce s jinou proteázou, takže tento mechanismus inhibice je zřejmě zcela specifický. Stejným způsobem funguje i hirudin inhibující trombin, ten však nepatří mezi Kunitz proteiny. Boophilin, jiný Kunitz protein, také inhibuje trombin, ale naopak C-koncem, i když slaběji – možná také proto, že je schopný, na rozdíl od výše zmíněných zástupců,

inhibovat více proteáz (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008). Dá se tedy říci, že tento zatím málo prozkoumaný způsob inhibice je typický pro některé krevsající parazity, konkrétně klíšťata (Krowarsch *et al.*, 2003).

### 1.3 Biologické funkce

Působení Kunitz proteinů lze rozdělit na exogenní – především jako součást jedů a povrchových ochranných sekretů, a endogenní, tedy regulující reakce vnitřního prostředí organismu, z něhož pocházejí. Biologickou funkci je možné odvodit z kombinace spektra inhibujících proteáz a lokalizace působení v rámci organismu, případně specifity časové periody vývoje jedince. Obecně platí, že Kunitz proteiny interferují často s krevními složkami, kde jsou serinové proteázy součástí kaskád aktivace imunitní odpovědi (zánětlivé procesy, komplementová kaskáda) a tvorby krevních sraženin.

Jedy a ochranné sekrety na povrchu bezobratlých živočichů obsahují velké množství různých chemických sloučenin. Kunitz proteiny byly odhaleny v mnoha těchto chemických koktejlech, a proto lze předpokládat, že jsou velmi běžné napříč celou živočišnou říší. Největší pozornost získávají Kunitz proteiny z hadích jedů, které mají často také schopnosti inhibovat iontové kanály. Genetické mutace, přírodní selekce a genetický drift modelovaly proteom jedu každého druhu k dosažení ideální toxicity v souladu s kořistí i predátory (Tasoulis & Isbister, 2017).

Unikátní výzkum Kunitz proteinu mlže *Hyriopsis cumingii* prokázal vliv tohoto inhibitoru na biomineralizaci perleťové vrstvy schránky, a tím pádem i tvorbu perel, což je také způsob ochrany mlžů před nežádoucími cizími objekty (Jin *et al.*, 2019).

U mnoha druhů bezobratlých byly popsány Kunitz proteiny s antibakteriálními a antimikrobiálními účinky. Takovou ochranu může vyžadovat například larva uzavřená v kokonu; snovací žlázy larvy bource morušového *Bombyx mori* obsahují Kunitz proteiny chránící vlákna kokonu před mikroby a predátory (Kurioka *et al.*, 1999; Nirmala *et al.*, 2001).

Antibakteriální účinky proti mnoha vybraným bakteriím byly popsány také u luxuriosinu, Kunitz proteinu z asijského tesaříka *Acalolepta luxuriosa*, který navíc inhibuje růst a množení spor houby napadající rýži (Ueda *et al.*, 2005). Výskyt endogenních Kunitz proteinů bezobratlých může také souviset s regulací fenoloxidázové kaskády, která se v principu podobá koagulační kaskádě, častému cíli těchto inhibitorů (Aso *et al.*, 1994).

Endogenní proteiny s Kunitz doménami obratlovců mají zřejmě komplexnější účinky především v iniciačních fázích imunitní odpovědi. Takové sporadicky identifikované proteiny u ryb a ptáků potvrzují roli těchto multidoménových proteinů při nákaze bakteriemi (Bathige *et al.*, 2015; Nile *et al.*, 2006). Zásadní je zde výzkum vlastností prvního popsaného Kunitz proteinu této skupiny – BPTI, a dále lidských Kunitz inhibitorů, například bikuninu nebo TFPI. Aprotinin neboli BPTI je předmětem zájmu již mnoho desítek let, především i díky svému využití v lékařství. Jeho účinky byly popsány nejen v souvislosti s inhibicí řady homologních serinových proteáz, ale také je velmi podrobně znám mechanismus potlačení iniciačních fází koagulace a fibrinolyze (Ascenzi *et al.*, 2003). Bikunin je lidský Kunitz protein, který kromě účinné inhibice řady serinových proteáz také zabraňuje tvorbě močových kamenů regulací hladiny vápenatých iontů (Delaria *et al.*, 1997; Fries & Blom, 2000). Mnoho dalších pozorovaných vlastností naznačuje, že hraje mimo jiné roli v ochraně orgánů před poškozením během zánětlivých reakcí nebo v potlačení invaze rakovinných buněk a metastáz (Shigetomi *et al.*, 2010). TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) zásadním způsobem reguluje koagulační kaskádu inhibicí

faktoru Xa, který se nachází v centrální pozici střetu různých aktivačních cest a transformuje protrombin na klíčový trombin (Davie *et al.*, 1991). Mimo to byla také potvrzena schopnost TFPI inhibovat aktivaci komplementu (Keizer *et al.*, 2015), což svědčí o provázanosti systémů vrozeného imunitního systému.

### 1.3.1 Parazitární Kunitz proteiny

Kunitz proteiny jsou odhalovány i v celém spektru parazitických živočichů. Pro mnoho druhů parazitů je zásadní přežít nebo určitý čas migrovat v tkáních hostitele, a tudíž se potřebují chránit před hostitelskými obrannými mechanismy. Parazitismus je také specifický způsob života často využívající jako hlavní složku potravy krev hostitele. Tak jako si potenciální hostitel vytvořil obranné mechanismy proti narušení vlastních tkání a ztrátě krve, musel si i parazit vytvořit účinné prostředky, jak tyto překážky překonat. Také díky tomu jsou Kunitz proteiny parazitů ideální pro výzkum jejich proměnlivosti a spektra účinků, protože díky potřebě rychlé odpovědi na evolučně vylepšenou hostitelskou obranu podléhají silné mutační rychlosti (Von Brand, 1966).

Protože obrana hostitele je zajišťována z velké části kaskádami reakcí proteinů a proteáz, inhibitory proteáz jsou ve velkém exprimovány například ve slinných žlázách některých parazitů a usnadňují jim příjem krve. Kunitz proteiny patří mezi zásadní skupiny těchto inhibitorů proteáz, společně například s cystatiny nebo serpiny (Martins *et al.*, 2020).

Znalosti výskytu Kunitz proteinů u ektoparazitů vyjma klíšťat jsou mizivé. Zcela jistě se u hmyzu také podílejí na regulaci endogenních reakcí bez ohledu na parazitický způsob života, jako je to předpokládáno u proteinu získaného z těla bodalky malé (*Haematobia irritans irritans*) (Azzolini *et al.*, 2004). Nicméně zde nelze vyloučit, že vzhledem k přítomnosti mimo jiné v hlavové části této mouchy může jít také o složku sekretu slinných žláz, které často vylučují látky zabraňující srážení krve při jejím sání. Ze slinných žláz muchničky *Simulium vittatum* byl izolován silný širokospektrý inhibitor Kunitzova typu simukunin (Tsujimoto *et al.*, 2012), který potvrzuje právě souvislost s parazitickým způsobem života. Simukunin skrze inhibici několika faktorů zabraňuje koagulaci krve, čímž je umožněn její příjem bez obstrukcí s krevními sraženinami. Detekce Kunitz proteinu v krevsajícím plži *Colubraria reticulata* (Modica *et al.*, 2015) dokazuje silnou asociaci těchto malých peptidů s krví jako zdrojem potravy.

Ačkoliv se na základě dosavadních znalostí dá usuzovat, že Kunitz proteiny jsou nedílnou složkou téměř všech organismů, výzkum souvislosti s parazitickým způsobem života se zaměřuje především na zdravotně či veterinárně významné druhy, a to hlavně klíšťatovce (Ixodida) a vybrané parazitické červy.

#### 1.3.1.1 Kunitz proteiny klíšťat

Klíšťata jsou významným patogenem jak v humánní, tak veterinární medicíně především jako přenašeči mnoha nemocí. Pochopení a charakterizace jejich chemické výbavy zajišťující úspěšné sání, přežití a přenos infekce je proto zásadní při snaze eliminovat negativní vlivy jejich globálního výskytu, neboť se tím dá odhalit možnost narušení těchto životně důležitých procesů.

Několik desítek Kunitz proteinů bylo odhaleno u mnoha druhů převážně z čeledi klíšťatovití (Ixodidae) (Tab. 2). Sekvenční analýzy ukázaly, že variabilita Kunitz proteinů je zde oproti čeledi klíšťákovití (Argasidae) mnohem větší a objevují se i multidoménné Kunitz proteiny nebo proteiny s pozměněnou funkcí až k blokaci iontových kanálů (Dai *et al.*, 2012). U klíšťákovitých se zase naopak vyvinul specifický způsob inhibice N-koncem peptidu místo aktivní Kunitz doménou. Jedná se např. o TAP inhibující faktor Xa (Waxman *et al.*, 1990) a dále ortologní inhibitory se dvěma doménami



savignin (Mans *et al.*, 2002b), ornithodorin (Van De Locht *et al.*, 1996) a monobin (Mans *et al.*, 2008) vázající se na trombin.

Téměř všechny popsané Kunitz proteiny klíšťat jsou schopné interferovat s koagulací v krvi inhibicí různých komponentů koagulační kaskády. Nejčastěji se tyto inhibitory zaměřují na plasmin a překvapivě i trombin, který je cílem Kunitz proteinů zřídka. V menší míře jsou cílem faktor Xa, faktor VIIa nebo faktor XIIa, nebo inhibitor interaguje s dalšími aktivačními proteiny kaskády. Savignygrin inhibuje integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , čímž zabraňuje destičkám vázat se na fibrinogen (Mans *et al.*, 2002a). V některých případech, jako je tomu u Rhipilinu-1 (Gao *et al.*, 2011) nebo HA11 (Zhang *et al.*, 2017), byly antikoagulační účinky potvrzeny, zatím však neproběhl test specifity proti konkrétním serinovým proteázám.

Kromě podpory při získávání krve z hostitele se Kunitz proteiny podílejí na podpoře trávení krve v trávicím traktu klíšťatovců (Ceraul *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2010), kde mimo jiné také mohou zabraňovat jejímu srážení (Lai *et al.*, 2004).

Kromě srážlivosti krve se klíšťata musí vyrovnat i s imunitní obranou hostitele. I na této frontě hrají Kunitz proteiny svoji roli. V této souvislosti byla popsána inhibice  $\beta$ -tryptázy, například proteiny TdPI druhu *Rhipicephalus appendiculatus* (Paesen *et al.*, 2007) nebo tryptogalininem z klíštěte *Ixodes scapularis* (Valdés *et al.*, 2013).  $\beta$ -tryptáza je serinová proteáza specifická pro žírné buňky a hraje významnou roli během zánětlivých reakcí a remodelace tkání.

Nejasný význam zde mají překvapivě aktivátory/inhibitory iontových kanálů. Ra-KLP je obsažen ve slinách klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* a je sekretován do rány na počátku sání, což naznačuje možný vliv na prvotní imunitní reakce hostitele. Nelze však vyloučit, že má parakrinní vliv přímo na buňky slinných žláz parazita (Paesen *et al.*, 2009). Také je možné, že působí jako lokální anestetikum, což bylo potvrzeno u jiných (ne Kunitz) inhibitorů iontových kanálů parazitického hmyzu (Dan *et al.*, 1999).

Ani u klíšťat nechybí antibakteriální funkce Kunitz proteinů. Klíšťata přenášejí mnoho nebezpečných bakterií nebo jiných patogenů a ukazuje se, že zvýšená exprese Kunitz proteinů je často asociována právě s nákazou klíštěte jako obrana proti infekci. IrSPI je dokonce nejvíce up-regulovaný protein při infekci klíštěte *Ixodes ricinus* bakterií *Bartonella henselae* (Liu *et al.*, 2014). DvKPI je Kunitz protein bránící bakterii *Rickettsia montanensis* nadměrně kolonizovat buňky klíštěte *Dermacentor variabilis* (Ceraul *et al.*, 2011)

**Tab. 2 Kunitz proteiny klíšťat a jejich inhibiční aktivita.** Vybrané Kunitz proteiny (pro kompletní seznam viz Přílohu 2). Červené pole = inhibitor byl testován s negativním výsledkem; zelené pole = inhibitor byl testován s pozitivním výsledkem, modré pole = potvrzená inhibice iontových kanálů.

	zdrojový organismus	název Kunitz proteinu	FXa	elastáza	kallikrein	plasmin	thrombin	koagulace	iontové kanály
čeleď Argasidae	<i>Argas monolakensis</i>	monobin							
	<i>Ornithodoros kalahariensis</i>	savignin							
	<i>Ornithodoros kalahariensis</i>	savignygrin							
	<i>Ornithodoros moubata</i>	ornithodorin							
	<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP							
	<i>Ornithodoros moubata</i>	disagregin							
čeleď Ixodidae	<i>Amblyomma cajennense</i>	Amblyomin-X							
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	Amblin							
	<i>Dermacentor variabilis</i>	KPIs (K1)							
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HICHI							
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hemalin							
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HIMKI							
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	haemaphysalin							
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	haemangin							
	<i>Hyalomma asiaticum</i>	HA11							
	<i>Ixodes ricinus</i>	IrSPI							
	<i>Ixodes ricinus</i>	Ir-CPI							
	<i>Ixodes scapularis</i>	tryptogalinin							
	<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-A							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-6							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Boophilin							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-D							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-2							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-3							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmTI-B							
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmCI							
	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ra-KLP							
	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	TdPI							
<i>Rhipicephalus hemaphysaloides</i>	Rhipilin-1								
<i>Rhipicephalus hemaphysaloides</i>	Rhipilin-2								

Cílené umlčení genu pro Kunitz protein obvykle vede k významně zhoršené schopnosti sát, redukcí počtu vajíček nebo dokonce ke snížení schopnosti přežití parazita (např. Alim *et al.*, 2012). Jedná se buď o zamezení úspěšného sání v souvislosti s obranou hostitele, nebo potlačení vlastních obranných reakcí proti infekci jinými patogeny. V každém případě tento jev vybízí k možnostem farmakologického využití Kunitz proteinů proti nebezpečným onemocněním přenášeným klíšťaty.

### 1.3.1.2 Kunitz proteiny helmintů

Celkem 386 Kunitz proteinů bylo identifikováno napříč 44 sekretomy různých helmintů (Cuesta-Astroz *et al.*, 2017), což indikuje jejich obecně nezastupitelnou roli v přežití jedince. Významné jsou především

v interakci parazitického červa s hostitelem, a to jak během invazní části, tak při dlouhodobém přežívání, příjmu potravy a reprodukci.

Biologickou funkci Kunitz proteinu lze přibližně odvodit z jeho lokalizace v určitém životním stádiu cyklu daného živočicha. Tasemnice *Echinococcus granulosus* je vybavena celým spektrem různých Kunitz proteinů fungujících v různých fázích života; některé jsou vylučovány larvami (tedy před infekcí definitivního hostitele), některé protoskolexy (tedy během infekce definitivního hostitele), jiné během přežívání dospělce v definitivním hostiteli a další jsou vysoce exprimované v onkosféře, a tedy zřejmě pomáhají úspěšnému vylučování vajíček z definitivního hostitele (González *et al.*, 2009; Ranasinghe *et al.*, 2015c). Podle toho se také liší ve spektru inhibovaných proteáz a slabé či nefungující inhibitory zřejmě budou účinkovat také jako blokátory iontových kanálů (Fló *et al.*, 2017). Množství různých Kunitz proteinů, které *E. granulosus* využívá v boji o své přežití, napovídá, že zde byla evolučně zvolena strategie specializace těchto peptidů pro specifické potřeby tohoto parazita v různých fázích životního cyklu.

Jiným významným helmintem využívajícím řadu Kunitz proteinů je *Fasciola hepatica*. FhKTM potlačuje aktivaci zánětlivých procesů působením na dendritické buňky svého hostitele, čímž výrazně moduluje imunitní odpovědi (Falcón *et al.*, 2014). Řada dalších Kunitz proteinů je nejzastoupenějších v nově excystovaných juvenilech, což napovídá, že napomáhají infekci definitivního hostitele (Smith *et al.*, 2020). I zde došlo k funkčnímu posunu a 3 Kunitz proteiny (původně popsány jako jeden) mají mimo jiné i výjimečnou funkci inhibice cysteinové proteázy katepsinu L (Smith *et al.*, 2020).

Podobně intenzivně jsou studovány Kunitz proteiny schistosom. Oproti předchozím druhům jich sice nebylo podrobně popsáno velké množství, zato však jsou zde prováděny mnohem komplexnější analýzy dokazující, že i jediný Kunitz inhibitor vykazuje esencialitu jeho existence pro přežití parazita. SmKI-1 motolice *Schistosoma mansoni* reguluje vývoj jedince (transformaci na schistosomula), je sekretován během zánětlivých reakcí hostitele k jejich potlačení, inhibuje migraci neutrofilů, brání srážlivosti krve a redukuje poškození tkání (Ranasinghe *et al.*, 2015a). To vše jsou jevy, které pomáhají motolici přežít ve specifickém prostředí krevního řečiště, úspěšně se reprodukovat a zajistit, aby vyprodukovaná vajíčka měla vhodné podmínky pro únik z těla hostitele.

*Schistosoma japonicum* také disponuje významným Kunitz proteinem SjKI-1 detekovaným v tegumentu dospělců, v exkrečně-sekrecních produktech dospělce, pod skořápkou vajec, minimálně však ve schistosomulech a cercáriích, podobně jako tomu je u SmKI-1. Antikoagulační účinky tohoto proteinu jsou připisované schopnosti vázat vápenaté ionty, a také působí protizánětlivě. Genom této motolice obsahuje řadu proteinů s podobnou sekvencí, takže lze předpokládat, že SjKI-1 není jediným Kunitz proteinem v její výzbroji (Ranasinghe *et al.*, 2015b).

Kunitz proteiny hlístic většinou spadají do specifické skupiny, která se od klasické topologie Kunitz proteinů liší a samotné proteiny mezi sebou sdílí pouze částečnou sekvenční shodu. Přesto všechny popsané Kunitz proteiny, respektive Kunitz proteiny skupiny *Ascaris*, jsou inhibitory serinových proteáz. Jejich funkce je zřejmě mířená proti trávicím enzymům střeva hostitele, neboť jejich množství narůstá v larvách 3. stádia a kulminuje v dospělících, kde se nalézají pod kutikulou (Chu *et al.*, 2004).

U několika druhů rodu měchovců (*Ancylostoma*) bylo zjištěno, že samci produkují znatelně větší množství daného Kunitz proteinu než samice. Jako možné vysvětlení se může nabízet, že zajišťují ochranu kromě sebe také samičky, která tak může více energie vložit do reprodukce (Costa *et al.*, 2009), přestože tyto parazité nežijí v párech, jako je tomu u motolic rodu *Schistosoma*, u kterých je tato strategie

genderové nevyváženosti dobře popsána. Zda je však taková kooperace možná i u měchovců, je třeba podrobit hlubšímu výzkumu.

Nelze pominout vliv Kunitz proteinů hlístic na imunitní systém hostitele. Entomopatogenní *Steinernema carpocapsae* sekretuje Kunitz protein, který během penetrace a migrace v hostitelském těle přispívá k překonání imunitní obrany tím, že zabraňuje agregaci hemocytů (Toubarro *et al.*, 2013).

Z dalších parazitických červů je třeba jmenovat podrobně charakterizovaný protein *EnKT1* žábrohlišta *Eudiplozoon nipponicum*, který je experimentálním modelem použitým i v této práci. Protein *EnKT1* je typickým zástupcem rodiny Kunitz inhibitorů – bez signální sekvence obsahuje 96 aminokyselin, 3 disulfidické můstky a typickou aminokyselinu v pozici P1 (arginin). Inhibuje trypsin, plasmin, kallikrein a faktor Xa a imunolokalizace pomocí protilátek i RNA in situ hybridizace prokázala jeho produkci v trávicích buňkách, ze kterých je pravděpodobně sekretován do střeva, odkud se možná dostává do rány na žábrách kapra (*Cyprinus carpio*), svého hostitele. Vzhledem k potvrzené schopnosti inhibovat koagulační kaskádu a také aktivaci komplementu, hraje tento protein pravděpodobně roli nejen při získávání a zpracování potravy, ale i při ochraně gastrodermis parazita před komplementem hostitele (Jedličková *et al.*, 2019).

## 1.4 Praktické využití/význam

Kunitz proteiny se ukazují jako významné pro fungování a přežívání živých organismů. Jejich charakterizace jednak odhaluje principy mnoha biologických pochodů, jednak nabízí možnost užití těchto relativně malých, účinných molekul ve farmakologii. Vhodnost také dokazuje výzkum potvrzující vysokou stabilitu i v extrémních podmínkách (Alim *et al.*, 2012; González *et al.*, 2009; Moses & Hinz, 1983).

Při znalosti sekvence Kunitz proteinu lze bodovými mutacemi výrazně ovlivňovat funkci rekombinantního proteinu, a to snížit, ale i zvýšit účinek na konkrétní proteázu (Grzesiak *et al.*, 2000). Při zjišťování, která konkrétní aminokyselina má v dané sekvenci vliv na danou funkci, si lze snadno představit uměle vytvořený protein „na míru“ požadavkům. Například BmTIsint je syntetický protein vytvořený na základě dvou Kunitz proteinů z klíštěte *Rhipicephalus microplus*. Tato fúze vedla mimo jiného k získání schopnosti inhibovat cysteinovou proteázu katepsin L, což ani jeden z originálních proteinů nedokázal (Sasaki *et al.*, 2006).

Jelikož Kunitz proteiny často interferují s koagulační kaskádou, nabízejí se jako možný vhodný antikoagulant. BPTI byl prvním popsaným živočišným Kunitz proteinem a pod názvem aprotinin je používán během chirurgických zákroků s velkou potenciální ztrátou krve (transplantace, operace srdce) pro snížení srážlivosti a potlačení zánětlivých reakcí v mimotělním oběhu (Ascenzi *et al.*, 2003). TFPI je podobný Kunitz protein, ale navíc lidský. V roce 2008 bylo ukončeno testovací užívání rekombinantního proteinu založeném na TFPI, inhibitoru kallikreinu jménem Ecallantide (DX-88), při obdobných operacích. Kromě toho je využíván k léčbě hereditárního angioedému (Lehmann, 2008).

Mnoho popsaných funkcí Kunitz proteinů představuje potenciál pro aplikaci v medicíně. Kromě inhibice konkrétních proteáz a často vlivu na srážlivost krve jsou odhalovány další účinky s vysokým potenciálem – například inhibice tvorby vlásečnic (Soares *et al.*, 2016), bakteriostatické (např. Ceraul *et al.*, 2008) nebo protizánětlivé účinky (Shigetomi *et al.*, 2010).

Jako významné složky hadích jedů lze na tyto Kunitz proteiny také pohlížet jako na možné cíle při vývoji specifických antiser, zvláště u druhů člověku velmi nebezpečných hadů. Dendrotoxiny a funkčně příbuzné Kunitz proteiny jsou navíc využívány ke studiu fyziologie a patofyziologie iontových kanálů, protože často bývají vysoce specifické k určitému typu těchto kanálů (Chen *et al.*, 2013; Harvey, 2001).

Protože mnoho popsaných Kunitz proteinů bylo označeno za životně důležité pro řadu parazitujících organismů, jejich cílená eliminace představuje účinný nástroj pro obranu před těmito patogeny. Vakcinace hostitelského živočicha podle dosavadních výsledků může vést k částečné ochraně před parazitem a ke zhoršení prospívání parazitujícího organismu. Například vakcinace myši Kunitz proteinem druhu *Schistosoma mansoni* SmKI-1 vede k redukcí počtu dospělců motolice v krvi až o 33 % a menšímu počtu vajec nalezených ve střevech, játrech i výkalech, což představuje určitou míru ochrany před schistosomózou (Ranasinghe & McManus, 2017). Lepších výsledků bylo dosaženo, když místo celého Kunitz proteinu byl použit pouze C-koncový fragment, a naopak nulové výsledky poskytla vakcinace pouze částí proteinu s Kunitz doménou (Morais *et al.*, 2018), což sice poněkud degraduje potenciál Kunitz proteinů, nicméně pořád cesta k dosažení optimálních výsledků závisí na prvotním vytipování a charakterizaci nových proteinů. Pozitivní výsledky přinesly také pokusy s dalšími Kunitz proteiny použitými jako vakcína. Imunizace turů Kunitz proteiny BmTIs následně snížila počet klíšťat *Rhipicephalus microplus* schopných úspěšně sát o téměř 70 % a jako následek se také výrazně snížila produkce jejich vajíček (Andreotti *et al.*, 2002). Křečci, kteří dostali dávku rekombinantního proteinu AceKI, sice i po infekci hlísticemi *Ancylostoma ceylanicum* trpěli anémií, ale nezpožďovali se v růstu v důsledku nedostatku živin v porovnání s neinfikovanými jedinci (Chu *et al.*, 2004). Obdobné pokusy by se teoreticky mohly provádět s většinou parazitárních Kunitz proteinů a v budoucnu budou jistě stejným způsobem otestovány možnosti dalších.

Zhoubný účinek na nebezpečné parazity mohou mít i druhově zcela nesouvisející Kunitz proteiny. Jako velmi účinný se projevil Kunitz protein sasanky *Stichodactyla helianthus* ShPI-1, který za určitých podmínek *in vitro* zcela zlikvidoval trypomastigoty i epimastigoty parazita *Trypanosoma cruzi*, původce Chagasovy choroby vyskytující se v Latinské Americe (de Almeida Nogueira *et al.*, 2013). Dá se tedy říci, že množství doposud popsaných Kunitz proteinů nabízí vskutku mnoho zatím netušených možností.

Jiné objevené vlastnosti vedly k rozsáhlým studiím o využití Kunitz proteinů k léčbě rakoviny. Jejich výhoda je, že cíleně inhibují nebo rovnou usmrcují rakovinné buňky a nepoškozují okolní zdravé tkáně. Takové účinky byly pozorovány například u EgKI-1 inhibujícího migraci a redukujícího růst nádoru rakoviny prsu a melanomu v myších modelech (Ranasinghe *et al.*, 2018a; Ranasinghe *et al.*, 2019). Selektivní apoptózu nádorových buněk neuroepiteliálního nádoru mozku při testech na kulturách potvrdil i Kunitz inhibitor klíštěte *Amblyomma cajennense* Amblyomin-X (Pavon *et al.*, 2019), který je navíc už i ve fázi preklinických testů redukce plicních metastáz a melanomu (Maria *et al.*, 2019). Klasická chemoterapie se často potýká se vznikem trombózy u léčených onkologických pacientů, a tudíž Kunitz proteiny, jako právě i Amblyomin-X, se svými zpravidla protisrážlivými účinky představují vhodnou náhradu (Branco *et al.*, 2016). V tomto oboru se objevuje mnoho dalších slibných Kunitz proteinů k dalšímu výzkumu, například lidský HGFAI a jeho souvislost s invazí prostatických rakovinných buněk (Wu *et al.*, 2017), bikunin – rovněž lidský Kunitz protein inhibující rakovinné buňky vaječníků (Kobayashi *et al.*, 2003) nebo BmCI z klíštěte *Rhipicephalus microplus* indukující apoptózu savčích fibroblastů (Lima *et al.*, 2010).

## 2 MATERIÁL A METODIKA

### 2.1 Sběr biologického materiálu

Jedinci *E. nipponicum* byli získáni z hostitelského druhu *Cyprinus carpio* (Zpracovna ryb firmy Rybářství Třeboň, a.s., provozovna Třeboň). Vyšetření rybích žaber probíhalo pomocí binokulární lupy a preparačních pomůcek. 8 získaných dospělých červů bylo homogenizováno a uchováno v TRIzol® Reagentu při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Bioinformatická analýza transkriptomu *E. nipponicum*

Pro vyhledávání sekvencí proteinů Kunitzova typu byla využívána průběžně zdokonalovaná databáze sekvencí transkriptomu *E. nipponicum*, jejíž data byla recentně publikována (Vorel *et al.*, 2021). Vyhledávání bylo prováděno s využitím algoritmu tblastn s využitím známé aminokyselinové sekvence dříve charakterizovaného Kunitz proteinu *EnKT1* jako query (Jedličková *et al.*, 2019). U vybraných nalezených sekvencí byla srovnávána podobnost s referenčním *EnKT1* pomocí alignmentu v programu BioEdit Sequence Alignment Editor verze 7.2.5, a dále pravděpodobnost úplnosti sekvence s ohledem na duplikátní sekvence a správnost přepisu při porovnávání s *EnKT1*. V sekvencích byl nalezen stop kódón a oblast určená pomocí softwaru SignalP – 5.0 (Armenteros *et al.*, 2019) jako signální sekvence.

Bylo vybráno 5 kandidátů, které bylo nutné ověřit, popřípadě kompletovat pomocí RACE-PCR. Tyto sekvence byly označeny číselným kódem podle kontigů získaných z pracovní databáze transkriptomu: 00453|m.828, 00481|m.884, 05461|m.23039, 56279|m.364491, 54389|m.357154.

Sekvence Kunitz domény vybraného proteinu byla porovnána s proteinovými databázemi NCBI, GeneBank, SwissProt a UniProt pomocí nástroje BLAST® (Madden *et al.*, 1996) s výchozími parametry.

### 2.3 Izolace RNA

Celková RNA ze 4 dospělých červů byla izolována dle protokolu RNA izolace TRIzol™ Reagent ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf); 1.–7.). Získaná RNA byla rozpuštěna ve 20  $\mu\text{l}$  sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$  a její koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher); naměřená koncentrace byla 1 817,9  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Pro pozdější použití byla RNA dále uchovávána při  $-80^{\circ}\text{C}$  v  $\text{dH}_2\text{O}$ .

### 2.4 Syntéza ss cDNA

Jednovláknová cDNA byla připravena z 2,5  $\mu\text{l}$  izolované celkové RNA metodou Standard RT-PCR Reaction pomocí SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Její

koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher); naměřená koncentrace byla 2 560,4 ng/μl. Pro pozdější použití byla dále uchovávána při -20 °C.

## 2.5 Úprava RNA pro RACE-PCR

Pro získání neznámé počáteční sekvence genu pro vybraný protein 00453|m.828 bylo třeba specificky upravit templátovou nukleovou kyselinu. V případě 5' konce sekvence (tj. počáteční) je třeba upravit již získanou RNA, přičemž bylo postupováno dle protokolu GeneRacer™ kit (Invitrogen). Získaná upravená cDNA byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher); naměřená koncentrace byla 1 043,3 ng/μl. Dále byla uchovávána při -20 °C.

## 2.6 PCR a elektroforéza

Jako templát pro PCR reakce byla použita cDNA (pro ověřování sekvencí, primery 1–15) a upravená cDNA pro RACE-PCR (primery T1-3, Tab. 3). Pro každou sekvenci bylo použito několik kombinací primerů (Obr. 2), aby byla získána co nejpřesnější a nejspolehlivější data z analýzy sekvencí.

**Tab. 3 Degenerované primery používané pro testování sekvencí vybraných potenciálních proteinů.** Bylo navrženo 15 primerů. Reverzní primery 3 a 4 a forward primery 1 a 2 jsou velmi nespecifické, proto byl pro každou sekvenci navržen minimálně jeden další forward primer. Pro sekvenci 357154 bylo navrženo více primerů kvůli spolehlivému ověření. Reverzní primery T1-3 byly použity pro RACE-PCR se specifickým forward primerem GeneRacer™ 5' Primer. Zabarvené pole = primer byl použit pro tuto sekvenci.

	sekvence primeru	00453  m. 828	00481  m. 884	05461  m. 23039	56279  m. 364491	54389  m. 357154
1	ATG GCC AAT AAT TTT AAT TTA TTT ACG GC					
2	ATG GTC AAT AAT TTT AAT TTA TTT ACG GCA					
3	CGA GTC AAC CTG TCC AGT GCT TTA A					
4	CGA GTC AAC CTG TCC AGT GGT TTA A					
5	ATG AGT GGT GGA GTA CCG AAA TTT CC					
6	GTG ATG AAC CCA AAA TGC GCC TT					
7	TCT TGG TCA GCC AAT GAG TGG T					
8	CTT TGG ATT TCC GAG GCA T TTG					
9	GCG GCA TTT GCA AGT CCA CTA TC					
10	CTT TGG ATT TCC AAG GCA ACT G					
11	CTA TGG ATT ACC GAG GCC TGC T					
12	TGA TTC CGT AAC GAA AGC AGC CA					
13	ATGGA TTA CCG AGG CCT GCT					
14	TAG GCA CAT ACC GAC TGC T					
15	TTA CGG CAT TGG TTA TCT TGG TTG					
T1	TGCTCCACCACTCATTGGCTGACCAAGACG					
T2	TGGCTACCAAGGCGCATTGGGTTTCAT					
T3	CATCACCACTCATTGGCTCACCAAGGCGC					





**Obr. 2 Grafický přehled přibližného umístění primerů.** Vybrané sekvence jsou znázorněny v předpokládaném alignmentu s referenčním *EnKT1*. Barvy odpovídají barevnému označení primerů v Tab. 3.

Koncentrace zásobního roztoku cDNA byla 250 ng/μl. Koncentrace zásobních roztoků primerů byla 50 ng/μl. Reakce (Tab. 4) probíhala ve 200 μl zkumavkách na přístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad; Tab. 5). Separace produktů reakce probíhala elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu obsahujícím SYBR Green 1:1 000 v TAE pufru (Invitrogen). Jako standard byly použity markery GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Čas pro elektroforézu byl v rozmezí 25 a 40 minut při napětí 90 V. Produkty PCR reakce byly následně z gelu vyříznuty pod modrým světlem.

**Tab. 4 Reakční směs pro PCR.**

EmeraldAmp GT PCR Master Mix (2x Premix; TaKaRa Bio)	12,5 μl
templátová cDNA 250 ng/μl	1 μl
F/R primer 50 ng/μl	1 μl / 1 μl
dH <sub>2</sub> O	9,5 μl

**Tab. 5 Průběh PCR reakce**

98 °C	2 min	} 35 cyklů (primery 1–15) / 25 cyklů (primery M13, T7) / 40 cyklů (RACE-PCR)
98 °C	30 s	
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	

## 2.7 Extrakce z gelu

PCR produkty byly z gelu izolovány pomocí Zymoclean™ Gel DNA Recovery kitu (Zymo Research) dle návodu výrobce. Očištěná DNA byla eluována do 10 μl dH<sub>2</sub>O. Koncentrace získané DNA byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher) a pro pozdější použití byla DNA dále uchovávána při –20 °C.

## 2.8 Ligace do vektoru pGEM®-T

Ligace proběhla dle protokolu pro pGEM®-T Vector System I (Promega) s pomocí T4 DNA ligázy v 0,5ml zkumavkách přes noc při 4 °C (Tab. 6).

**Tab. 6 Reakční směs ligační reakce.**

2x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM®-T Vektor (50ng)	1 µl
produkt PCR	3 µl
T4 DNA Ligáza	1 µl

## 2.9 Transformace do kompetentních buněk *E. coli*

Pro transformaci do kompetentních buněk (One Shot® TOP10; Invitrogen) byl použit standardní postup dle protokolu pro pGEM®-T Vector System I (Promega). Bylo použito 5 µl ligační směsi na 50 µl buněk a 250 µl SOC média (Invitrogen) pro inkubaci 1,5 hod při 37 °C, 250 rpm na vertikální třepačce. Transformované buňky byly následně aplikovány na agarovou plotnu s LB médiem obsahujícím 50µg/ml ampicilinu (AMP, Sigma-Aldrich).

### 2.9.1 PCR test kolonií

Před izolací plazmidu byla ověřena úspěšnost transformace. Vzorek vybrané kolonie byl rozpuštěn v 10 µl dH<sub>2</sub>O a bakterie byly rozrušeny teplotním gradientem (Tab. 7) na přístroji, kde byla prováděna i PCR. K rozbitým buňkám bylo přidáno 12,5 µl EmeraldAmp GT PCR Master Mix a 2 µl vektor specifických primerů (1 µl Forward primer M13 a 1 µl Reverse primer M13). Následně proběhla PCR reakce (Tab. 5) a elektroforéza v 1,5 % agarózovém gelu obsahujícím SYBR Green 1:1 000 v TAE pufru (Invitrogen). Jako standard byly použity markery GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Čas pro elektroforézu byl 25 minut při napětí 90 V. Gel byl vizualizován a vyhodnocen pod UV světlem. Z kolonií pozitivních na přítomnost vektoru byly následně plazmidy izolovány.

**Tab. 7 Program reakce pro rozrušení bakteriálních buněk.**

96 °C	5 min
50 °C	1,5 min
96 °C	1,5 min
45 °C	1 min
96 °C	1 min
40 °C	1 min
12 °C	~

### 2.9.2 Izolace a purifikace plazmidu

Vybrané kolonie se nechaly separátně narůst ve 2 ml LB média s 0,3 mM AMP (Sigma Aldrich) přes noc ve 37 °C, 180 rpm. Purifikace plazmidu probíhala dle standardního protokolu Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep kitu (Thermo Fisher). Plazmidová DNA byla eluována 50 µl dH<sub>2</sub>O a koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher) a pro pozdější použití byla DNA dále uchovávána

při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Purifikované plazmidy byly poslány na sekvenaci Sangerovou metodou do sekvenační laboratoře PřF UK (Biocev).

## 2.10 Analýzy sekvencí z plazmidů

Celkem 110 výsledků ze sekvenační laboratoře bylo porovnáváno v programu BioEdit. Z pěti původně výtípaných potenciálních proteinů postoupili do užšího výběru 2 kandidáti pro rekombinantní expresi. Liší se od referenčního *EnKT1* především sekvencí v aktivním místě (viz Přílohu 3). Pro následnou expresi byl vybrán protein označený 54389|m.357154, pracovním názvem *EnKC1* (*Eudiplozoon nipponicum* Kunitz chymotrypsin inhibitor 1 – podle aminokyseliny leucinu v pozici P1 bylo předpokládáno, že tento protein inhibuje chymotrypsin).

V programu SignalP 5.0 byla rozpoznána signální sekvence, která nebyla zahrnuta do sekvence rekombinantního proteinu.

## 2.11 Exprese rekombinantního proteinu

### 2.11.1 Vektor a bakteriální kmeny

Optimalizace sekvence, syntéza genu a zaklonování genu do vybraného vektoru byly provedeny komerčně (GenScript, USA). Kodony sekvence bez signálního peptidu byly optimalizovány pro *E. coli*. Kódující sekvence byla zaklonována do vektoru pET-22b(+) s restrikčními místy pro enzymy NdeI-XhoI. Součástí C konce proteinu je histidinový tag ( $6 \times \text{His}$ ).

#### 2.11.1.1 Transformace vektoru do kompetentních buněk

Vektor byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* dvou kmenů – SHuffle<sup>TM</sup> (BioLabs® Inc.) a Rosetta Gami B (Novagen®) tepelným šokem dle doporučeného transformačního protokolu výrobce.

Mikrozkumavky s 50  $\mu\text{l}$  kompetentních buněk byly rozmrazeny na ledu. Následně byl přidán 1  $\mu\text{l}$  plasmidového konstruktů a obsah zkumavky byl zlehka promíchán. Po 30 min na ledu byl proveden tepelný šok při  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  přesně 30 s, a dále byly bakterie inkubovány 5 min opět na ledu.

Bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  SOC média laboratorní teploty a po dobu 1 hod probíhala inkubace ve  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  na orbitální třepače při 250 rpm.

100  $\mu\text{l}$  bakteriální směsi bylo nanášeno na plotnu s LB médiem a 0,3mM ampicilinem a bakterie se nechaly narůst přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nebo 3 dny při laboratorní teplotě. Test úspěšnosti ligace proběhl pomocí PCR s T7 primery (viz kap. 3.6 PCR a elektroforéza a 3.9.1 PCR test kolonií).

Z pozitivních kolonií byly vytvořeny zásobní vzorky. Vzorek bakteriální kolonie byl namnožen v 5 ml LB média přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 250 rpm, a poté rozdělen do mikrozkumavek s glycerolem v poměru 2:3 a uložen do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11.2 Kultivace a exprese

Každá šarže kultivovaných bakterií pro expresi daného rekombinantního proteinu byla označena písmenem a příslušným bakteriálním kmenem: A<sub>BL</sub>-J<sub>BL</sub> (kmen BL21 exprimující *rEnKT1*, tj. 10 šarží), A<sub>SH</sub>-H<sub>SH</sub> (kmen SHuffle<sup>TM</sup> exprimující *rEnKC1*, tj. 8 šarží), A<sub>Ros</sub>-G<sub>Ros</sub> (kmen Rosetta Gami B exprimující

*rEnKC1*, tj. 7 šarží). Bakterie exprimující *rEnKT1* byly poskytnuty z předchozích experimentů (Jedličková *et al.*, 2019).

Malé množství bakterií ze zásobních kolonií bylo kultivováno ve 20 ml LB média s 0,1 mM AMP na třepače přes noc (37 °C, 200 rpm). Následně bylo připraveno 4 × 1 l LB média s přidanou glukózou (finální koncentrace 20 mM) a AMP (finální koncentrace 0,1 mM) v Erlenmeyerově baňce a 4 × 1 l LB média s přidaným AMP (finální koncentrace 0,1 mM) a IPTG (finální koncentrace 0,1 mM) ve skleněné lahvi.

Vzorek kultivovaných bakterií byl rozdělen po 5 ml do každé baňky s LB médiem + glukózou, ve kterých se nechaly narůst přibližně 5 hod do OD ± 0,8 při 37 °C, 220 rpm. Obsah každé baňky byl poté centrifugován při 20 °C, 4 000 rpm 10 min, a získaný pelet byl přenesen a resuspendován v médiu s IPTG. Zde byly bakterie třepány přes noc při 220 rpm. Pro vzorky bakterií kmene BL-21 exprimující rekombinantní protein *rEnKT1* byla zachována teplota 37 °C, pro vzorky bakterií kmene Rosetta gami B a SHuffle<sup>TM</sup> exprimující rekombinantní protein *rEnKC1* byla zvolena teplota 16 °C dle doporučení výrobce.

Následně byly vzorky stočeny opět při 20 °C, 4 000 rpm 10 min a veškerý pelet byl přenesen do 50ml centrifugační zkumavky, ve které byl ponechán 0,5 hod při -20 °C. Poté byl pelet resuspendován ve 20–40 ml lyzačního pufru (20mM Tris/HCL, 10mM imidazol, 300 mM NaCl, 1% lauryl sarcosine, pH 8) a sonikován na ledu 10× 10 s při výkonu 10 W na sonikátoru Vibra Cell<sup>TM</sup>72405 (Bioblock Scientific). Centrifugací při 4 °C, 4 000 rpm 10 min na centrifuze 5804R (Eppendorf) byl oddělen supernatant, tedy solubilní fáze, a pelet obsahující inkluzní tělíska pro další zpracování.

### **2.11.3 Čištění solubilní fáze**

Solubilní fáze obsahu kultivovaných bakterií byla zmrazena, nebo rovnou přečištěna opětovnou centrifugací za stejných podmínek (viz výše). Před nanesením na chromatografickou kolonu byl vzorek vždy ještě přečištěn na Durapore<sup>®</sup> Membrane 0,65 µm filtru pomocí vodní vývěvy a smíchán s promývacím pufrem (dle následně použité metody) v poměru 1:1.

### **2.11.4 Zpracování peletu obsahujícího inkluzní tělíska**

Zmražený pelet byl důkladně rozpuštěn v rozpouštěcím pufru (20mM Tris/HCl, 6M guanidin hydrochlorid, pH 7) a sonikován na ledu 3× 1 min. Poté se nechal při laboratorní teplotě na třepače s výkyvnou platformou Grant Bio PMR-30 Platform Rocker (KeisonProducts) po dobu 2–4 dní.

Takto rozpuštěná pevná fáze z bakterií byla poté stočena při laboratorní teplotě, 10 000 rpm 10 min a supernatant byl smíchán s promývacím pufrem (dle následně použité metody) v poměru 1:1.

## **2.12 Purifikace rekombinantního proteinu**

Rekombinantní proteiny byly získávány jak ze solubilní fáze, tak z inkluzních tělísek bakterií. Purifikace probíhala za pomoci kombinace více typů chromatografií. Získané vzorky či frakce byly vždy testovány pomocí 1D denaturující elektroforézy (SDS-PAGE, viz dále) a dle výsledku bylo rozhodnuto o případném dalším pokusu o purifikaci.

### **2.12.1 Chromatografické metody**

Všechny roztoky užívané při následujících postupech byly vždy před použitím přefiltrovány na 0,65 $\mu$ m filtru a odvdušněny pomocí vývěvy. Použité pufrы měly vždy laboratorní teplotu, testované vzorky byly před nanášením na kolonu a po eluci uchovávány na ledu v Eppendorf Protein LoBind<sup>®</sup> mikrozkumavkách a skladovány v  $-20$  °C.

### **2.12.2 Niklová afinitní chromatografie (Immobilized Metal Affinity Chromatography – IMAC)**

Vzorek byl nanášen na 1ml HisTrap<sup>™</sup> Fast Flow Crude kolonku (Sigma-Aldrich) nebo na 1 ml Ni-NTA kuliček Profinity<sup>™</sup> IMAC Resin (BioRad) v otevřené polypropylenové kolonce. Rychlost průtoku byla maximálně 1 ml/min. Následně probíhalo promývání promývacím pufrem (složení viz Přílohu 1) o objemu minimálně 6  $\times$  objem kolony.

Eluce 2 ml elučního pufru (složení viz Přílohu 1) proběhla buď přímo do sběrných 1,5ml mikrozkumavek na ledu, nebo do 13 ml fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (20mM PBS, pH 7,2), aby nedocházelo ke srážení proteinů. Pro test a uchovávání získaného vzorku proběhla dodatečná výměna elučního pufru za 0,1M PBS centrifugací v 15ml Amicon<sup>®</sup> Ultra 10K při laboratorní teplotě. Alternativně byly rekombinantní proteiny purifikovány s využitím FPLC na 5 ml HisTrap<sup>™</sup> kolonce krokovou elucí (eluční krok = 5 ml, zvýšení koncentrace imidazolu o 10 % na eluční krok).

Před analýzou obsahu získaných 1ml frakcí pomocí elektroforézy byly vzorky převedeny do 20 mM PBS pH 7,2 nebo 20 mM MES pH 6,5 v 0,5ml Amicon<sup>®</sup> Ultra 10K.

### **2.12.3 Iontově výměnná chromatografie**

Vzhledem ke kontaminujícím proteinům vyskytujícím se ve frakcích po IMAC bylo přistoupeno ke druhému kroku purifikace pomocí FPLC na 1 ml koloně Mono-S (GE-Healthcare) při průtoku 1 ml/min ve všech krocích. Jako nanášecí a promývací pufr byl použit 20 mM MES pH 6,5 a jako eluční pufr 20 mM MES + 1M NaCl pH 6,5. Eluce probíhala lineárním gradientem NaCl (0–100 %).

## **2.13 Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla měřena pomocí Quant-IT<sup>™</sup> Protein Assay kitu (Invitrogen) v 96jamkových černých mikrotitračních destičkách s plochým dnem (Nunc). Měření probíhalo na fluorometru Infinite M200 (TECAN) a bylo vyhodnoceno programem Magellan<sup>™</sup>.

## **2.14 Analýza frakcí na přítomnost rekombinantních proteinů**

### **2.14.1 Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE**

Vzorek z každé frakce byl nanesen v redukujícím pufru NuPAGE<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) na 15%, 12% nebo 8–16% Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> polyakrylamidový gel v denaturujícím prostředí Tris-glycinového pufru s příměsí dodecylsulfátu sodného (TGS). Bylo použito 8–12  $\mu$ l z každé frakce. Pro účely analýzy frakcí po chromatografii nebyla měřena koncentrace proteinů kvůli urychlení procesu a zamezení ztrátě a degradace získaného materiálu další manipulací. Elektroforéza probíhala v elektroforetické cele Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell (Bio-Rad) při konstantním napětí 150 V pro 1 gel,

200 V pro 2 gely. Jako marker molekulové velikosti bylo použito 8  $\mu$ l Precision Plus Protein<sup>TM</sup>DualXtra Standards (Bio-Rad). Gely byly následně obarveny v Coomassie Brilliant Blue R-250.

### 2.14.2 Hmotnostní spektrometrie

Vybrané proteinové proužky přibližně odpovídající předpokládané molekulové velikosti rEnKC1 byly vyříznuty z gelu a uchovány v 10% kyselině octové. Hmotnostní spektrometrie proběhla v Laboratoři hmotnostní spektrometrie (BIOCEV, PŘF UK) (viz Jedličková *et al.* 2019).

### 2.14.3 Detekce His-tagovaných rekombinantních proteinů na blotu

Proteiny byly z gelu přeneseny na Immuno-Blot PVDF membránu (Invitrogen) pomocí Trans-Blot Turbo Transfer systému (Bio-Rad) za konstantního proudu 1,3 A po dobu 17 min. Z membrány byly odstříženy markery a pro další použití byla odstřížena jen nezbytně velká část membrány. Veškeré inkubace probíhaly v zatavené folii na třepačce s výkyvnou platformou při laboratorní teplotě.

Na blokování membrány byl použit 5% roztok odtučněného mléka Blotting Grade Blocker (Bio-Rad) ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (20mM PBS) s přidavkem 0,05% detergentu Tween 20, pH 7,2 (PBS-T). Blokování probíhalo 1 h. Následovala 1h inkubace s 5nM i BODY4 (Šácha *et al.*, 2016), biotinylovaným kopolymerem obsahujícím niklové kationty, nebo 1:80 ředěnými protilátkami vázajícími se na histidinový zbytek (6x-His Tag Monoclonal Antibody, Sigma-Aldrich), v PBS-T.

Poté byla membrána 3 $\times$  po 5 min promyta puforem. Následující inkubace, trvající 1 h, probíhala v PBS-T s přidaným 1:1000 ředěným peroxidázou značeným streptavidinem (Sigma-Aldrich), nebo 1:1000 ředěnými (afinitně purifikovanými, křenovou peroxidázou značenými) myšími protilátkami (Thermo Fisher Scientist). Následně proběhlo opět 3 $\times$  5 min promytí v pufru a vyvíjení membrány substrátovým roztokem kitu Opti – 4CN<sup>TM</sup> (Bio-Rad) dle pokynů výrobce.

## 2.15 Testování schopnosti rekombinantních proteinů inhibovat komplement v séru

### 2.15.1 Biologický materiál

Byla využita dříve optimalizovaná metoda (Jedličková *et al.* 2019). Pro testování schopnosti rEnKT1 a rEnKC1 inhibovat komplement byla použita čerstvě odebraná lidská a rybí (*Carassius auratus*) séra. Erytrocyty byly čerstvě získány z krve králíka (*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*) z laboratorních chovů katedry parazitologie, PŘF UK. Králičí erytrocyty byly promývány 2  $\times$  v Alseverově roztoku a 3  $\times$  ve 20mM PBS centrifugací po 5 min při 1500 rpm. Poté byly zředěny na 2% suspenzi.

### 2.15.2 Test inhibice komplementu

Test probíhal v 96jamkové mikrotitrační destičce s oblým dnem (typ U, Nunc). Každá jamka obsahovala 100  $\mu$ l roztoku séra – 20% rybí nebo 50% lidské, v PBS se získaným rekombinantním proteinem (o koncentraci 0 M a 4  $\mu$ M pro rEnKT1 a 0 M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M a 16  $\mu$ M pro rEnKC1). Po 10 min inkubace v laboratorní teplotě bylo přidáno 100  $\mu$ l suspenze erytrocytů. Tři kontrolní jamky (v dubletu) neobsahovaly buď rekombinantní protein, nebo sérum, nebo obojí.

Každá jamka byla následně průběžně vizuálně kontrolována pod stereolupou a byl měřen čas, po kterém došlo ke kompletní lýzi erytrocytů, kdy se suspenze změnila na transparentní roztok hemoglobinu.

Protože test *rEnKT1* probíhal pouze jako doplňující k předchozím výsledkům (Jedličková *et al.*, 2019), byl proveden pouze jednou jako kontrola. Testy s *rEnKC1* proběhly 2 × pro každou koncentraci.

## 2.16 Test inhibiční aktivity proti vybraným proteázám

Inhibiční schopnost *rEnKC1* byla testována za použití vybraných serinových proteáz:  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin, kallikrein, aktivovaný faktor X (FXa), plasmin a trombin (viz Přílohu 1). Používány byly 96jamkové černé mikrotitrační destičky s plochým dnem (Nunc). Jednotlivé enzymy v koncentraci 5 nM (koncentrace před přidáním substrátu) byly nejprve inkubovány s *rEnKC1* o různé koncentraci (5nM, 20nM, 50nM, 100nM) v pufru (0,1 M HEPES, 0,3 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) o celkovém objemu 100  $\mu$ l, 15–30 min při laboratorní teplotě. Do kontrolních jamek nebyl přidán *rEnKC1*, nebo enzym.

Poté byly přidány příslušné fluorogenní substráty dle testovaného enzymu (Tab. 8). Měření probíhalo na fluorometru Infinite M200 (TECAN) v kinetických cyklech po 1,5 – 6,5 min (v závislosti na množství testovaných vzorků najednou) při 25 °C. Získaná data byla zpracována v programu Magellan<sup>TM</sup> a pro vyhodnocení tabulek a grafů včetně odvození IC<sub>50</sub> byl použit program MS Excel.

Tab. 8 Seznam fluorogenních substrátů specifických pro každou použitou proteázu.

Serinová proteáza (zdroj)	substrát
$\alpha$ -chymotrypsin (hovězí slinivka)	Suc-AAPF-AMC
trypsin (hovězí slinivka)	Z-LR-AMC
kallikrein (lidská plazma)	Z-FR-AMC
	D-PFR-AMC
faktor Xa (hovězí plazma)	Z-IEGR-AMC
plasmin (lidská plazma)	Z-ALK-AMC
thrombin (lidská plazma)	Z-VPR-AMC

## 2.17 Test stability komplexu *rEnKC1*-chymotrypsin a *rEnKC1*-FXa

Pro testování přítomnosti a stability komplexu enzymu a inhibitoru byli použity  $\alpha$ -chymotrypsin a FXa. Enzymy byly inkubovány s *rEnKC1* v molárním poměru 1:2 v 0,1M HEPES pufru, pH8 při laboratorní teplotě. Následně byl přidán redukující a do jednoho vzorku pouze s rekombinantním proteinem zvlášť neredukující SDS-PAGE vzorkový pufr. Před nanesením na gel byl jeden vzorek obsahující enzym a inhibitor ponechán při laboratorní teplotě a druhý inkubován při 100 °C ve vodní lázni. Kontrolní vzorky neobsahovaly enzym, nebo *rEnKC1*. Vzorky byly po inkubaci naneseny na 8–16% gel a separovány v denaturujícím prostředí pomocí SDS-PAGE při konstantním napětí 150 V. Následně byl gel obarven v Coomassie Brilliant Blue R-250.

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Bioinformatická analýza transkriptomu *E. nipponicum* a sekvencí z plazmidů

Z transkriptomu *E. nipponicum* bylo vybráno 5 sekvencí, které byly následně ověřeny pomocí PCR a sekvenace. Při porovnávání s referenčním proteinem *EnKT1* (Jedličková *et al.* 2019) bylo zjištěno, že jejich Kunitz domény se liší pouze v několika málo aminokyselinách (Tab. 9) a pouze dva peptidy měly navíc krátkou sekvenci mimo vlastní doménu.

Pro rekombinantní expresi jsme se rozhodovali mezi dvěma ověřenými sekvencemi, v pracovní databázi označenými jako 00453|m.828 (dále jen 828) a 54389|m.357154 (dále jen 357154). Sekvence 828 zahrnuje 161 aminokyselin a má lysin v místě P1 (potenciální specifita pro trypsin) a sekvence 357154 má 99 aminokyselin s leucinem v P1 (potenciální specifita pro chymotrypsin) (Tab. 10). Referenční protein *EnKT1* obsahuje 122 aminokyselin a má arginin v místě P1 (determinující specifitu pro trypsin, Jedličková *et al.* 2019).

Pomocí RACE PCR byla zjištěna N-koncová sekvence peptidu 828, která je téměř shodná s N-koncovou sekvencí proteinu *EnKT1*, výrazně se však liší inzertem před aktivní doménou. Peptid 357154 má naopak zcela odlišnou N-koncovou sekvenci. Všechny porovnávané peptidy mají velmi podobnou aktivní doménu (viz Přílohu 3). Bodem zájmu byla především aminokyselina v pozici P1, která zásadně ovlivňuje specifitu Kunitz proteinu. Pro rekombinantní expresi a další charakterizaci byl vybrán protein 357154, u kterého byl předpoklad, že bude mít specifitu k chymotrypsinu, tedy odlišnou od dříve charakterizovaného *EnKT1*. Tento protein jsme pracovně nazvali *EnKC1*. Předpokládaná molekulová velikost je 8,038 kDa a teoretické pI=7,71 (8,86 kDa a pI=7,78 pro rekombinantní protein s 6 × His-tag; dle ExPASy; Gasteiger *et al.*, 2003).

**Tab. 9 Srovnání primární struktury vybraných ověřených potenciálních proteinů s *EnKT1* v oblasti P6-P5' a P18'.** Šedě podbarvená jsou místa shodná se sekvencí *EnKT1*.

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P18'
<i>EnKT1</i>	M	V	G	M	C	R	A	S	F	P	R	Y
828	M	V	G	M	C	K	A	S	F	P	R	Y
357154/ <i>EnKC1</i>	A	V	G	M	C	L	A	S	F	P	R	Y
884	I	V	G	M	C	R	A	S	F	P	R	Y
23039	M	V	G	M	C	R	A	S	F	P	R	Y
364491	I	V	G	M	C	L	A	S	F	P	R	Y



**Tab. 10 Srovnání parametrů sekvencí a vypočítaných teoretických vlastností proteinů *EnKT1*, 828 a 357154/*EnKC1*.** Teoretické Mw a pI bylo počítáno online nástrojem ExPASy.

	ntd/AA vč. sig. sekvence	AA bez sig. sekvence	P1	P1'	Mw vč. sig./bez sig. sekvence	pI vč. sig./bez sig. sekvence
<i>EnKT1</i>	369/122	96	Arg	Ala	12,84/10,18 kDa	8,25/8,30
828	486/161	135	Lys	Ala	17,06/14,375 kDa	8,54/8,57
357154/ <i>EnKC1</i>	300/99	75	Leu	Ala	10,69/8,038 kDa	6,07/7,71

Sekvence Kunitz domény vybraného proteinu 357154/*EnKC1* kromě předpokládané shody s *EnKT1* vykazovala podobnost s Kunitz proteiny z jedu endoparazitické vosy *Pimpla hypochondriaca* či pavouka *Nephila pilipes*, inhibitory z povrchových sekretů sasanek actitoxiny a dalšími proteiny s Kunitz doménou (Tab. 11 a Obr. 3).

**Tab. 11 Kunitz proteiny podobné 357154/*EnKC1* dle algoritmu BLAST® a E value.** Do výběru nebyly zahrnuty hypotetické proteiny a identické actitoxiny. Tabulka zahrnuje název Kunitz proteinu, zdrojový organismus, E value pro porovnání s aktivní doménou 357154/*EnKC1* a přístupový kód v příslušné proteinové databázi.

Papilin	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	E-value 2e-26	GenBank: KAF0298572.1
Kunitz-type serine protease inhibitor <b>cvp2</b>	<i>Pimpla hypochondriaca</i>	E value 3e-15	Swiss-Prot: Q8T0W4.1
KappaPI-actitoxin- <b>Avd3d</b>	<i>Anemonia sulcata</i>	E value 4e-15	Swiss-Prot: Q9TWF8.1
KappaPI-actitoxin- <b>Avd3a</b>	<i>Anemonia sulcata</i>	E-value 6e-15	Swiss-Prot: P10280.2
protease inhibitor 2-like ( <b>PI2-like</b> )	<i>Pogona vitticeps</i>	E value 1e-13	NCBI: XP_020652138.1
Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain protein ( <b>KTI</b> )	<i>Opisthorchis viverrini</i>	E value 1e-13	GenBank: OON23666.1
kunitz-type U19- <b>barytoxin-T11a</b>	<i>Nephila pilipes</i>	E value 3e-05	GenBank: GFU22645.1
<b>papilin-like isoform X5</b>	<i>Rhipicephalus microplus</i>	E value 4e-13	NCBI: XP_037274677.1

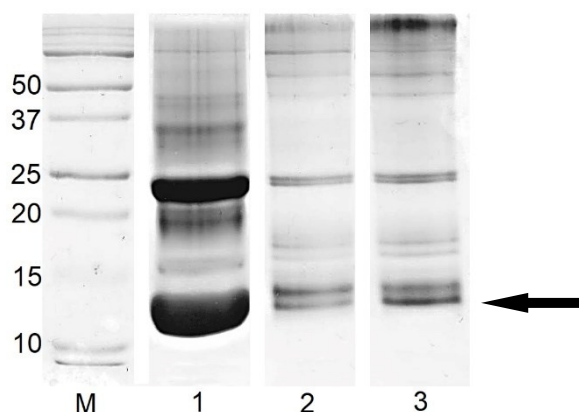
		*	*	*	*	*	*
<i>EnKC1</i>	47	ICQLPKAVGMCLASFPRIYFDG--	KKCTQFIYGGCGGNANNFQTKAECSTCP	97			
papilin	303	LCRLPKVVGPCLAAPRIYFNG--	KRCAKFTYGGCGGNANNFRTVGECKTCR	352			
cvp2	27	LCSLEPAVGLCKASIPRFASVG--	GKCQEFYGGCGGNANNFQTAECEAKCG	76			
Avd3d	5	DCELPKVVGRCRARFPRIYINLSSRR	CEKFIYGGCGGNANNFHTLECEKVCV	55			
Avd3a	5	DCELPKVVGPCRARFPRIYINSSSR	CEKFIYGGCGGNANNFHTLECEKVCV	55			
PI2-like	28	SCSLPVVVGQCRASFPRIYFDKADK	KPFVYGGCGGNANNFESVEQCENACM	79			
KTI	30	ICLLPKVVGKCLAYMPRIYINPETH	CKEYFVYGGCGGNANNFETWKECHYT	80			
barytoxin	36	QCMQPPEAGLCLAYIPSFYINPAT	KKQSFVYGGCGGNANNFSECEMKKCG	86			
papilinX5	307	VCSLPKESGMCLAYFPRIYINSVSK	CEQFIYGGCGGNANNFWTINECKRTC	358			

**Obr. 3 Srovnání primární struktury Kunitz domény proteinů podobných 357154/*EnKC1* na základě algoritmu BLAST®.** Šedě podbarvená jsou místa shodná se sekvencí 357154/*EnKC1*. Hvězdička označuje cysteiny tvořící disulfidické můstky. Šipka označuje místo P1. Čísla ohraničující sekvenci určují pozici sekvence v rámci celého proteinu.

## 3.2 Purifikace rekombinantního proteinu

### 3.2.1 Prepurifikace proteinů pomocí IMAC

Použití chromatografie na Ni-NTA kuličkách jednorázovou elucí bylo zavedeno jako primární přečištění především u vzorků solubilizovaných inkluzních tělísek, v některých případech i u rozpustné frakce lyzátu bakterií. Protože eluce probíhala jednorázově vysokou koncentrací imidazolu, v eluátu se vyskytovala ještě řada kontaminujících bakteriálních proteinů (Obr. 4). Takto přečištěný vzorek byl použit v dalším kroku purifikace.



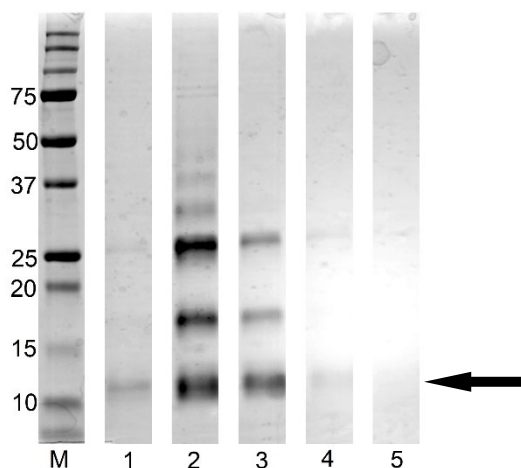
**Obr. 4 Analýza vzorků po prepurifikaci pomocí IMAC.** SDS-PAGE vzorku po chromatografii s použitím Ni-NTA kuliček Profinity™ IMAC Resin v 15% polyakrylamidovém gelu, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Každý vzorek je z rozpuštěných inkluzních tělísek jedné šarže příslušného bakteriálního kmene a šarže. Šipka indikuje předpokládané rekombinantní proteiny *rEnKT1/rEnKC1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1 – J<sub>BL</sub> (→ *rEnKT1*); 2 – A<sub>Ros</sub> (→ *rEnKC1*); 3 – A<sub>SH</sub> (→ *rEnKC1*)

### 3.2.2 Purifikace pomocí IMAC

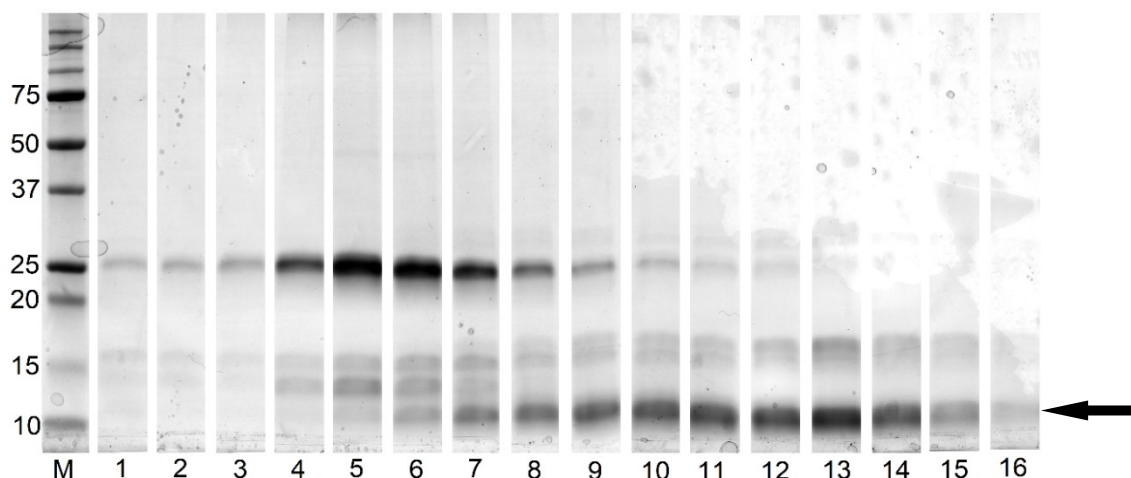
Pomocí krokové eluce s využitím FPLC se obvykle podařilo získat frakce s menším počtem kontaminujících proteinů. Dokonale čistý rekombinantní protein však v dostatečném množství získán nebyl. Podmínky procesu byly postupně optimalizovány, aby byl výsledek ideálnější pro další použití proteinu v dostatečném množství.

Zpočátku byla používána 1ml HisTrap™ kolonka a eluce probíhala v 0,5ml frakcích. Tímto postupem byl sice zisk příslušného proteinu vyšší, zato však s větším množstvím kontaminujících proteinů (Obr. 5). Při použití 5ml HisTrap™ kolonky a eluce v 1ml frakcích docházelo k rozvolnění jednotlivých proteinů do širšího spektra frakcí (Obr. 6). Nejvyšší koncentrace eluovaných proteinů se objevovala při 20–30 % přidaného elučního pufru, tedy při 132–190 mM imidazolu. Nejvyšší koncentrace celkových proteinů však ne vždy odpovídala nejvyšší koncentraci požadovaného rekombinantního proteinu.

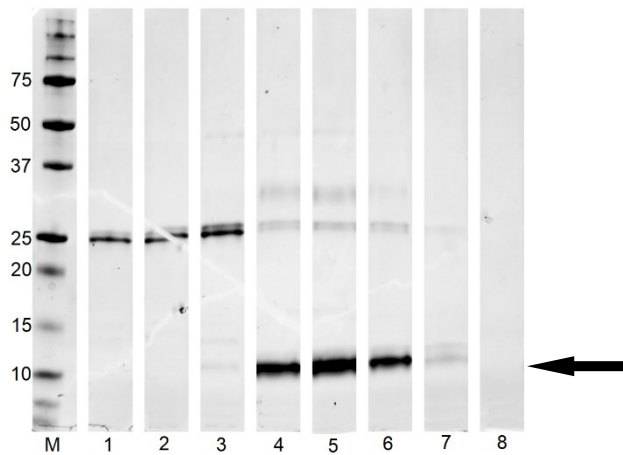
Pro další zpracování byly vybírány především ty frakce, kde se podařilo oddělit požadovaný rekombinantní protein od neznámého bakteriálního proteinu o velikosti  $\approx 25$  kDa. Druhý velmi abundantní bakteriální protein o velikosti  $\approx 17$  kDa se touto metodou nepodařilo separovat. Při izolaci rekombinantního proteinu *rEnKT1* se tento protein neobjevoval (Obr. 7).



**Obr. 5** Analýza frakcí s *rEnKC1* po purifikaci pomocí IMAC. SDS-PAGE frakcí ze solubilní fáze lyzátu šarže  $D_{SH}$  po FPLC chromatografii s použitím 1ml HisTrap<sup>TM</sup> kolonky. 12  $\mu$ l z vybraných frakcí bylo nanášeno na 8–16% Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>TM</sup> polyakrylamidový gel, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein *rEnKC1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1–5 – vybrané eluční frakce



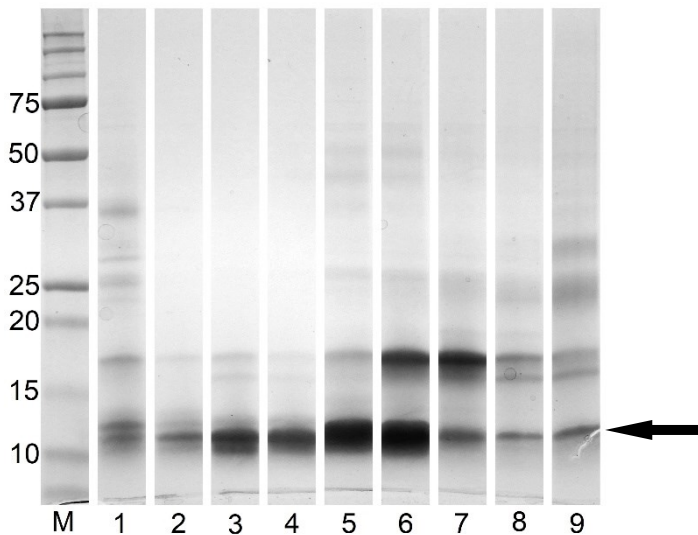
**Obr. 6** Analýza frakcí s *rEnKC1* po purifikaci pomocí IMAC. SDS-PAGE frakcí ze solubilní fáze sloučených lyzátní šarží  $E_{SH} + F_{SH} + G_{Ros}$  po FPLC chromatografii s použitím 5ml HisTrap<sup>TM</sup> kolonky. 12  $\mu$ l z vybraných frakcí bylo nanášeno na 8–16% Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>TM</sup> polyakrylamidový gel, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein *rEnKC1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1–16 – vybrané frakce



**Obr. 7 Analýza frakcí s *EnKT1* po purifikaci pomocí IMAC.** SDS-PAGE frakcí ze solubilní fáze sloučených lyzátů šarží G-J<sub>BL</sub> po chromatografii přes Ni-NTA kuličky a FPLC chromatografii s použitím 5ml HisTrap™ kolony. 5 µl z koncentrovaného objemu vybraných frakcí bylo nanášeno na 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ polyakrylamidový gel, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein r*EnKT1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1-8 – vybrané frakce

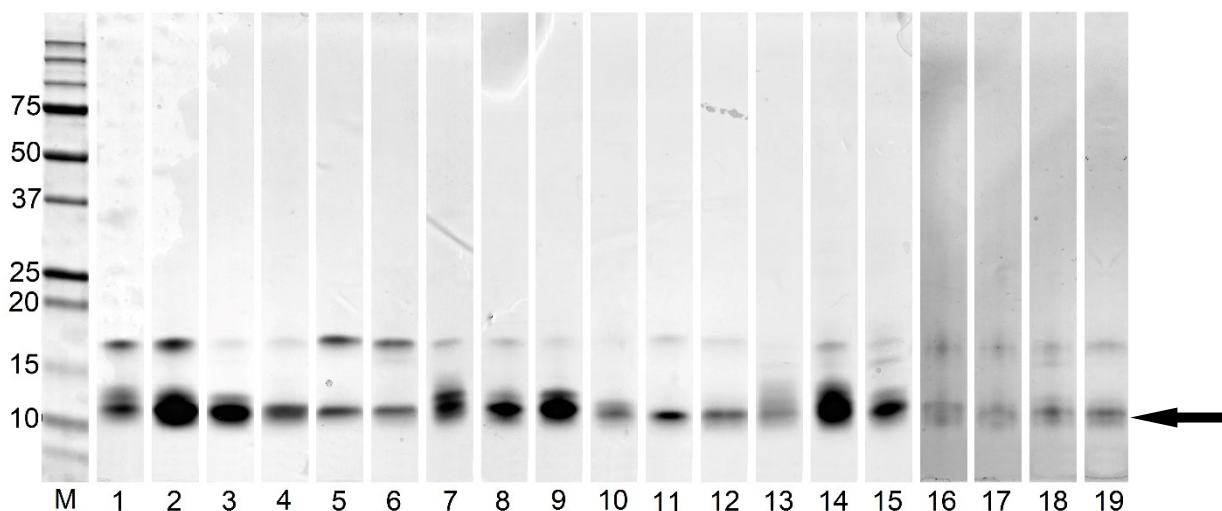
### 3.2.3 Iontově výměnná chromatografie

Pomocí iontově výměnné chromatografie byly získány frakce s nejnižším množstvím kontaminujících bakteriálních proteinů, se kterými byly na závěr prováděny další testy. Ze vzorků se podařilo víceméně odstranit nežádoucí protein o velikosti ≈25 kDa, ne však úplně protein o velikosti ≈16 kDa (Obr. 8).



**Obr. 8 Analýza frakcí s *rEnKC1* po iontově výměnné chromatografii.** SDS-PAGE frakcí ze solubilní fáze lyzátu šarže D<sub>ROS</sub> po iontově výměnné chromatografii. 20 µl z vybraných frakcí bylo nanášeno na 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ polyakrylamidový gel, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein r*EnKC1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1-9 – vybrané frakce

Všechny postupně získané vzorky byly dle relativní „čistoty“ rozděleny do 3 skupin; A, B a C. Skupinu C tvořily vzorky získané z inkluzních tělísek. Vzorky v rámci každé skupiny byly spojeny a přečištěny pomocí iontově výměnné chromatografie. U vybraných získaných frakcí byla změřena koncentrace proteinů a jejich obsah byl porovnán pomocí SDS-PAGE elektroforézy a obarvení gelu (Obr. 9). Tyto frakce byly poté jako jednotlivé vzorky použity v inhibičních testech Kunitz proteinů.



**Obr. 9** Analýza frakcí s *rEnKC1* skupin A-C po iontové výměnné chromatografii. Z vybraných frakcí bylo naneseno 1,6-1,8 µg proteinu na 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ polyakrylamidový gel, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein *rEnKC1*. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1-6 – frakce A<sub>19</sub>-A<sub>24</sub>; 7-12 – frakce B<sub>19</sub>-B<sub>24</sub>; 13-19 – frakce C<sub>19</sub>-C<sub>25</sub>

### 3.3 Testování získaných vzorků na přítomnost rekombinantních proteinů

#### 3.3.1 Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE

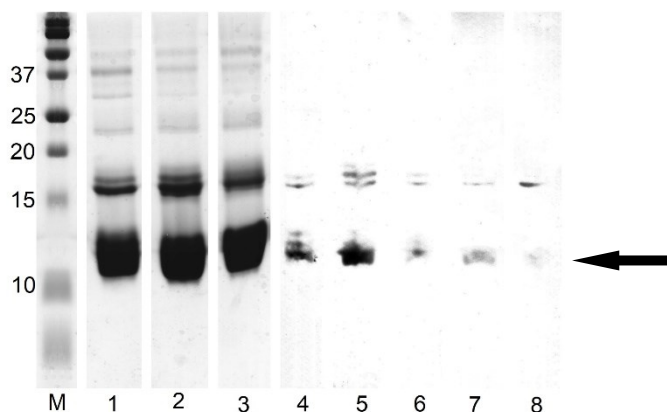
Po každém kroku purifikace došlo ke kontrole obsahu získaných vzorků elektroforetickou separací a barvením gelu. Bylo předpokládáno, že přítomnost požadovaného rekombinantního proteinu je indikována v oblasti odpovídající přibližně 10 kDa.

#### 3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky odeslané do laboratoře hmotnostní spektrometrie obsahovaly proteiny odpovídající dle vizualizace elektroforetické separované směsi přibližně 10 kDa (vz. č. 1), 16 kDa (vz. č. 2) a 25 kDa (vz. č. 3). Dle očekávání byl *rEnKC1* zastoupen majoritně ve vzorku č. 1, v menším množství ve vzorku č. 2, a také byl detekován ve vzorku č. 3. Všechny vzorky však obsahovaly i bakteriální kontaminace (viz Přílohu 4).

### 3.3.3 Detekce na blotu

Detekce přítomnosti proteinu díky značení histidinovou kotvou proběhlo opakovaně v různých vzorcích. Pro tyto účely nebyla před nanášením vzorku měřena koncentrace proteinů. Proteiny se podařilo detekovat jak pomocí anti-His protilátek, tak pomocí iBODY4 s tím, že při použití iBODY4 byl výsledek zřetelnější. V obou případech však byla znatelná reakce nejen v předpokládané oblasti, kolem molekulové velikosti 10 kDa, ale i ve zbylých výrazných proteinových prouzcích znatelných při barvení gelu po elektroforetické separaci (Obr. 10).



**Obr. 10** Detekce *rEnKC1* obsahujícího histidinovou kotvu pomocí imuno- a afino-blottingu. Použité byly vzorky z frakcí ze solubilní fáze lyzátu šarže *D<sub>ROS</sub>* po iontové výměnné chromatografii. Pro vizualizaci barvením gelu (1-3) bylo nanášeno 8  $\mu$ l z vybraných frakcí, pro detekci na blotu byly nanášeny 2  $\mu$ l z vybraných frakcí. Šipka indikuje předpokládaný rekombinantní protein *rEnKC1*. M – marker molekulové velikosti (v kDa); 1-3 – 15% gel po obarvení Coomassie Brilliant Blue R-250; 4-6 – proteiny detekované pomocí iBODY4 na blotovací membráně (frakce shodné s 1-3); 7-8 – proteiny detekované pomocí anti-His protilátek na blotovací membráně (vzorek 7 odpovídá vzorku 2 a 5).

## 3.4 Testování schopnosti rekombinantních *rEnKT1* a *rEnKC1* inhibovat komplement v séru

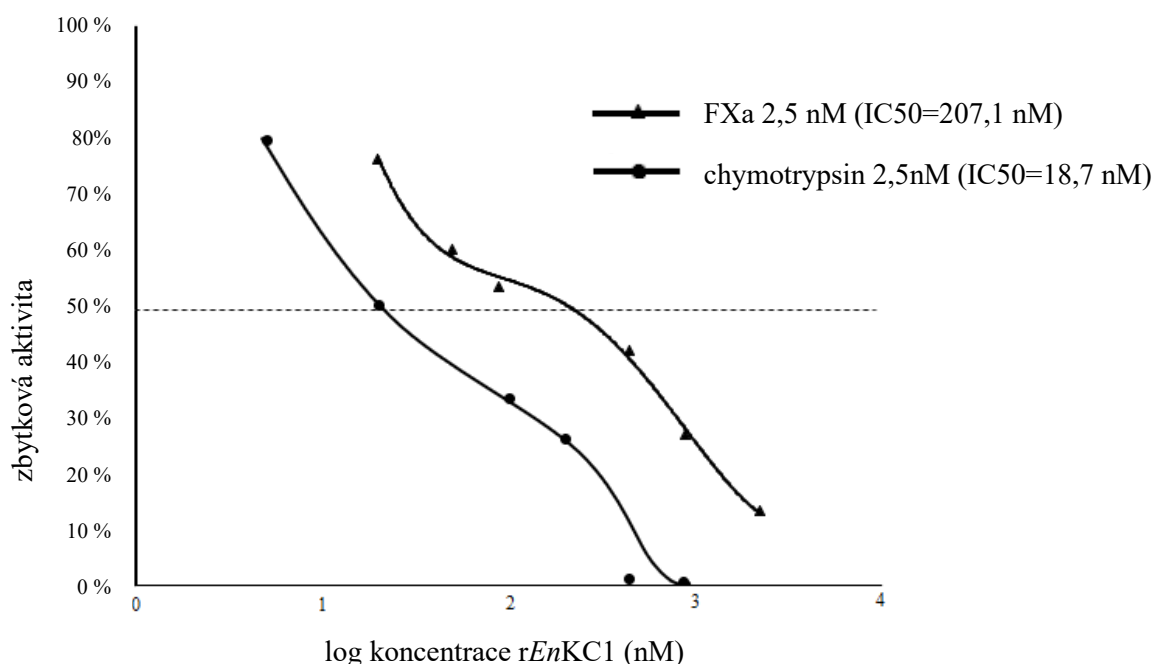
Králičí erythrocyty byly v přítomnosti 10% rybího séra zlyzovány v průměru za 3 min 40 s, v přítomnosti 25% lidského séra za 9 min.

Byla ověřena schopnost *rEnKT1* inhibovat komplement v rybím séru (viz Jedličková *et al.* 2019). Při koncentraci rekombinantního proteinu 4  $\mu$ M byl čas kompletní lyze erythrocytů přibližně 6 min. Při testu vlivu na komplement v lidském séru nebyl pozorován žádný účinek 4  $\mu$ M ani 8  $\mu$ M *rEnKT1* na lyzi králičích erythrocytů. Při testu vlivu rekombinantního proteinu *rEnKC1* nebyl pozorován účinek na komplement lidského, ani rybího séra.

## 3.5 Test inhibiční aktivity *rEnKC1* proti vybraným proteázám

Rekombinantní protein *rEnKC1* byl testován proti vybraným serinovým proteázám. Z měření vyplývá, že na hovězí pankreatický trypsin a plasmin ani na trombin z lidské plazmy nemá žádný efekt. V případě hovězího pankreatického  $\alpha$ -chymotrypsinu a faktoru FXa z hovězí plazmy dochází k inhibici

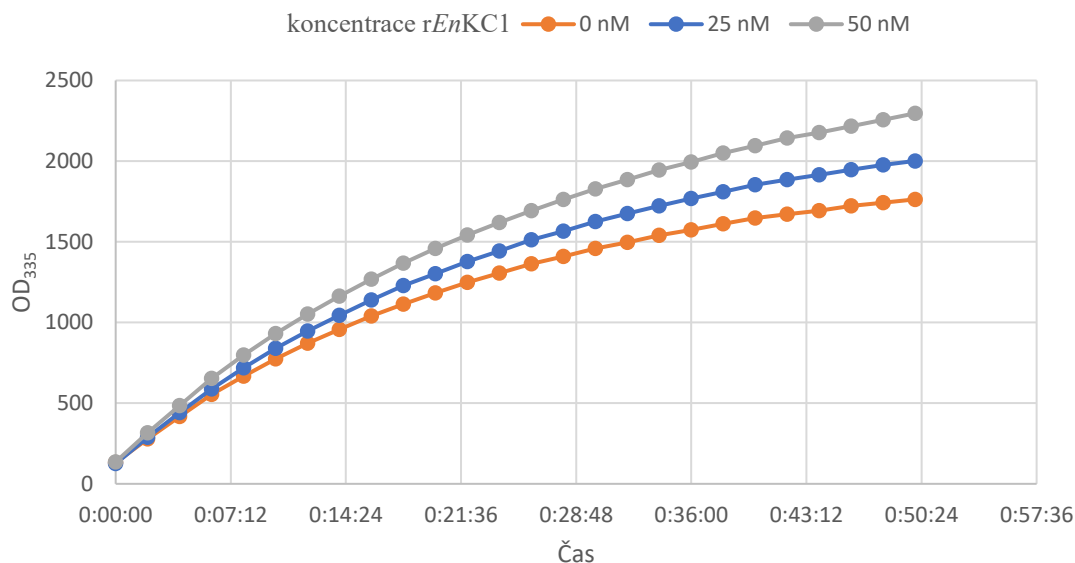
proteolytické aktivity, hodnoty  $IC_{50}$  jsou znázorněny v Obr. 11. Z naměřených hodnot vyplývá, že *EnKC1* je potentním inhibitorem chymotrypsinu a FXa je inhibován s menší účinností.



**Obr. 11** Relativní inhibice  $\alpha$ -chymotrypsinu a FXa rekombinantním *rEnKC1*. Přerušovaná čára představuje 50% hladinu inhibice aktivity peptidázy ( $IC_{50}$ ). Relativní hodnoty inhibice jsou vztaženy k naměřeným hodnotám při 0nM koncentraci, považovaným za 100 %. Hodnoty  $IC_{50}$  byly extrapolovány z nelineární regrese zahrnující 0nM koncentraci inhibitoru *rEnKC1*.

Oproti předpokladům, peptidolytická aktivita kallikreinu z lidské plazmy se se zvyšující se koncentrací přidaného *rEnKC1* významně zvyšovala (Obr. 12). Kontrolní měření však neprokázalo žádnou peptidolytickou aktivitu ve vzorcích purifikovaného *rEnKC1*, a to s žádným z fluorogenních substrátů použitých pro měření aktivity jednotlivých testovaných proteáz.

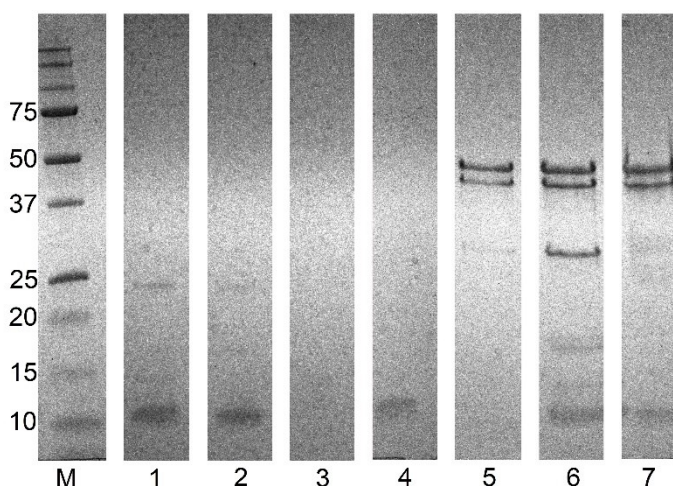




**Obr. 12 Test schopnosti rEnKC1 inhibovat kallikrein.** Časový průběh reakce kallikreinu (finální koncentrace 2,5nM) s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (finální koncentrace 50 $\mu$ M) a inhibitorem rEnKC1 (různé finální koncentrace).

### 3.6 Test stability komplexu rEnKC1-chymotrypsin a rEnKC1-FXa

Při testování vzniku komplexu rEnKC1-FXa bylo následně po obarvení gelu detekováno několik proteinů, a to 2 výrazné o velikosti v rozmezí asi 40–50 kDa, dále  $\approx$ 30 kDa,  $\approx$ 18 kDa,  $\approx$ 15 kDa a  $\approx$ 10 kDa odpovídající rEnKC1 (Obr. 13). Z prezentovaného gelu nelze usuzovat na tvorbu stabilního komplexu rEnKC1 s aktivovaným faktorem Xa. Komplex rEnKC1-chymotrypsin nebyl za použitých podmínek detekován.



**Obr. 13 Detekce vzniku komplexu rekombinantního proteinu rEnKC1 s proteázami chymotrypsin a FXa** na SDS-PAGE elektroforéze na 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ polyakrylamidovém gelu, barveno v Coomassie Brilliant Blue R-250. Na gel bylo nanášeno 1  $\mu$ g proteázy a 2  $\mu$ g rEnKC1. M – marker molekulových velikostí (v kDa); 1 – rEnKC1+chymotrypsin nevařeno, 2 – rEnKC1+chymotrypsin vařeno 20 min, 3 – chymotrypsin, 4 – rEnKC1; 5 – FXa; 6 – rEnKC1+FXa vařeno 20 min; 7 – rEnKC1+FXa nevařeno



## 4 DISKUSE

V této práci jsem se snažila přispět, kromě prvotních vytyčených cílů experimentální práce, také vzhledem do spektra a vlastností již popsaných proteinů s Kunitzovou doménou. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi intenzivně studovanou skupinu inhibitorů, nebylo v možnostech této práce zdaleka postihnout všechny, které již byly popsány. Nebyli však opomenuti zejména významní zástupci původem z parazitických organismů. V rámci studia literatury týkající se Kunitz proteinů jsem narazila i na problematiku nekonzistence publikovaných výsledků.

V případě ověřování funkce nového Kunitz proteinu se často vychází z extrapolace výsledků získaných při studiu jiných blízkých Kunitz proteinů (např. příbuzného živočišného druhu), případně ze známé sekvence. Výsledné známé spektrum inhibovaných proteáz, a od něho často pouze odvozených hypotetických funkcí, tedy silně závisí na výběru testovaných proteáz. Každý studovaný Kunitz protein pak má více či méně unikátní „testovací sadu proteáz“, takže ani při pečlivém porovnávání primárních struktur různých Kunitz proteinů se nedá spolehlivě odvodit souvislost s funkcí, která ve mnoha případech ani nebyla přesvědčivě odhalena a velmi často bývá prezentována na základě *in vitro* experimentů. Kdyby se všechny jednotlivé Kunitz proteiny otestovaly na podstatně širším spektru proteáz, i na možnost účinku proti iontovým kanálům, pravděpodobně by se odhalilo množství dalších funkcí, jako tomu bylo např. v případě dendrotoxinu z hadího jedu, u nějž se komplexnější funkce potvrdila až s odstupem 24 let od jeho objevení (Kodama *et al.*, 2020). Dá se tedy předpokládat, že možná některé Kunitz proteiny, které vykazují nulovou nebo velmi nízkou účinnost na serinové proteázy, mají ve skutečnosti jiné zajímavé funkce, které ještě nebyly odhaleny.

Je evidentní, že i podmínky experimentu mohou stát i za nesprávnými výsledky. Původně bylo např. popsáno, že Ablomim-X inhibuje pouze faktor Xa a neinhibuje plasmin a trypsin (Batista *et al.*, 2010). Později se však ukázalo, že plasmin a trypsin inhibuje také, i když v omezené míře (Branco *et al.*, 2016).

Specifickou problematikou jsou v tomto ohledu Kunitz proteiny s více doménami (např. lidský TFPI-2, klíštěcí BmTI-6, BmTI-A a ornithodorin nebo catrin z hlístice *Ancylostoma caninum*). Pokud byla inhibice vybraných proteáz prováděna s celými proteiny, a jejich domény mají odlišné sekvence, nelze určit (případně vyvodit z publikovaných výsledků), která doména je za konkrétní reakci (funkci) zodpovědná, a tudíž se výsledky v souvislosti s primární sekvencí jiných Kunitz proteinů nedají spolehlivě porovnávat (např. Sasaki & Tanaka, 2008; Tanaka *et al.*, 1999).

Ne vždy je také správně určena P1 pozice aktivního místa, na které může podstatně záviset specifita Kunitzova inhibitoru, pokud sekvence není dostatečně konzervativní, zvláště v případě vícedoménových nebo větších proteinů. Vývoj dalších úvah o funkci na základě porovnávání primárních sekvencí pak není zcela korektní. Např. Batista *et al.* (2010) porovnávali aktivní doménu Amblyomim-X (P1 = S) s doménou ixolarisu (P1 = N), přičemž dříve byla jako aktivní Kunitz doména ixolarisu určena jiná sekvence (P1 = E; Francischetti *et al.*, 2002). Přestože ixolaris nemá charakteristickou sekvenci v oblasti aktivní domény, lze pomocí programových algoritmů identifikovat oblast interagující se serinovými proteázami (Marchler-Bauer *et al.*, 2017), čímž ovšem dostaneme opět jiný výsledek. Je tedy překvapující, když se publikované informace neshodují, nicméně to na druhou stranu dokazuje, že s narůstajícím počtem identifikovaných proteinů se zvyšuje i diverzita v rámci proteinové rodiny a konformita skupiny se rozpadá – přestože ixolaris je řazen mezi Kunitz proteiny, není možné jednoznačně určit pozici aktivní domény pouze konvenčním srovnáním s jinými, typičtěji členy této rodiny.

Sekvence Amblyominu-X se podobá konkunitzinu (inhibitoru iontových kanálů z plže *Conus striatus*), a i vzhledem k malému účinku na serinové proteázy je spíše adeptem na hledání zcela odlišných funkcí. Charakterizovány byly tak jiné než pro Kunitz proteiny typické účinky, jako je inhibice angiogeneze či protinádorová aktivita (Drewes *et al.*, 2012; Maria *et al.*, 2019). Malá účinnost vůči serinovým proteázám tak může navést na zcela jiné možnosti využití. Otázkou však zůstává, na základě čeho se lze rozhodnout pro tak atypické experimenty?

Dalším problémem, se kterým jsem se při studiu literatury setkala, je neustálené názvosloví Kunitz proteinů, které někdy může ztížit dohledávání informací ke konkrétním proteinům. Stávalo se např., zejména v době před nástupem molekulárních technik a sekvenování, že jeden protein měl (a má dodnes) více názvů. Například u lidského TFPI-2 bylo až časem zjištěno, že se jedná o identický protein jako dříve označený placentální protein 5 (PP5), glykoprotein izolovaný z placenty (Petersen *et al.*, 1996). Kunitz protein CSTI (trypsinový inhibitor asociovaný s kokonovou schránkou (cocoon shell-associated trypsin inhibitor) bource morušového *Bombyx mori* (Kurioka *et al.*, 1999) byl později popsán jako BmSPI 1 (inhibitor serinových proteáz z *Bombyx mori*; *Bombyx mori* serine protease inhibitor) kvůli snaze o sjednocení názvosloví Kunitz proteinů, ale bez přímého odkazu na původní pojmenování (Nirmala *et al.*, 2001). Protein muchničky *Simulium vittatum* označený jako SV-66 byl až po širším otestování jeho funkce přejmenován na simukunin (Tsujimoto *et al.*, 2012).

Snaha o relativně přehledné pojmenovávání s obvyklým využitím prvních písmen latinského názvu zdrojového organismu začne být problematická, když je daný organismus přejmenován. Kunitz proteinům klíštěte *Rhipicephalus microplus* tak zůstává zkratka Bm (z původního *Boophilus microplus*) a u jednoho z nich i název boophilin. *Ornithodoros kalahariensis* má 2 popsané Kunitz proteiny: savignin a savignygrin (podle původního určení z *O. savignyi*). To je také případ našeho modelového organismu, u kterého možná dojde na základě genetických a morfologických analýz k přejmenování z *Eudiplozoon nipponicum* na *E. kamegaii* (Nishihira & Urabe, 2020). Nicméně tato práce zůstává prozatím u původního názvu tohoto monogenea, neboť materiál zatím nebyl porovnán a není tudíž možné zodpovědně rozhodnout, zda se jedná o druh přejmenovaný ve výše zmíněné publikaci. Zároveň u Kunitz proteinu nově popsáného v této práci zůstávám u zkratky *En* z důvodu zachování konzistentnosti v názvosloví proteinů popsáných z daného organismu s ohledem na předchozí publikace (Vorel *et al.* 2021, Jedličková *et al.* 2019, Roudnický *et al.* 2018, Jedličková *et al.* 2018, Ilgová *et al.* 2017, Jedličková *et al.* 2016).

## 4.1 Bioinformatická analýza sekvencí Kunitz proteinů *E. nipponicum*

Jedním z cílů experimentální části této práce bylo hlubší poznání spektra inhibitorů Kunitzova typu u *E. nipponicum*. K dispozici byla transkriptomová databáze, ze které bylo získáno téměř 40 sekvencí, jejichž hlubším porovnáním bylo zhodnoceno, že tento parazit disponuje celou řadou těchto proteinů.

Kunitz proteiny byly z transkriptomu *E. nipponicum* identifikovány na základě sekvenční podobnosti s dříve charakterizovaným *EnKT1*. Některé mohly být pravděpodobně duplikáty, případně chybně přepsané duplikáty, byl mezi nimi i relativně velký podíl nekompletních sekvencí. Lze však obecně tvrdit, že tento červ je vybaven celou řadou Kunitz proteinů, jak bylo popsáno i u některých dalších helmintů – např. tasemnice *Echinococcus granulosus* (Fló *et al.*, 2017) a motolice *Fasciola hepatica* (Smith *et al.*, 2020), ale i u klíšťat *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes ricinus* nebo

*Rhipicephalus microplus*. Vzhledem k tomu, že Kunitz proteiny podléhají rychlému evolučnímu vývoji díky potřebě parazita dokonale odolávat hostitelským obranným mechanismům, je rozsáhlá genetická výbava podléhající selekci základem úspěchu (Schwarz *et al.*, 2014).

U výše zmíněných helmintů bylo zjištěno, že variabilita Kunitz proteinů souvisí s větším množstvím životních stádií, která mají v rámci životního cyklu různé podmínky, a tím pádem se liší i jejich exkrecně-sekrecní produkty. Monogenea mají sice přímý vývoj, nicméně také procházejí určitými morfologickými a fyziologickými změnami během vlastní ontogeneze, a tudíž je pravděpodobné, že spektrum aktivních proteinů účastnících se interakce s hostitelem se bude v časovém průběhu měnit. Také obranné reakce v hostitelských tkáních procházejí určitým vývojem a proteiny sekretované parazitem na tyto změny musejí zákonitě reagovat. Tato práce stojí na transkriptomu dospělých jedinců, ve kterém byl již identifikován jeden protein s Kunitz doménou, *EnKT1* (Jedličková *et al.*, 2019). Výsledky biochemických studií tohoto proteinu potvrzují, že má zřejmě značný vliv na příjem krve parazitem, její trávení a ochranu střeva parazita před komplementem hostitele. Nicméně spektrum sekretovaných Kunitz proteinů by mohlo být odlišné například v iniciačních fázích kontaktu parazita s hostitelem.

Z transkriptomových dat bylo pro účely této práce vybráno 5 sekvencí, které vykazovaly značnou podobnost v primární struktuře s Kunitz doménou *EnKT1*, ale zároveň odlišností v N-koncových částech nebo v pozici P1. Těchto 5 sekvencí bylo opakovaně ověřeno. U jedné z těchto sekvencí bylo předpovězeno, že není kompletní, což bylo potvrzeno pomocí RACE-PCR a sekvence byla doplněna. Dle programu SignalP-5.0 (Armenteros *et al.*, 2019) mají všechny tyto proteiny signální sekvenci a pouze u dvou po jejím odštěpení zůstane na N-konci před aktivní doménou unikátní část neshodující se s porovnávaným *EnKT1* – u kontigů 54389|m.357154 a 00453|m.828.

V ověřených nukleotidových sekvencích těchto Kunitz proteinů byly identifikovány jisté bodové mutace, které v některých případech měly vliv na přepisovanou aminokyselinu (viz Přílohu 3). Nelze říci, zda se všechny varianty objevují také v proteomu, ani zda tyto drobné odchylky mohou vést k velké změně ve specifitě či funkci samotného proteinu, přestože bylo prokázáno, že i změna jediné aminokyseliny v Kunitz proteinu může zásadně narušit či posílit jeho inhibiční funkce (Ascenzi *et al.*, 2003). Mimo jiné toto zjištění svědčí o značné evoluční plasticitě Kunitz proteinů. Jednou z dalších příčin této variability mohl být i fakt, že izolace RNA pro pozdější sekvenaci transkriptomu byla provedena ze vzorku několika jedinců *E. nipponicum*, k čemuž došlo i v případě izolace RNA pro ověřování sekvencí vybraných proteinů. Tak velká variabilita se proto nemusí vyskytovat v jednom konkrétním jedinci parazita, ale může být záležitostí populace.

Pozice P1 aktivní domény určuje do značné míry specifitu inhibitoru. *EnKT1* má v místě P1 arginin (R); u dalších se nejčastěji objevuje lysin (K) a leucin (L). R a K v P1 předurčují (teoreticky) protein k inhibici trypsinu, zatímco L je spojován s inhibicí chymotrypsinu. Proto byl pro další analýzy vybrán jeden ze dvou potenciálních proteinů, který měl v pozici P1 leucin. Zároveň tato sekvence vykazovala v porovnání s ostatními potvrzenými sekvencemi nejvíce (celkem 6) mutací v rámci aktivní domény, a navíc obsahovala krátkou N-koncovou sekvenci. Bylo tedy očekáváno, že tento protein bude inhibovat chymotrypsin, a dále by mohl mít odlišné vlastnosti od *EnKT1*.

Sekvence vybraného kontigu 54389|m.357154 kódující protein nazvaný *EnKC1* má všechny charakteristické rysy Kunitz proteinů, tedy 6 cysteinů typického rozložení, 2 fenylalaniny v pozicích P17 a P29, glycin kolem cysteinu CIV (Pritchard & Dufton, 1999), malou velikost a jednu z typických aminokyselin v pozici P1 (Leu). Přítomnost signální sekvence svědčí o tom, že je cíleně sekretován.

Gen tohoto vytipovaného Kunitz proteinu o délce 300 bp kóduje protein o délce 99 aminokyselin s celkovou molekulovou hmotností odhadovanou na 10,68 kDa (pI 6,07, Gasteiger *et al.*, 2003). Po odstrižení signální sekvence má protein 75 aminokyselin a velikost 8,04 kDa (pI 7,71), což odpovídá průměrné velikosti jednodoménových Kunitz proteinů kolem 8 kDa a 60 aminokyselin.

Při porovnávání sekvence (bez signálního peptidu) s proteinovou databází NCBI pomocí nástroje BLAST® se nejpodobněji jeví například sekvence Kunitz proteinů jedu členovců, povrchových sekretů sasanek nebo protein s Kunitz doménou z agamy australské (*Pogona vitticeps*). To potvrzuje, že Kunitz proteiny na základě podobnosti sekvencí vytvářejí klastry bez ohledu na druhovou příbuznost (Pritchard & Dufton, 1999). Co se týče funkce, nelze v tomto případě sledovat podobnosti, neboť Kunitz proteiny sasanek jsou charakterizovány jako inhibitory iontových kanálů a zbylé nebyly doposud funkčně popsány.

## 4.2 Exprese a purifikace rEnKC1

Rekombinantní rEnKT1 byl exprimován v buňkách *E. coli* kmene BL21. Pro nový Kunitz protein jsme zvolili jiné kmeny, a to SHuffle™ a Rosetta Gami B, které jsou zvláště upravené pro expresi proteinů obsahujících disulfidové vazby (Fathi-Roudsari *et al.*, 2016). Detekce obsahu histidinovou kotvou značeného proteinu v rozpustné fázi i inkluzních tělískách bakterií prokázaly úspěšnou expresi i při různých teplotních podmínkách.

Vzorky získané z rozpustné fáze a z inkluzních tělísek byly zpracovávány odděleně, protože nebylo jisté, zda budou proteiny z inkluzních tělísek ve správné konformaci. Rozdíl ve výtěžku během purifikace nebyl pozorován a též konečné výsledky žádný rozdíl neukázaly. Rekombinantní protein je tedy možné získat jak ze solubilní fáze, tak z inkluzních tělísek a v obou případech bylo dosaženo stejných výsledků při testování inhibiční aktivity vůči vybraným proteázám.

Purifikace nového rekombinantního proteinu byla velmi zdlouhavá. Oproti rEnKT1 se opakovaně nedařilo získat po afinitní chromatografii úplně čistou frakci, přestože bylo předpokládáno, že vysoká podobnost obou proteinů zaručí úspěch při stejném postupu. Proto bylo přikročeno i k iontově-výměnné chromatografii, která výsledek purifikace zlepšila, nicméně stále jsme se potýkali s jistou mírou kontaminace. Získané vzorky obsahovaly proteiny o velikosti přibližně 10, 16 a 25 kDa, přičemž požadovaný rekombinantní protein odpovídal právě velikosti kolem 10 kDa (8, 86 kDa). Menší mobilita v gelu při elektroforéze oproti teoretické  $M_w$  mohla být dána rozbalením proteinu po redukci disulfidových můstků, jak bylo popsáno např. u katepsin L-like peptidázy cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* (Mikeš & Man, 2003). Hmotnostní spektrometrie a částečně i detekce pomocí protilátek na membráně ovšem prokázaly hledaný protein ve vzorcích odpovídajících všem třem molekulovým velikostem. V předpokládaném proužku byl nejzastoupenější, v proužku kolem 16 kDa byl druhý nejzastoupenější a ve třetím proužku byl čtvrtý nejzastoupenější. Zbytek vzorku dále obsahoval některé nežádoucí bakteriální proteiny.

Přítomnost rekombinantního proteinu ve třech proteinových proužcích v gelu po SDS-PAGE elektroforéze může mít několik příčin. Kvůli redukujícímu prostředí se struktura proteinu rozvolní a může přidat na objemu oproti sbalené konformaci stabilizované disulfidickými můstky, a část proteinů tak mohla být zpomalována. Dále může protein tvořit dimery nebo se vázat na jiné složky ve vzorku. Také je možné, že bakteriální proteiny samy obsahovaly větší počet histidinů a docházelo k jejich

separaci během chromatografie obdobně, jako u požadovaného rekombinantního proteinu. V neposlední řadě mohlo docházet k nespecifickým vazbám rekombinantního proteinu s bakteriálními proteiny, čemuž nasvědčuje také jeho výskyt v proteinových shlucích o větší molekulové velikosti. Zároveň ve vzorcích rEnKT1 se nevyskytoval kontaminující band o velikost kolem 25 kDa, což mohlo být způsobeno tím, že byl exprimován v jiných bakteriálních kmenech, nebo se jedná právě o souvislost s jinou strukturou rekombinantního proteinu. Nicméně tyto možnosti jsme dále neověřovali.

Přestože nebylo předpokládáno, že by proteiny kontaminující získaný vzorek rekombinantního proteinu měly výrazný vliv na jeho funkční vlastnosti, je jisté, že jejich přítomnost mohla ovlivnit konečné výsledky analýz. Především z toho důvodu, že nebylo možné určit přesnou koncentraci EnKC1 ve vzorcích použitých v testech, byť byly vybírány vzorky (frakce) s minimální kontaminací. To na druhou stranu snižovalo reálný výtěžek exprimovaného proteinu. Pro jistotu byla například při testování inhibice komplementu použita i velmi vysoká koncentrace proteinu, kdy by i při řádově nižší reálné koncentraci EnKC1 byl výsledek patrný.

### 4.3 Inhibiční testy

Kunitz proteiny jsou mj. součástí regulačních procesů zahrnujících krevní srážlivost. Těto vlastnosti využívají ve velké míře krevsající parazité, kteří se právě se srážlivostí krve svého hostitele musejí neustále vyrovnávat. Kaskáda koagulace krve a rozpouštění fibrinových sraženin je z velké části založena na trypsin-like serinových peptidázách (Liang & Bowem, 2016). Nejčastější serinové peptidázy, které se stávají cílem inhibitorů, jsou faktor Xa a faktor VIIa (Francischetti *et al.*, 2002; Tsujimoto *et al.*, 2012; Ranasinghe *et al.*, 2015b).

Tato práce navazuje na předchozí výsledky dokazující přítomnost inhibitorů několika vybraných serinových proteáz v rozpustném proteinovém extraktu *E. nipponicum* (Jedličková *et al.*, 2019). Přestože byl již identifikován efektivní inhibitor EnKT1, předpokládá se, že pro úspěšné přežití využívá i tento parazit celé spektrum proteinů interferujících s hostitelskou homeostázou.

Pro testování inhibiční specifity nově identifikovaného Kunitz proteinu rEnKC1 byla vybrána sada dostupných serinových proteáz, které s touto skupinou inhibitorů interferují. V první řadě se jedná o trypsin a chymotrypsin – dle známé sekvence a typické aminokyseliny v místě P1 (L) bylo předpokládáno, že tento Kunitz protein bude inhibovat chymotrypsin. Současná inhibice trypsinu však není vyloučená – např. EgKI-1, Kunitz protein z tasemnice *Echinococcus granulosus*, má velmi podobné okolí aktivního místa i podobnou velikost a inhibuje právě trypsin i chymotrypsin (Ranasinghe *et al.*, 2015c). Výsledky však jednoznačně ukázaly, že rEnKC1 trypsin neinhibuje a na druhou stranu efektivně inhibuje chymotrypsin.

Další testované serinové proteázy souvisejí s koagulační kaskádou a fibrinolýzí. Přestože v přirozeném systému by nový Kunitz protein zřejmě inhiboval proteázy kapra, svého hostitele, byly v této práci použity proteázy komerčně dostupné, savčího původu. Zásadní motivy aktivních míst těchto proteáz důležité pro interakci s inhibitory jsou však vysoce konzervované u různých skupin obratlovců (Jedličková *et al.*, 2019), a tak bylo možno předpokládat, že se jedná o vhodnou alternativu.

Kromě trypsinu rekombinantní protein jednoznačně neinhiboval také plasmin a trombin. V případě trombinu se nejedná o překvapující výsledek – tato proteáza je Kunitz proteiny inhibována spíše výjimečně, téměř výhradně pouze Kunitz proteiny klíšat a navíc většinou odlišným (nekanonickým)

způsobem, tedy N-koncovou částí, a to nekompetitivně, nikoliv kompetitivní inhibicí prostřednictvím aktivní domény (Van De Locht *et al.*, 1996). Nicméně, jak již bylo potvrzeno, negativní výsledek může být zvrácen při změně podmínek experimentu (Branco *et al.*, 2016), což by však vyžadovalo řadu dalších pokusů s optimalizací mnoha parametrů. Zda *EnKC1* je nebo není schopný inhibovat plasmin a trombin v přirozených podmínkách tedy zatím nelze s jistotou tvrdit.

Výsledky testů inhibiční aktivity *rEnKC1* vůči kallikreinu vyšly nejasně. Je možné, že se inhibitor váže jinam než do aktivního místa, čímž ovlivňuje jeho konformaci a přístupnost reziduí aktivní domény, a tak působí spíše jako aktivátor. Tento experiment by však bylo potřeba opakovat, případně upravit jeho podmínky, aby bylo možné učinit validní závěry. Zároveň je nutné poznamenat, že rybí plasma postrádá komponenty kininové kaskády zahrnující kallikrein (Wong & Takei, 2013), takže v přirozených podmínkách k interakci *EnKC1* s kallikreinem nedochází.

Naopak byla potvrzena inhibice faktoru Xa. Faktor Xa je klíčový v koagulační kaskádě, neboť přeměňuje protrombin na trombin (Krishnaswamy, 2013), a jeho účinná inhibice zásadně ovlivňuje krevní srážlivost. Náš rekombinantní protein se zdá být velmi efektivním inhibitorem faktoru Xa, neboť 50% zbytková aktivita 2,5nM proteázy byla z naměřených hodnot určena při 207,1nM koncentraci inhibitoru. FXa je přitom svým charakterem trypsin-like proteáza.

Vzhledem k tomu, že z vybraných serinových proteáz účastnících se koagulační kaskády byla inhibice evidována pouze u faktoru Xa, je možné, že právě tato proteáza je předním cílem tohoto inhibitoru. Ačkoliv nebyl testován vliv *rEnKC1* na samotný celkový proces koagulace krve (rybí či jiné), dá se pozitivní výsledek předpokládat. Nelze však vyloučit, že *EnKC1* také inhibuje i jiné složky koagulační kaskády, které nebyly testovány. Nicméně klíčová pozice faktoru Xa v koagulační kaskádě naznačuje, že by *EnKC1* mohl účinně zabraňovat srážení krve, což ve výsledku parazitovi usnadňuje její příjem.

Inhibice FXa však v jiném ohledu trochu překvapující. Faktor Xa patří mezi trypsin-like serinové proteázy, ale jak již však bylo zmíněno, tyto dvě skupiny (trypsin-like a chymotrypsin-like) nejsou úplně striktně oddělené. Kunitz proteiny inhibující trypsin i chymotrypsin nejsou výjimkou a již bylo popsáno také několik takových, které inhibují chymotrypsin i faktor Xa (i když třeba velmi slabě), například simukunin (Tsujimoto *et al.*, 2012), Kunitz proteiny schistosom (Ranasinghe *et al.*, 2015a; b) nebo lidský bikunin (Delaria *et al.*, 1997).

Navzdory inhibiční schopnosti vůči chymotrypsinu a FXa se nepodařilo detekovat vznik komplexu s těmito proteázami. U chymotrypsinu mohlo dojít k degradaci enzymu během inkubace, jelikož nebyl detekován ani ve vzorku bez inhibitoru. Vazba v komplexu s FXa mohla být příliš slabá a podlehnout denaturujícím účinkům SDS.

Zvláštnost *EnKC1* tkví v tom, že má v pozici P1 aktivní domény leucin (L). Kunitz proteiny inhibující faktor Xa mají v této pozici obvykle arginin (R), méně často lysin (K) nebo jinou vzácnější mutaci. Pravdou však je, že většina Kunitz proteinů s L v pozici P1 nebyla ani proti faktoru Xa testována. Je to jeden z problémů znemožňujících porovnávání výsledků. Jednoznačně je však kombinace inhibiční aktivity proti chymotrypsinu a faktoru Xa v souvislosti s výskytem typicky „chymotrypsin-like aminokyseliny“ v klíčové pozici aktivní domény Kunitz proteinu neobvyklá.

Protože bylo již dříve pozorováno, že faktor Xa a plasmin mohou figurovat též jako alternace C3 a C5 konvertázy v komplementové kaskádě (Amara *et al.*, 2010), je možné, že inhibitor faktoru Xa by

mohl mít vliv též na tuto reakci. Znemožnění aktivace komplementu v krvi přijaté parazitem může ochránit buňky jeho gastrodermis před poškozováním. Rekombinantní protein *rEnKT1* i podle našich ověřovacích výsledků zřetelně zpomaluje lyzi králičích erytrocytů v rybím séru, na rozdíl od *rEnKC1*. Prvně jmenovaný však kromě faktoru Xa inhibuje také plasmin. Hodnoty se sice neshodovaly s dříve publikovanými výsledky (Jedličková *et al.*, 2019), nicméně vzhledem k povaze experimentu a vyhodnocování výsledků, které je založeno pouze na pozorování, může být odlišnost zapříčiněna různými podmínkami i pozorovacími schopnostmi.

Ani u jednoho z rekombinantních proteinů nebyl pozorován vliv na aktivitu lidského komplementu, nicméně tento pokus byl prováděn pouze jednou, takže nelze vyvozovat plnohodnotné závěry.

Pro fakt, že *rEnKC1* oproti *rEnKT1* neinhibuje plasmin a ani nebyl pozorován vliv na lyzi erytrocytů, je několik možných vysvětlení. Pouhá inhibice faktoru Xa proteinem *rEnKC1* nemusí být dostačující, aby se zabránilo aktivaci komplementu v plné míře. Zároveň je tato část imunitní odpovědi ryb komplikovanější, neboť složky komplementové kaskády se zde vyskytují v mnoha isoformách (Nakao *et al.*, 2011) a faktor Xa nemusí být pro komplement ryb nijak zásadní. Každopádně se zdá, že v této oblasti nehraje *rEnKC1* v obraně parazita před hostitelskou imunitou významnou roli. Dále ani u *rEnKT1* není zatím jisté, zda za inhibici (rybího) komplementu zodpovídá inhibice FXa a plasminu, nebo zda jsou jím inhibovány jiné serinové proteázy, jako např. MASP-2 asociovaná s lektinovou dráhou aktivace komplementu (Jedličková *et al.* 2019), jako je tomu u lidského Kunitz inhibitoru TFPI (Keizer *et al.*, 2015). Rozdíl ve schopnosti inhibovat komplement by tedy mohl být dán i neschopností *rEnKC1* inhibovat tuto proteázu.

## 5 ZÁVĚR

Proces efektivního příjmu a trávení krve u krevsajících parazitů je velmi významným cílem výzkumu nejen kvůli plnému pochopení jeho fungování, ale také kvůli potenciálu ve farmakologii. Vzhledem k celému spektru strategií vypořádání se s obranou hostitele na molekulární úrovni představuje téměř každý druh parazita unikátní systém, který může odhalit další možnosti manipulace s komplexními reakcemi v krvi obratlovců.

*E. nipponicum* představuje relativně málo studovanou skupinu krevsajících parazitů z třídy Monogenea, nicméně se ukazuje, že je také vybaven množstvím proteáz i jejich inhibitorů. Tato práce přispívá k poznání nového Kunitz proteinu, pro nějž jsme navrhli název *EnKC1* (*Eudiplozoon nipponicum* Kunitz chymotrypsin inhibitor 1), a který se možná účastní procesu příjmu potravy parazitem. Současně je jisté, že se jedná pouze o část mnohem komplikovanějšího systému zahrnujícího řadu dalších inhibitorů proteáz z různých skupin (Ilgová *et al.*, 2017; Jedličková *et al.*, 2019; Roudnický *et al.*, 2018).

Bioinformatickou analýzou transkriptomu *E. nipponicum* bylo odhaleno téměř 40 potenciálních proteinů Kunitzova typu. Tyto sekvence sdílejí určitou podobnost s již popsaným inhibitorem *EnKT1*, především v doméně, a také vykazují typické vlastnosti Kunitz proteinů – 6 cysteinových zbytků, malou velikost a typické aminokyseliny v oblasti P6-P5'.

Jeden z ověřených potenciálních proteinů byl vybrán pro expresi v rekombinantní podobě v buňkách *E. coli* kmene SHuffle<sup>TM</sup> a Rosetta Gami B. U získaného rekombinantního proteinu nebyla prokázána schopnost inhibovat komplement v rybím ani lidském séru. Naopak byla pozorována inhibiční aktivita proti hovězímu  $\alpha$ -chymotrypsinu a faktoru Xa z lidské plazmy.

Vzhledem k časové náročnosti purifikace rekombinantního proteinu nedošlo na další možné analýzy, které by měly následně proběhnout. Efektivita tohoto Kunitz proteinu by se měla potvrdit testem schopnosti inhibovat koagulační kaskádu v rybí a lidské krvi, případně ověřit s krví FXa deficientních pacientů. V neposlední řadě se nabízí mnoho jiných experimentů, které odhalují další funkce Kunitz proteinů, jako například role v regulaci zánětlivých procesů, antimikrobiální obrany nebo vliv imunizace Kunitz proteinem na obranu rybího hostitele před nadměrnou parazitací *E. nipponicum*. Funkci *EnKC1* v přirozených podmínkách by mohla přiblížit lokalizace v těle parazita a také míra exprese v jeho různých životních stádiích. Tento protein tak do budoucna představuje vhodný předmět pro další výzkum.



## 6 SEZNAM LITERATURY

- Alim, M. A., Islam, M. K., Anisuzzaman, Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., Matsubayashi, M., Fujisaki, K., & Tsuji, N. (2012). A hemocyte-derived Kunitz-BPTI-type chymotrypsin inhibitor, H1ChI, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays regulatory functions in tick blood-feeding processes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(12), 925–934.
- Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Brückner, U. B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J. D., & Huber-Lang, M. (2010). Molecular Intercommunication between the Complement and Coagulation Systems. *The Journal of Immunology*, *185*(9), 5628–5636.
- Andreotti, R., Gomes, A., Malavazi-Piza, K. C., Sasaki, S. D., Sampaio, C. A. M., & Tanaka, A. S. (2002). BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, *2*(4), 557–563.
- Antuch, W., Berndt, K. D., Chávez, M. A., Delfín, J., & Wüthrich, K. (1993). The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *European journal of biochemistry*, *212*(3), 675–684.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., Cristofaro, R., & Menegatti, E. (2003). The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. *Current Protein & Peptide Science*, *4*(3), 231–251.
- Aso, Y., Yamashita, T., Meno, K., & Murakami, M. (1994). Inhibition of prophenoloxidase-activating enzyme from *Bombyx mori* by endogenous chymotrypsin inhibitors. *Biochemistry and molecular biology international*, *33*(4), 751–758.
- Azzolini, S. S., Santos, J. M. C., Souza, A. F., Torquato, R. J. S., Hirata, I. Y., Andreotti, R., & Tanaka, A. S. (2004). Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase inhibitor from the ectoparasite *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Experimental Parasitology*, *106*(3–4), 103–109.
- Bajaj, M. S., Birktoft, J. J., Steer, S. A., & Bajaj, S. P. (2001). Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*, *86*(10), 959–972.
- Banijamali, S. E., Amininasab, M., & Elmi, M. M. (2019). Characterization of a new member of kunitz-type protein family from the venom of Persian false-horned viper, *Pseudocerastes persicus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *662*, 1–6.
- Bathige, S. D. N. K., Umasuthan, N., Godahewa, G. I., Jayasinghe, J. D. H. E., Whang, I., Noh, J. K., & Lee, J. (2015). A homolog of Kunitz-type serine protease inhibitor from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*: Molecular insights and transcriptional modulation in response to microbial and PAMP stimulation, and tissue injury. *Fish and Shellfish Immunology*, *46*(2), 285–291.
- Batista, I. F. C., Ramos, O. H. P., Ventura, J. S., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Ho, P. L., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2010). A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *493*(2), 151–156.

- Bayrhuber, M., Vijayan, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J. E., Olivera, B. M., Terlau, H., Zweckstetter, M., & Becker, S. (2005). Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family: Structural and functional characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23766–23770.
- Bernard, V. D., & Peanasky, R. J. (1993). The serine protease inhibitor family from *Ascaris suum*: chemical determination of the five disulfide bridges. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), 367–376.
- Bode, W., & Huber, R. (1993). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *EJB Reviews*, 43–61.
- Bozas, S. E., Panaccio, M., Creaney, J., Dosen, M., Parsons, J. C., Vlasuk, G. V., *et al.* (1995). Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 74(1), 19–29.
- Branco, V. G., Iqbal, A., Alvarez-Flores, M. P., Sciani, J. M., de Andrade, S. A., Iwai, L. K., Serrano, S. M. T., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2016). Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1428–1435.
- Cao, J., Shi, L., Zhou, Y., Gao, X., Zhang, H., Gong, H., & Zhou, J. (2013). Characterization of a new Kunitz-type serine protease inhibitor from the hard tick *Rhipicephalus hemaphysaloides*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 84(2), 104–113.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnick, S. M., Mulenga, A., Rahman, M. S., & Azad, A. F. (2008). Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infection and Immunity*, 76(11), 5429–5435.
- Ceraul, S. M., Chung, A., Sears, K. T., Popov, V. L., Beier-Sexton, M., Rahman, M. S., & Azad, A. F. (2011). A kunitz protease inhibitor from *dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits rickettsia montanensis invasion. *Infection and Immunity*, 79(1), 321–329.
- Chand, H. S., Schmidt, A. E., Bajaj, S. P., & Kisiel, W. (2004). Structure-Function Analysis of the Reactive Site in the First Kunitz-type Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17500–17507.
- Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., Cao, Z., Liu, M., Li, W., Jiang, L., & Wu, Y. (2013). Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS ONE*, 8(4), 1–10.
- Chu, D., Bungiro, R. D., Ibanez, M., Harrison, L. M., Campodonico, E., Jones, B. F., Mieszczanek, J., Kuzmic, P., & Cappello, M. (2004). Molecular Characterization of *Ancylostoma ceylanicum* Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor: Evidence for A Role in Hookworm-Associated Growth Delay. *Infection and Immunity*, 72(4), 2214–2221.
- Costa, A. F. D. V., Gasser, R. B., Dias, S. R. C., & Rabelo, É. M. L. (2009). Male-enriched transcription of genes encoding ASPs and Kunitz-type protease inhibitors in *Ancylostoma* species. *Molecular and Cellular Probes*, 23(6), 298–303.

- Creighton, T. E. (1984). Disulfide bond formation in proteins. *Methods in Enzymology*, 107, 305–329.
- Cuesta-Astroz, Y., Oliveira, F. S. de, Nahum, L. A., & Oliveira, G. (2017). Helminth secretomes reflect different lifestyles and parasitized hosts. *International Journal for Parasitology*, 47(9), 529–544.
- Dai, S. X., Zhang, A. Di, & Huang, J. F. (2012). Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1).
- Dan, Á., Pereira, M. H., Pesquero, J. L., Diotaiuti, L., & Lacerda Beirão, P. S. (1999). Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *Journal of Medical Entomology*, 36(6), 875–879.
- Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363–10370.
- de Almeida Nogueira, N. P., Morgado-Díaz, J. A., Menna-Barreto, R. F. S., Paes, M. C., & da Silva-López, R. E. (2013). Effects of a marine serine protease inhibitor on viability and morphology of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Acta Tropica*, 128(1), 27–35.
- Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., *et al.* (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2381–2395.
- Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlbor, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Rocznik, S. O., & Tamburini, P. P. (1997). Characterization of placental bikunin, a novel human serine protease inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12209–12214.
- Ding, L., Wang, X., Liu, H., San, M., Xu, Y., Li, J., *et al.* (2015). A new Kunitz-type plasmin inhibitor from scorpion venom. *Toxicon*, 106, 7–13.
- Dong, Y., Shi, D., Ying, Y., Xi, X., Chen, X., Wang, L., Zhou, M., Wu, Q., Ma, C., & Chen, T. (2019). A novel kunitzin-like trypsin inhibitor isolated from defensive skin secretion of *Odorrana versabilis*. *Biomolecules*, 9(7), 1–14.
- Drewes, C. C., Dias, R. Y. S., Hebeda, C. B., Simons, S. M., Barreto, S. A., Ferreira, J. M., Chudzinski-Tavassi, A. M., & Farsky, S. H. P. (2012). Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon*, 60(3), 333–340.
- Dreyer, F. (1990). Peptide toxins and potassium channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 115, 93–136.
- Dufton, M. J. (1985). Proteinase inhibitors and dendrotoxins. *European Journal of Biochemistry*, 153, 647–654.
- Dy, C. Y., Buczek, P., Imperial, J. S., Bulaj, G., & Horvath, M. P. (2006). Structure of konkunitzin-S1, a neurotoxin and Kunitz-fold disulfide variant from cone snail. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(9), 980–990.

- Falcón, C. R., Masih, D., Gatti, G., Sanchez, M. C., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2014). Fasciola hepatica Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–18.
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three Escherichia coli strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *8*(1), 16–22.
- Fioretti, E., Iacopino, G., Angeletti, M., Barra, D., Bossa, F., & Ascoli, F. (1985). Primary structure and antiproteolytic activity of a Kunitz-type inhibitor from bovine spleen. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(21), 11451–11455.
- Fló, M., Margenat, M., Pellizza, L., Graña, M., Durán, R., Báez, A., Salceda, E., Soto, E., Alvarez, B., & Fernández, C. (2017). Functional diversity of secreted cestode Kunitz proteins: Inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels. *PLoS Pathogens*, *13*(2).
- Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. C. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, Ixodes scapularis: Identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, *99*(10), 3602–3612.
- Fries, E., & Blom, A. M. (2000). Bikunin - Not just a plasma proteinase inhibitor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *32*(2), 125–137.
- Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, *15*(3), 403–420.
- Gao, X., Shi, L., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., & Zhou, J. (2011). Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the Rhipicephalus haemaphysaloides tick. *Journal of Insect Physiology*, *57*(2), 339–343.
- Gladkikh, I., Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Zelepuga, E., Chausova, V., Isaeva, M., Anastyuk, S., Andreev, Y., Peigneur, S., Tytgat, J., & Kozlovkaya, E. (2012). Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone Heteractis crispa. *Marine Drugs*, *10*(7), 1545–1565.
- González, S., Fló, M., Margenat, M., Durán, R., González-Sapienza, G., Graña, M., Parkinson, J., Maizels, R. M., Salinas, G., Alvarez, B., & Fernández, C. (2009). A family of diverse Kunitz inhibitors from Echinococcus granulosus potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS ONE*, *4*(9).
- Grzesiak, A., Helland, R., Smalås, A. O., Krowarsch, D., Dadlez, M., & Otlewski, J. (2000). Substitutions at the P1' position BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *Journal of Molecular Biology*, *301*(1), 205–217.
- Harvey, A. L. (2001). Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon*, *39*(1), 15–26.
- Harvey, A. L., & Robertson, B. (2004). Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *Current Medicinal Chemistry*, *11*(23), 3065–3072.

- Hawdon, J. M., Datu, B., & Crowell, M. (2003). Molecular cloning of a novel multidomain Kunitz-type proteinase inhibitor from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Journal of Parasitology*, 89(2), 402–407.
- Huber, R., Bode, W., Kukla, D., Kohl, U., & Ryan, C. A. (1975). The structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor - III. Structure of the anhydro-trypsin-inhibitor complex. *Biophysics of Structure and Mechanism*, 1(3), 189–201.
- Chen, C., Hsu, C. H., Su, N. Y., Lin, Y. C., Chiou, S. H., & Wu, S. H. (2001). Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the elapid snake *Bungarus fasciatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45079–45087.
- Ilgová, J., Jedličková, L., Dvořáková, H., Benovics, M., Mikeš, L., Janda, L., Vorel, J., Roudnický, P., Potěšil, D., Zdráhal, Z., Gelnar, M., & Kašný, M. (2017). A novel type i cystatin of parasite origin with atypical legumain-binding domain. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Islam, M. K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Alim, M. A., Huang, X., Hatta, T., & Fujisaki, K. (2009). The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS pathogens*, 5(7), e1000497.
- Jedličková, L., Dvořák, J., Hrachovinová, I., Ulrychová, L., Kašný, M., & Mikeš, L. (2019). A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement in vitro. *International Journal for Parasitology*, 49(5), 337–346.
- Jin, C., Liu, X. J., & Li, J. Le. (2019). A Kunitz proteinase inhibitor (HcKuPI) participated in antimicrobial process during pearl sac formation and induced the overgrowth of calcium carbonate in *Hyriopsis cumingii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 89, 437–447.
- Karczewski, J., Endris, R., & Connolly, T. M. (1994). Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6702–6708.
- Kassell, B., & Laskowski, M. (1965). The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas V. The disulfide linkages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20(4), 463–468.
- Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., & Chinzei, Y. (2005). Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thrombosis and haemostasis*, 93(2), 359–367.
- Katoh, E., Nishio, H., Inui, T., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Sakakibara, S., & Yamazaki, T. (2000). Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker. *Biopolymers*, 54(1), 44–57.
- Kaur, S., Devi, A., Saikia, B., & Doley, R. (2018). Expression and characterization of Flavikunin: A Kunitz-type serine protease inhibitor identified in the venom gland cDNA library of *Bungarus flaviceps*. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 33(4), e22273.
- Kawatsu, H. (1978): Studies on the anemia of fish. IX. Hypochronic microcytic anemia of crucian carp caused by infestation with a trematode, *Diplozoon nipponicum*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44,1315-1319.

- Keizer, M. P., Pouw, R. B., Kamp, A. M., Patiwaël, S., Marsman, G., Hart, M. H., Zeerleder, S., Kuijpers, T. W., & Wouters, D. (2015). TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2. *European Journal of Immunology*, *45*(2), 544–550.
- Kobayashi, H., Suzuki, M., Tanaka, Y., Kanayama, N., & Terao, T. (2003). A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 7790–7799.
- Kodama, R. T., Kuniyoshi, A. K., da Silva, C. C. F., Cajado-Carvalho, D., Duzzi, B., Mariano, D. C., Pimenta, D. C., Borges, R., da Silva, W. D., & Portaro, F. C. V. (2020). A Kunitz-type peptide from *Dendroaspis polylepsis* venom as a simultaneous inhibitor of serine and cysteine proteases. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *26*, 1–13.
- Krishnaswamy, S. (2013). The transition of prothrombin to thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *11*(1), 265–276.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *60*(11), 2427–2444.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of general physiology*, *29*(3), 149–154.
- Kunitz, M., & Northrop, J. H. (1936). Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *The Journal of general physiology*, *19*(6), 991–1007.
- Kurioka, A., Yamazaki, M., & Hirano, H. (1999). Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. *European Journal of Biochemistry*, *259*(1–2), 120–126.
- Lai, R., Takeuchi, H., Jonezy, J., Rees, H. H., & Turner, P. C. (2004). A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene*, *342*(2), 243–249.
- Laskowski Jr, M., & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry*, *49*(1), 593–626.
- Lehmann, A. (2008). Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *8*(8), 1187–1199.
- Liao, M., Zhou, J., Gong, H., Boldbaatar, D., Shirafuji, R., Battur, B., *et al.* (2009). Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of insect physiology*, *55*(2), 165–174.
- Lima, C. A., Torquato, R. J. S., Sasaki, S. D., Justo, G. Z., & Tanaka, A. S. (2010). Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) hemocytes. *Veterinary Parasitology*, *167*(2–4), 279–287.
- Liu, C. S., Wu, T. C., & Lo, T. B. (1983). Complete amino acid sequences of two protease inhibitors in the venom of *Bungarus fasciatus*. *International journal of peptide and protein research*, *21*(2), 209–215.

- Liu, X. Y., de la Fuente, J., Cote, M., Galindo, R. C., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., & Bonnet, S. I. (2014). IrSPI, a Tick Serine Protease Inhibitor Involved in Tick Feeding and *Bartonella henselae* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7).
- Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B. M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P., & Pereira, P. J. B. (2008). Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS ONE*, 3(2), 1–17.
- Mans, B. J., Louw, A. I., & Neitz, A. W. H. (2002a). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21371–21378.
- Mans, B. J., Louw, A. I., & Neitz, A. W. H. (2002b). Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7), 821–828.
- Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G., & Ribeiro, J. M. C. (2008). Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: Implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 22–41.
- Matějusková, I., Koubková, B., D'Amelio, S. and Cunningham, C. O. (2001). Genetic characterization of six species of diplozoids (Monogenea; Diplozoidae). *Parasitology* 123, 465–474.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, *et al.* (2017). CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D200–D203.
- Maria, D. A., Will, S. E. A. L., Bosch, R. V., Souza, J. G., Sciani, J. M., Goldfeder, M. B., Rondon, G. G., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2019). Preclinical evaluation of Amblyomin-X, a Kunitz-type protease inhibitor with antitumor activity. *Toxicology Reports*, 6, 51–63.
- Marks, C. B., Naderi, H., Kosen, P. A., Kuntz, I. D., & Anderson, S. (1987). Mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitor lacking cysteines 14 and 38 can fold properly. *Science*, 235(4794), 1370–1373.
- Martins, L. A., Kotál, J., Bensaoud, C., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140336.
- Masci, P. P., Lavin, M. F., & Gaffney, P. J. (2006). *U.S. Patent No. 7,070,969*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mesquita Pasqualoto, K., Balan, A., Barreto, S., Simons, S., & Chudzinski-Tavassi, A. (2014). Structural Findings and Molecular Modeling Approach of a TFPI-Like Inhibitor. *Protein & Peptide Letters*, 21(5), 452–457.
- Mikeš, L., & Man, P. (2003). Purification and characterization of a saccharide-binding protein from penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum*—a bifunctional molecule with cysteine protease activity. *Parasitology*, 127(1), 69–77.

- Milstone, A. M., Harrison, L. M., Bungiro, R. D., Kuzmič, P., & Cappello, M. (2000). A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29391–29399.
- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M. K., Alim, M. A., Hatta, T., Yamaji, K., Anisuzzaman, & Fujisaki, K. (2010). A Kunitz-type proteinase inhibitor from the midgut of the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its endogenous target serine proteinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(2), 112–115.
- Modica, M. V., Lombardo, F., Franchini, P., & Oliverio, M. (2015). The venomous cocktail of the vampire snail *Colubraria reticulata* (Mollusca, Gastropoda). *BMC Genomics*, 16(1), 1–21.
- Morais, S. B., Figueiredo, B. C., Assis, N. R. G., Homan, J., Mambelli, F. S., Bicalho, R. M., Souza, C., Martins, V. P., Pinheiro, C. S., & Oliveira, S. C. (2018). *Schistosoma mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, 9, 1762.
- Moses, E., & Hinz, H. J. (1983). Basic pancreatic trypsin inhibitor has unusual thermodynamic stability parameters. *Journal of Molecular Biology*, 170(3), 765–776.
- Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T. K., & Somamoto, T. (2011). The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1296–1308.
- Nile, C. J., Townes, C. L., Hirst, B. H., & Hall, J. (2006). The novel avian protein, AWAK, contains multiple domains with homology to protease inhibitory modules. *Molecular Immunology*, 43(4), 388–394.
- Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Žurovec, M., & Sehnal, F. (2001). Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 10(5), 437–445.
- Nishihira, T., & Urabe, M. (2020). Morphological and molecular studies of *Eudiplozoon nipponicum* (goto, 1891) and *Eudiplozoon kamegaii* sp. n. (monogenea; diplozoidae). *Folia Parasitologica*, 67.
- Noda, K., Terada, S., Mitsuyasu, N., Waki, M., Kato, T., & Izumiya, N. (1971). Synthesis of a peptide with basic pancreatic trypsin inhibitor activity. *Die Naturwissenschaften*, 58(3), 147–148.
- Paesen, G. C., Siebold, C., Dallas, M. L., Peers, C., Harlos, K., Nuttall, P. A., Nunn, M. A., Stuart, D. I., & Esnouf, R. M. (2009). An Ion-channel Modulator from the Saliva of the Brown Ear Tick has a Highly Modified Kunitz/BPTI Structure. *Journal of Molecular Biology*, 389(4), 734–747.
- Paesen, G. C., Siebold, C., Harlos, K., Peacey, M. F., Nuttall, P. A., & Stuart, D. I. (2007). A Tick Protein with a Modified Kunitz Fold Inhibits Human Trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 368(4), 1172–1186.
- Parkinson, N. M., Conyers, C., Keen, J., MacNicoll, A., Smith, I., Audsley, N., & Weaver, R. (2004). Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(6), 565–571.



- Pavon, L. F., Capper, D., Sibov, T. T., de Toledo, S. R. C., Thomale, U. W., de Souza, J. G., Cabral, F. R., Berra, C. M., Silva da Costa, M. D., *et al.* (2019). New therapeutic target for pediatric anaplastic ependymoma control: study of anti-tumor activity by a Kunitz-type molecule, Amblyomin-X. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- Petersen, L. C., Sprecher, C. A., Foster, D. C., Blumberg, H., Hamamoto, T., & Kisiel, W. (1996). Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*, 35(1), 266–272.
- Pritchard, L., & Dufton, M. J. (1999). Evolutionary trace analysis of the Kunitz/BPTI family of proteins: Functional divergence may have been based on conformational adjustment. *Journal of Molecular Biology*, 285(4), 1589–1607.
- Ranasinghe, S. L., Fischer, K., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2015a). Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–10.
- Ranasinghe, S. L., Fischer, K., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2015b). A novel coagulation inhibitor from *Schistosoma japonicum*. *Parasitology*, 1663–1672.
- Ranasinghe, S. L., Fischer, K., Zhang, W., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2015c). Cloning and Characterization of Two Potent Kunitz Type Protease Inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), 1–17.
- Ranasinghe, S., Boyle, G., Fischer, K., Potriquet, J., Mulvenna, J., & McManus, D. (2018). Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising anti-cancer therapeutic. *PloS one*, 13(8), e0200433.
- Ranasinghe, S. L., Rivera, V., Boyle, G. M., & McManus, D. P. (2019). Kunitz type protease inhibitor from the canine tapeworm as a potential therapeutic for melanoma. *Scientific Reports*, 9(1), 4–10.
- Ranasinghe, S. L., & McManus, D. P. (2013). Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology*, 39(3), 219–227.
- Ranasinghe, S. L., & McManus, D. P. (2017). Protease Inhibitors of Parasitic Flukes: Emerging Roles in Parasite Survival and Immune Defence. *Trends in Parasitology*, 33(5), 400–413.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378(3), 705–716.
- Rhoads, M. L., Fetterer, R. H., & Hill, D. E. (2000). *Trichuris suis*: a secretory serine protease inhibitor. *Experimental parasitology*, 94(1), 1–7.
- Roudnický, P., Vorel, J., Ilgová, J., Benovics, M., Norek, A., Jedličková, L., Mikeš, L., Potěšil, D., Zdráhal, Z., *et al.* (2018). Identification and partial characterization of a novel serpin from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea, Polyopisthocotylea). *Parasite*, 25.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., & Huber, R. (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *Journal of Molecular Biology*, 77(3), 417–436.

- Šácha, P., Knedlík, T., Schimer, J., Tykvart, J., Parolek, J., Navrátil, V., Dvořáková, P., Sedlák, F., Ulbrich, K., *et al.* (2016). IBodies: Modular synthetic antibody mimetics based on hydrophilic polymers decorated with functional moieties. *Angewandte Chemie - International Edition*, *55*(7), 2356–2360.
- Sasaki, S. D., Azzolini, S. S. A., Hirata, I. Y., Andreotti, R., & Tanaka, A. S. (2004). Boophilus microplus tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie*, *86*(9-10), 643–649.
- Sasaki, S. D., Cotrin, S. S., Carmona, A. K., & Tanaka, A. S. (2006). An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from Boophilus microplus trypsin inhibitor on cathepsin L. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(1), 266–272.
- Sasaki, S. D., & Tanaka, A. S. (2008). rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization. *Veterinary Parasitology*, *155*(1–2), 133–141.
- Schwarz, A., Cabezas-Cruz, A., Kopecký, J., & Valdés, J. J. (2014). Understanding the evolutionary structural variability and target specificity of tick salivary Kunitz peptides using next generation transcriptome data. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1).
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Béress, L., & Lazdunski, M. (1995). Kaliclodines and kaliseptine: Two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(42), 25121–25126.
- Shigetomi, H., Onogi, A., Kajiwara, H., Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., *et al.* (2010). Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflammation Research*, *59*(9), 679–687.
- Sintsova, O., Gladkikh, I., Chausova, V., Monastyrnaya, M., Anastyuk, S., Chernikov, O., Yurchenko, E., Aminin, D., Isaeva, M., Leychenko, E., & Kozlovskaya, E. (2018). Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new  $\beta$ -defensin  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Journal of Proteomics*, *173*, 12–21.
- Smith, D., Tikhonova, I. G., Jewhurst, H. L., Drysdale, O. C., Dvořák, J., Robinson, M. W., Cwiklinski, K., & Dalton, J. P. (2016). Unexpected activity of a novel kunitz-type inhibitor Inhibition of cysteine proteases but not serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(37), 19220–19234.
- Smith, D., Cwiklinski, K., Jewhurst, H., Tikhonova, I. G., & Dalton, J. P. (2020). An atypical and functionally diverse family of Kunitz-type cysteine/serine proteinase inhibitors secreted by the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15.
- Soares, T. S., Oliveira, F., Torquato, R. J. S., Sasaki, S. D., Araujo, M. S., Paschoalin, T., & Tanaka, A. S. (2016). BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation. *Veterinary Parasitology*, *219*, 44–52.
- Strydom, D. J. (1973). Snake venom toxins. structure-function relationships and phylogenetics. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, *44*(1), 269–281.

- Suvilesh, K. N., Yariswamy, M., Savitha, M. N., Joshi, V., Urs, A. N., Urs, A. P., et al. (2017). Purification and characterization of an anti-hemorrhagic protein from *Naja naja* (Indian cobra) venom. *Toxicon*, *140*, 83–93.
- Tanaka, A. S., Andreotti, R., Gomes, A., Torquato, R. J. S., Sampaio, M. U., & Sampaio, C. A. M. (1999). A double headed serine proteinase inhibitor - Human plasma kallikrein and elastase inhibitor - From *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology*, *45*(1–3), 171–177.
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, *9*(9).
- Toubarro, D., Avila, M. M., Montiel, R., & Simões, N. (2013). A Pathogenic Nematode Targets Recognition Proteins to Avoid Insect Defenses. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–13.
- Tsujimoto, H., Kotsyfakis, M., Francischetti, I. M. B., Eum, J. H., Strand, M. R., & Champagne, D. E. (2012). Simukunin from the salivary glands of the black fly *simulium vittatum* inhibits enzymes that regulate clotting and inflammatory responses. *PLoS ONE*, *7*(2).
- Ueda, K., Saito, A., Imamura, M., Miura, N., Atsumi, S., Tabunoki, H., Watanabe, A., Kitami, M., & Sato, R. (2005). Purification and cDNA cloning of Luxuriosin, a novel antibacterial peptide with Kunitz domain from the Longicorn Beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1722*(1), 36–42.
- Valdés, J. J., Schwarz, A., Cabeza de Vaca, I., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Guallar, V., & Kotsyfakis, M. (2013). Tryptogalinin Is a Tick Kunitz Serine Protease Inhibitor with a Unique Intrinsic Disorder. *PLoS ONE*, *8*(5).
- Van De Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., & Huber, R. (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO Journal*, *15*(22), 6011–6017.
- Von Brand, T. (1966). *Biochemistry of Parasites*. Academic Press, New York, 429 pp.
- Vorel, J., Cwiklinski, K., Roudnický, P., Ilgová, J., Jedličková, L., Dalton, J. P., Mikeš, L., Gelnar, M., & Kašný, M. (2021). Eudiplozoon nipponicum (Monogenea, Diplozoidae) and its adaptation to haematophagy as revealed by transcriptome and secretome profiling. *BMC Genomics*, *22*(1), 1–17.
- Waxman, L., Smith, D. E., Arcuri, K. E., & Vlasuk, G. P. (1990). Tick Anticoagulant Peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, *248*(4955), 593–596.
- Wei, A., Alexander, R. S., Duke, J., Ross, H., Rosenfeld, S. A., & Chang, C. H. (1998). Unexpected binding mode of tick anticoagulant peptide complexed to bovine factor Xa. *Journal of Molecular Biology*, *283*(1), 147–154.
- Wong, M. K. S., & Takei, Y. (2013). Lack of plasma kallikrein-kinin system cascade in teleosts. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–13.
- Wu, S. R., Teng, C. H., Tu, Y. T., Ko, C. J., Cheng, T. S., Lan, S. W., Lin, H. Y., Lin, H. H., Tu, H. F., et al. (2017). The Kunitz Domain of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-2 Inhibits Matriptase Activity and Invasive Ability of Human Prostate Cancer Cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–19.

- Wun, T. C., Kretzmer, K. K., Girard, T. J., Miletich, J. P., & Broze, G. J. (1988). Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13), 6001–6004.
- Wunderer, G., Machleidt, W., & Fritz, H. (1981). The Broad-Specificity Proteinase Inhibitor 5 II from the Sea Anemone *Anemone sulcata*. *Methods in Enzymology*, 80(C), 816–820.
- Yang, X., Wang, Y., Lu, Z., Zhai, L., Jiang, J., Liu, J., & Yu, H. (2009). A novel serine protease inhibitor from the venom of *Vespa bicolor* Fabricius. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(1), 116–120.
- Yang, W., Feng, J., Wang, B., Cao, Z., Li, W., Wu, Y., & Chen, Z. (2014). BF9, the first functionally characterized snake toxin peptide with kunitz-type protease and potassium channel inhibiting properties. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(2), 76–83.
- Yuan, C. H., He, Q. Y., Peng, K., Diao, J. B., Jiang, L. P., Tang, X., & Liang, S. P. (2008). Discovery of a distinct superfamily of kunitz-type toxin (KTT) from Tarantulas. *PLoS ONE*, 3(10).
- Zhang, H., Qiao, R., Gong, H., Cao, J., Zhou, Y., & Zhou, J. (2017). Identification and anticoagulant activity of a novel Kunitz-type protein HA11 from the salivary gland of the tick *Hyalomma asiaticum*. *Experimental and Applied Acarology*, 71(1), 71–85.
- Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., & Cao, Z. (2011). SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS ONE*, 6(11).
- Župunski, V., Kordiš, D., & Gubenšek, F. (2003). Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Letters*, 547(1–3), 131–136.

## 6.1 Online zdroje

- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., Heijne G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420–423. Dostupné z: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784–3788. Dostupné z: [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)
- Madden, T. L., Tatusov, R. L., & Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods in enzymology*, 266, 131–141. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R.D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*, 46, 624–632. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/merops/inhibitors/index.shtml>

## 7 PŘÍLOHA Č. 1

Použité chemikálie			
izolace RNA	TRIzol™ Reagent		Invitrogen
	chloroform		Sigma Aldrich
	isopropanol		Sigma Aldrich
PCR	EmeraldAmp® GT PCR Master Mix		TaKaRa Bio
	UltraPure™ TAE		Invitrogen
	SYBR Green		Sigma Aldrich
	GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder		Thermo Fisher Scientist
	Agaróza		Invitrogen
bakterie	S.O.C. medium		Invitrogen
	LB médium	(10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt; 10 g chlorid sodný; pH 7,0 do 1l sterilní H <sub>2</sub> O)	
	LB agar	(10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt; 10 g chlorid sodný; 15 g agar; pH 7,0 do 1l sterilní H <sub>2</sub> O)	
	Ampicilin Sodium salt (AMP)		Sigma Aldrich
purifikace proteinů	Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged; nitrilotriacetic acid		Bio-Rad
	Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)		Sigma Aldrich
	imidazol (puriss. p.a., ≥99,5 % (GC))		Sigma Aldrich
	lauryl sarcosine		Sigma Aldrich
	NaCl		Sigma Aldrich
	Tris/HCl		Sigma Aldrich
	guanidin hydrochlorid		Sigma Aldrich
	urea		Sigma Aldrich
elektroforéza blotování	Coomassie Brilliant Blue R-250		Sigma Aldrich
	redukující pufr NuPAGE®		Thermo Fisher Scientist
	Precision Plus Protein™DualXtra Standards		Bio-Rad
	10 x Tris/Glycine/SDS pufr (TGS)		Bio-Rad
	odtučněné mléko Blotting Grade Blocker		Bio-Rad
	Tween 20		Bio-Rad
	iBodies		(Šácha <i>et al.</i> , 2016)
	6x-His Tag Monoclonal Antibody (4A12E4)		Sigma Aldrich
	Streptavidin HRP		Sigma Aldrich
	králičí anti-myší protilátky IgG HRP		Thermo Fisher Scientist
měření inhibiční aktivity proteinu	α-chymotrypsin (bovinní pancreas), C6423-25UG		Sigma Aldrich
	trypsin (bovinní pancreas), T8658-1VL		Sigma Aldrich
	kallikrein (lidská plazma), K2638-50UG		Sigma Aldrich
	aktivovaný faktor X (Xa) (bovinní plazma), F9302-50UG		Sigma Aldrich
	plasmin (lidská plazma), P1867-500UG		Sigma Aldrich
	thrombin (lidská plazma), T4393		Sigma Aldrich
	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (AAPF), 4012873		Bachem

měření inhibiční aktivity proteinu	Z-Leu-Arg-AMC (LR), 4034611	Bachem
	Z-Phe-Arg-AMC (FR), 4003379	Bachem
	H-Pro-Phe-Arg-AMC (PFR), 4004023	Bachem
	Z-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC (IEGR)	Bachem
	Z-Ala-Leu-Lys-AMC (ALK)	Bachem
	Z-Val-Pro-Arg-AMC (VPR), 4003460	Bachem
iont. chrom.	MES, 4432-31-9	Sigma Aldrich

Použité Kity		
koncentrace proteinů	Quant-iT™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientist
syntéza cDNA	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
RACE-PCR	GeneRacer™ Kit	Invitrogen
extrakce vektoru	Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
elektroforéza	Opti-4CN™ Substrate Kit (SDS)	Bio Rad
vektory	pGEM®-T Vector System I	Promega
	Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep	GeneAll®

Použité pufrы			
exprese rekombinantních proteinů	lyzační pufr pH8	lauryl sarcosine	1%
		NaCl	300 mM
		Tris/HCl	20 mM
		imidazol	10 mM
	rozpouštěcí pufr pH7	Tris/HCl	20 mM
		guanidin hydrochlorid	6 M
niklová afinitní kolona s Profinity™ IMAC Resin	promývací pufr pH7	Tris/HCl	20 mM
		urea	8 M
		NaCl	0,5 M
		imidazol	40 mM
	eluční pufr pH7	Tris/HCl	20 mM
		urea	8 M
		NaCl	0,5 M
		imidazol	0,5 M
niklová afinitní kolona s HisTrap™ Fast Flow Crude	promývací pufr pH7	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
		NaCl	0,3 M
		imidazol	40 mM
	eluční pufr pH8	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
		NaCl	0,5 M
		imidazol	0,5 mM
iontově výměnná chromatografie	nanášecí pufr pH6,5	MES	20 mM
		MES	20 mM
	eluční pufr pH6,5	NaCl	1 M

test inhibice komplementu	Alseverův roztok pH7,4	glukóza	120 mM
		NaCl	7 mM
		kyselina citronová	2 mM
		dihydrát citronanu sodného	30 mM
měření inhibiční aktivity	Hepes pufr pH8	Hepes	0,1 M
		NaCl	0,3 M
		CaCl	10 mM

<b>Použité programy a online databáze</b>	
SignalP-5.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
ExpASy	<a href="https://web.expasy.org/compute_pi/">https://web.expasy.org/compute_pi/</a>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Blast®	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Magellan™	Tecan
Primer design	<a href="https://primer3.ut.ee/">https://primer3.ut.ee/</a>
BioEdit Sequence Alignment Editor verze 7.2.5	

## 8 PŘÍLOHA Č. 2

Kunitz proteiny zahrnuté do kontextu literárního úvodu. Tabulka obsahuje seznam výsledků funkčních experimentů (zelené pole = pozitivní výsledek, červené pole = negativní výsledek) a sekvenci v oblasti P3–P3'. Pokud bylo v literatuře uvedeno, je doplněna informace o typu katepsinu (G/K) a elastázy (neutrofilní, granulocytová, leukocytová, pankreatická).

reference	název	zdrojový organismus	trypsin	chymotrypsin	FXa	elastáza N/G/L/P	kallikrein	plasmin	katepsin G/K	trombin	katepsin L	iontové kanály	jiné potvrzené inhibiční schopnosti	jiné potvrzené negativní výsledky inhibičních testů	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
(Tsujiimoto <i>et al.</i> , 2012)	simukunin (SV-66)	<i>Simulium vittatum</i>							G				koagulace, FIXa, FXIa	FXIIa	V	C	R	A	L	F
(Delaria <i>et al.</i> , 1997)	Bikunin	<i>Homo sapiens</i>				G			G				FIXa, FXIa, FXIIa	FVIIa	R	C	R	A	S	M
(Ranasinghe <i>et al.</i> , 2015a)	SmKI-1	<i>Schistosoma mansoni</i>				N			G				koagulace	pankreatická elastáza	I	C	R	A	L	L
(Ranasinghe <i>et al.</i> , 2015b)	SjKI-1	<i>Schistosoma japonicum</i>				N			G				koagulace	pankreatická elastáza	K	C	R	A	S	L
(Wun <i>et al.</i> , 1988)	TFPI	<i>Homo sapiens</i>							G				FVIIa		L	C	R	A	N	E
(Rhoads <i>et al.</i> , 2000)	TsTCI	<i>Trichuris suis</i>													C	T	R	Q	C	V
(Marchler-Bauer <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-8	<i>Echinococcus granulosus</i>												koagulace	F	C	R	A	Y	F
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-4	<i>Echinococcus granulosus</i>															R			
(Islam <i>et al.</i> , 2009)	haemangin	<i>Haemaphysalis longicornis</i>											angiogeneze (b. proliferace)		R	C	R	A	S	M
(Jedličková <i>et al.</i> , 2019)	EnKT1	<i>Eudiplozoon nipponicum</i>												FVII	M	C	R	A	S	F
(Bajaj <i>et al.</i> , 2001)	TFPI-2	<i>Homo sapiens</i>													I	C	R	G	Y	I
(Sasaki <i>et al.</i> , 2004)	BmTI-2	<i>Rhipicephalus microplus</i>													L	C	R	A	N	E
(Sasaki <i>et al.</i> , 2004)	BmTI-2	<i>Rhipicephalus microplus</i>													P	C	R	G	Y	I
(Masci <i>et al.</i> , 2006)	Textilinin-1	<i>Pseudonaja t. textilis</i>													P	C	R	V	R	F
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT1.3	<i>Fasciola hepatica</i>							K						P	C	R	G	G	I
(Azzolini <i>et al.</i> , 2004)	HiTI	<i>Haematobia irritans irritans</i>				N								FXIIa, subtilisin A	P	C	R	K	S	D
(Bernard & Peansky, 1993)	T-1	<i>Ascaris suum</i>													C	T	R	E	C	K
(Ranasinghe <i>et al.</i> , 2015c)	EgKI-2	<i>Echinococcus granulosus</i>													R	G	R	A	A	F
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-5	<i>Echinococcus granulosus</i>													R	C	R	G	Y	F
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-6	<i>Echinococcus granulosus</i>													P	C	R	N	Y	S
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-7	<i>Echinococcus granulosus</i>													P	C	R	A	Y	I
(Ceraul <i>et al.</i> , 2008)	KPIs (K1)	<i>Dermacentor variabilis</i>											koagulace		I	C	R	G	M	L
(Karczewski <i>et al.</i> , 1994)	disagregin	<i>Ornithodoros moubata</i>											koagulace, adheze destiček k fibronectinu		G	C	R	E	D	D
(Schweitz <i>et al.</i> , 1995)	kalicludiny (AcKC1-3)	<i>Anemone sulcata</i>													H	P	R	A	S	H
(Paesen <i>et al.</i> , 2009)	Ra-KLP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>							G					urokináza, FXIIa, tryptáza, chymáza, granzymeB, koagulace, komplement, agregace	L	G	R	H	S	D
(Mans <i>et al.</i> , 2002a)	savignygrin	<i>Ornithodoros kalahariensis</i>											koagulace, integriny		G	C	R	G	D	E
(Kato <i>et al.</i> , 2005)	haemaphysalin	<i>Haemaphysalis longicornis</i>											kininogen, aktivátor FXII/FXIIa	FXIIa	N	C	R	N	G	N
(Bathige <i>et al.</i> , 2015)	RbKSPI	<i>Oplegnathus fasciatus</i>											bakteriostatická fce		P	C	R	G	A	F
															G	C	R	D	S	L



(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT4	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	R	G	S	F
(Liao <i>et al.</i> , 2009)	Hemalin	<i>Haemaphysalis longicornis</i>																	I	C	R	A	F	M
																			L	C	K	A	S	F
(Lai <i>et al.</i> , 2004)	Amblin	<i>Amblyomma hebraeum</i>																	P	C	K	A	L	I
(Valdés <i>et al.</i> , 2013)	tryptogalinin	<i>Ixodes scapularis</i>																	P	C	K	A	M	F
(Wan <i>et al.</i> , 2013)	AvKTI	<i>Araneus ventricosus</i>																	P	C	K	A	S	L
(Ascenzi <i>et al.</i> , 2003)	Aprotinin (BPTI)	<i>Bos taurus</i>																	P	C	K	A	R	I
(Fioretti <i>et al.</i> , 1985)	SI II (spleen inh.)	<i>Bos taurus</i>																	P	C	K	A	K	M
(Ding <i>et al.</i> , 2015)	BmKTT-2	<i>Buthus martensi</i>																	R	C	K	A	Y	F
(Yuan <i>et al.</i> , 2008)	HNTX-XI	<i>Ornithoconus sp.</i>																	R	C	K	A	S	F
(Miyoshi <i>et al.</i> , 2010)	HIMKI	<i>Haemaphysalis longicornis</i>																	P	C	K	A	A	F
(Macedo-Ribeiro <i>et al.</i> , 2008)	Boophilin	<i>Rhipicephalus microplus</i>																	I	C	K	A	L	I
(Bajaj <i>et al.</i> , 2001)	TFPI-2	<i>Homo sapiens</i>																	P	C	K	A	I	M
(Sasaki <i>et al.</i> , 2004)	BmTI-D	<i>Rhipicephalus microplus</i>																	P	C	K	G	H	I
(Paesen <i>et al.</i> , 2007)	TdPI	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>																	L	C	K	A	R	F
(Sasaki & Tanaka, 2008)	BmTI-6	<i>Rhipicephalus microplus</i>																	P	C	K	G	Y	F
																			P	C	K	A	Y	I
																			L	C	K	G	Y	F
(Kurioka <i>et al.</i> , 1999; Nirmala <i>et al.</i> , 2001)	CSTI (BmSPI-1)	<i>Bombyx mori</i>																	P	C	K	G	S	F
(Zhao <i>et al.</i> , 2011)	SdPI	<i>Lychas mucronatus</i>																	K	G	K	A	S	F
(Suvilesh <i>et al.</i> , 2017)	NNAh	<i>Naja naja</i>																	L	C	K	C	Y	D
(Strydom, 1973)	DTX-K	<i>Dendroaspis polylepis</i>																	P	C	K	R	K	I
(Antuch <i>et al.</i> , 1993; Liu <i>et al.</i> , 1983)	ShPI	<i>Stichodactyla helianthus</i>																	R	C	K	G	Y	F
(Parkinson <i>et al.</i> , 2004)	cvp2	<i>Pimpla hypochondriaca</i>																	L	C	K	A	S	I
(Jin <i>et al.</i> , 2019)	HcKuPI	<i>Hyriopsis cumingi</i>																	P	C	K	G	K	I
(Tanaka <i>et al.</i> , 1999)	BmTI-A	<i>Rhipicephalus microplus</i>																	P	C	R	I	L	R
																			P	C	L	A	Y	M
(Bozas <i>et al.</i> , 1995)	Fh-KTM	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	L	G	G	I
(Ranasinghe <i>et al.</i> , 2015c)	EgKI-1	<i>Echinococcus granulosus</i>																	P	C	L	A	Y	F
(Toubarro <i>et al.</i> , 2013)	Sc-KU-4	<i>Steinernema carpocapsae</i>																	T	C	L	A	F	N
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-3	<i>Echinococcus granulosus</i>																	M	C	L	G	Y	F
(Bernard & Peansky, 1993)	C/E-1	<i>Ascaris suum</i>																	C	P	L	M	C	R
(Bernard & Peansky, 1993)	C/E-4	<i>Ascaris suum</i>																	C	A	L	M	C	R
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT1.1	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	L	G	G	I
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT1.2	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	L	G	G	I
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT2	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	L	A	I	R
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT5	<i>Fasciola hepatica</i>																	P	C	L	A	H	I
(Ueda <i>et al.</i> , 2005)	luxuriosin	<i>Acalolepta luxuriosa</i>																	Y	C	N	E	W	Q
(Chen <i>et al.</i> , 2001; Yang <i>et al.</i> , 2014)	BF9	<i>Bungarus fasciatus</i>																	R	C	N	A	L	I
(Van De Locht <i>et al.</i> , 1996)	ornithodorin	<i>Ornithodoros moubata</i>																	D	C	N	N	D	A
																			S	C	A	E	G	T
(Sasaki <i>et al.</i> , 2004)	BmTI-3	<i>Rhipicephalus microplus</i>																	G	C	A	H	Y	F
(Gao <i>et al.</i> , 2011)	Rhipilin-1	<i>Rhipicephalus hemaphysaloides</i>																	N	C	A	G	S	R

(Bayrhuber <i>et al.</i> , 2005)	conkunitzin	<i>Conus striatus</i>																S	G	T	K	A	E		
(Alim <i>et al.</i> , 2012)	HICH1	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	█	█		█												V	C	Y	A	F	F		
(Kodama <i>et al.</i> , 2020)	dendrotoxin P00979	<i>Dendroaspis polylepis</i>	█	█		L												R	C	Y	Q	K	I		
(Lima <i>et al.</i> , 2010)	BmCI	<i>Rhipicephalus microplus</i>	█	█		█												cytotoxicita proti fibroblastům	subtilisin A	L	C	Y	A	Y	F
																		G	-	S	G	S	N		
(Batista <i>et al.</i> , 2010)	Amblyomin-X	<i>Amblyomma cajennense</i>	█		█		█	█		█								koagulace		T	C	S	N	K	T
(Smith <i>et al.</i> , 2020)	FhKT3	<i>Fasciola hepatica</i>				█	█	█		█										P	C	S	E	H	I
(Waxman <i>et al.</i> , 1990)	TAP	<i>Ornithodoros moubata</i>	█	█	█	█	█	█		█									FVIIa, urokináza	E	C	D	S	N	E
(Mans <i>et al.</i> , 2008)	monobin	<i>Argas monolakensis</i>	█	█		█		█		█								koagulace	tryptáza	S	C	D	A	S	N
																				D	C	G	G	Q	V
(Nile <i>et al.</i> , 2006)	AWAK	<i>Gallus gallus</i>																		P	C	G	G	H	E
(Milstone <i>et al.</i> , 2000)	AceKI-1	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	█	█		█				█									prothrombin time (lidská plasma)	Q	C	M	A	F	F
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-2	<i>Echinococcus granulosus</i>		█																N	C	W	Y	Y	R
(Kaur <i>et al.</i> , 2018)	flavikunin	<i>Bungarus flaviceps</i>	█	█	█	█		█		█									thromboplastin, prothrombin time	P	C	H	D	R	K
(Francischetti <i>et al.</i> , 2002)	Ixolaris	<i>Ixodes scapularis</i>		█	█	█		█		█								koagulace, FVIIa	tryptáza	T	C	E	S	Q	E
(Cao <i>et al.</i> , 2013)	Rhipilin-2	<i>Rhipicephalus hemaphysaloides</i>	█			█				█								koagulace		T	C	F	E	R	S
(Mans <i>et al.</i> , 2002b)	savignin	<i>Ornithodoros kalahariensis</i>	█		█			█		█										N	C	E	N	G	A
(Yang <i>et al.</i> , 2009)	bicolin	<i>Vespa bicolor</i>	█	█		█				█										F	C	Q	S	S	I
(Fló <i>et al.</i> , 2017)	EgKU-1	<i>Echinococcus granulosus</i>	█	█	█	█	█	█	█	█												Q			
(Decrem <i>et al.</i> , 2009)	Ir-CPI	<i>Ixodes ricinus</i>			█		█	█										koagulace, FXII, FXI, prekallikrein	FXIIa, FXIa, FIXa, FIIa, FVIIa, t-PA						
(Zhang <i>et al.</i> , 2017)	HA11	<i>Hyalomma asiaticum</i>																koagulace	hemolyze						

## 9 PŘÍLOHA Č. 3

**část 1.:** Porovnání proteinových sekvencí ověřovaných Kunitz proteinů a *EnKT1 E. nipponicum*. Hvězdička indikuje konzervované cysteiny tvořící disulfidické můstky. Šipka označuje pozici P1. Podtržená sekvence byla doplněna pomocí RACE-PCR. Šedé podbarvení zahrnuje konzervované pozice, tečka ukazuje na místa s vyšší variabilitou (50 % v rámci výběru). První část představuje signální sekvence.

```

EnKT1      MGSKLILSMALLAMAVATLWIAEVSG
EnKC1      MANNFNLF TALVILVVAVLWITEA--
00453 |m.828  MGSKLILSTALLAMVVATLWISEVTG
00481 |m.884  MVNNFNLF TALIVLVVAALWISEAFA
05461 |m.23039 MVNNFNLF TALIVLVVAALWISAAFA
56279 |m.364491 MVNNFNLF TALIVLVVAALWISKATA
          . . . . .

EnKT1      GVPKFHSGGQ-----MSGGAHKFLLGGQMSGEVPKFLLDGQTTASPLSTCQLPQMVGMCRASFPRFYFDGKKCTEFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVV
EnKC1      -----CLMMNGNVEIDSVTKAATSPLSICQLPKAVGMCLASFPRFYFDGKKCTQFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVL
00453 |m.828  GVPKLLLRGQMSGGVPKFSPSGQMSGDEPKMRLGEPMSGDEPKMRLGQPMSSGAHKFLLGDQMSGEVPKFLLDGQTTASPLSTCQLPKMVMGMC*KASFPRFYFDGKKCTEFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVL
00481 |m.884  -----SPLSTCQLPQIVGMCRASFPRFYFDGKKCTEFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVV
05461 |m.23039 -----SPLSTCQLPKMVMGMC*RASFPRFYFDGKKCTEFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVL
56279 |m.364491 -----SPLSTCQLPQIVGMCLASFPRFYFDGKKCTEFIYGGCGGNANNFQTKAECESTCPVL
          . . . . .

```

**část 2.:** Nukleotidové sekvence všech vybraných ověřovaných Kunitz proteinů v alignmentu

```

EnKC1      ATGGCCAATAATTTAATTTATTTACGGCATTGGTTATCTTGGTTGTAGCTGTGCTATGGATTACCGAGGCC-----
00453 |m.828  ATGGGCAGTAAGTTAATCTTATCTACGGCACTCCTTGCCATGGTTGTAGCTACGCTTTGGATATCCGAAGTGACTGGTGGTGTACCTAAATTCCTTCTTCGTGGTCAAATGAGTGGTGGAGTACCG
00481 |m.884  ATGGTCAATAATTTAATTTATTTACGGCATTGATTGTCTTGGTTGTAGCTGCGCTTTGGATTTCCGAGGCATTTGCA-----
05461 |m.23039  ATGGTCAATAATTTAATTTATTTACGGCATTGATTGTCTTGGTTGTAGCTGCGCTTTGGATTTCCGCGGCATTTGCA-----
56279 |m.364491  ATGGTCAATAATTTAATTTATTTACGGCATTGATTGTCTTGGTTGTAGCTGCGCTTTGGATTTCCAAGGCAACTGCA-----

EnKC1      -----
00453 |m.828  AAATTTCTTCTGGTGGTCAAATGAGTGGTGAACCCAAAATGCGCCTTGGTGAGCCAATGAGTGGTGAACCTAAAATGCGTCTTGGTCAGCCAATGAGTGGTGGAGCACATAAATTTCTT
00481 |m.884  -----
05461 |m.23039  -----
56279 |m.364491  -----

EnKC1      -----TGCTTGATGATGAACGGAAATGTAGAAATTGATTCCGTAACGAAAGCAGCCACAAGTCCACTATCAATTTGTCAACTACCCAAAAGCAGTCGGTATGTGCCTAGCTAGTTTTCTCGATAC
00453 |m.828  CTTGGAGATCAAATGAGTGGTGAAGTACCTAAATTTCTTCTTGATGGTCAAACAAGTCAAGTCCACTATCAACTTGTCAACTGCCAAAATGGTCGGTATGTGCAAAGCAGTTTTCTCGATTC
00481 |m.884  -----AGTCCACTATCAACTTGTCAACTGCCAAAATGGTCGGTATGTGCAAGCAGTTTTCTCGATTC
05461 |m.23039  -----AGTCCACTATCAACTTGTCAACTGCCAAAATGGTCGGTATGTGCAAGCAGTTTTCTCGATTC
56279 |m.364491  -----AGTCCACTATCAACTTGTCAACTGCCAAAATGGTCGGTATGTGCCTAGCTAGTTTTCTCGATTC

EnKC1      TATTTTGATGGGAAAAAATGCACACAATTCATTTATGGAGGCTGTGGGGGAAATGCAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCAGTGCTTTAA
00453 |m.828  TATTTTGATGGGAAAAAATGCACAGAATTCATTTATGGAGGCTGTGGGGGAAATGCAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCAGTGCTTTAA
00481 |m.884  TATTTTGATGGGAAAAAATGCACAGAATTCATTTATGGAGGCTGTGGGGGAAATGCAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCAGTGCTTTAA
05461 |m.23039  TATTTTGATGGGAAAAAATGCACAGAATTCATTTATGGAGGCTGTGGGGGAAATGCAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCAGTGCTTTAA
56279 |m.364491  TATTTTGATGGGAAAAAATGCACAGAATTCATTTATGGAGGCTGTGGGGGAAATGCAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCAGTGCTTTAA

```

**část 3.:** Porovnání nukleotidových sekvencí aktivních domén ověřovaných Kunitz proteinů a *EnKT1 E. nipponicum*. V sekvencích jsou vyznačena místa s příslušnou mutací oproti konzervované sekvenci. Šedě podbarvené jsou mutace, které v daném místě sekvence kódují stejnou aminokyselinu navzdory odlišnému nukleotidu (tzn. odlišnost se neprojeví v aminokyselinové sekvenci). Šipky ukazují na triplet kódující aminokyselinu v pozici P1.

						↓ ↓ ↓		
		A	TTGTCAACT	.CCC	.AA	...GTCGGTATGTGC	..AGC	.AGTTTTCCTC
<i>EnKT1</i>	C		<b>G</b>	C	ATG		AG	G
<i>EnKC1</i>	T		<b>A</b>	A	GCA		CT	T
00453  m.828828	C		<b>G</b>	A	ATG		AA	G
00481  m.884	C		<b>G</b>	C	ATT		AG	G
05461  m.23039	C		<b>G</b>	A	ATG		AG	G
56279  m.364491	C		<b>G</b>	C	ATT		CT	T

		GAT	.CTATTTT	GATGGG	AAAAA	ATGCACA	.AATTCATTT	TATGGAGG	.TG	TG
<i>EnKT1</i>		<b>T</b>						G		<b>T</b>
<i>EnKC1</i>		<b>A</b>						C		<b>T</b>
00453  m.828		<b>T</b>						G		<b>C</b>
00481  m.884		<b>T</b>						G		<b>C</b>
05461  m.23039		<b>T</b>						G		<b>C</b>
56279  m.364491		<b>T</b>						G		<b>C</b>

		GGGGAAATGCAAACAATTTTCAGACGAAAGCGGAATGCGAGTCAACCTGTCCA
<i>EnKT1</i>		
<i>EnKC1</i>		
00453  m.828		
00481  m.884		
05461  m.23039		
56279  m.364491		

## 10 PŘÍLOHA Č. 4

Výsledky měření hmotnostní spektrometrie. Z celkových výsledků byl převzato vždy prvních 10 nejzastoupenějších proteinů. SC – sequence coverage (procentuální podíl sekvence pokryté identifikovanými peptidy, uvedeno pro protein s nejlepším pokrytím z dané proteinové skupiny), Mw – molekulární hmotnost, Score – skóre představující kvalitu identifikace proteinu.

Tab. 4A Detekované proteiny z proužku odpovídajícího velikost proteinů  $\approx$  10 kDa

Parametry proteinu		Identifikační parametry		
Název proteinu	název genu	SC [%]	Mw [kDa]	Score
<b>rEnKC1</b>		<b>79,7</b>	<b>8,6448</b>	<b>112,39</b>
30S ribosomal protein S15	rpsO	75,3	10,269	41,954
Ferric uptake regulation protein	fur	52,7	16,795	127,32
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	slyD	28,1	20,853	62,818
Thioredoxin-1	trxA	50,5	11,806	72,275
50S ribosomal protein L32	rpmF	45,6	6,4463	105,27
30S ribosomal protein S16	rpsP	58,5	9,1904	34,844
DNA-binding protein HU-alpha	hupA	63,3	9,5349	20,477
50S ribosomal protein L28	rpmB	35,9	9,0064	9,9342
Major outer membrane lipoprotein Lpp	lpp	33,3	8,3234	56,544

Tab. 4B Detekované proteiny z proužku odpovídajícího velikost proteinů  $\approx$  16 kDa

Parametry proteinu		Identifikační parametry		
Název proteinu	název genu	SC [%]	Mw [kDa]	Score
Ferric uptake regulation protein	fur	66,2	16,795	119,65
<b>rEnKC1</b>		<b>70,9</b>	<b>8,6448</b>	<b>31,229</b>
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	slyD	67,3	20,853	133,27
3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	fabZ	66,2	17,033	53,43
DNA-binding protein H-NS	hns	55,5	15,539	41,445
30S ribosomal protein S6;30S	rpsF	48,1	15,187	53,995
DNA protection during starvation protein	dps	72,5	18,695	78,93
RNA-binding protein Hfq	hfq	98	11,166	67,592
50S ribosomal protein L9	rplI	73,8	15,769	37,27
Translation initiation factor IF-2	infB	1	97,349	0,76769

Tab. 4C Detekované proteiny z proužku odpovídajícího velikost proteinů ≈ 25 kDa

Parametry proteinu		Identifikační parametry		
Název proteinu	název genu	SC [%]	Mw [kDa]	Score
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	slyD	71,4	20,853	323,31
Superoxide dismutase [Fe]	sodB	80,3	21,265	220,85
Transcriptional regulator YqjI	yqjI	68,6	23,401	310,62
<b>rEnKC1</b>		<b>55,7</b>	<b>8,6448</b>	<b>93,398</b>
Ferric uptake regulation protein	fur	48	16,795	122,81
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	ahpC	78,6	20,761	189,23
Acyl carrier protein	acpP	33,3	8,6394	110,17
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	wrbA	51,5	20,845	206,77
30S ribosomal protein S13	rpsM	54,2	13,099	107,15
Superoxide dismutase [Mn]	sodA	56,3	23,097	147,51

# 11 PŘÍLOHA Č. 5

Hodnoty OD<sub>330</sub> v průběhu reakce proteázy, substrátu a rEnKC1. Koncentrace proteáz byla 5 nM (před přidáním substrátu).

Tab. 5A Měření inhibiční aktivity rEnKC1 proti chymotrypsinu

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00
0nM	882,15	1563,05	2237,75	2886,15	3483,55	4073,55	4627,3	5157,15	5675,65	6169,9	6651,25	7093,65	7552	7983,9	8404,9	8806,9
10nM	286,375	394,5	536,15	682,65	840,05	1003,9	1169,3	1340,15	1516,65	1689,25	1871,55	2041,55	2227,4	2418,75	2600,75	2783,15
20nM	239,75	331	446,25	567,15	686,4	811,65	898,55	1069,05	1196,05	1325,65	1461,05	1586,3	1723,15	1867,05	1999,75	2137,65
88nM	169,625	196,5	230,875	265,125	301,875	340,125	336,375	415,75	459,15	498,15	544,9	582,65	633,4	682,4	731,8	781,65
440nM	155,625	164,125	175	184	191,25	200,375	161,125	216,75	224,875	234,625	243,875	248,875	258,375	267,625	274,5	284,625
880nM	103,375	103,75	112,25	114,875	119,625	123,375	102,25	129,75	132,125	133,875	140,5	144,5	148	151	152,5	157,625

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:06:30	0:13:00	0:19:30	0:26:00	0:32:30	0:39:00	0:45:30	0:52:00	0:58:30	1:05:00	1:11:30	1:18:00	1:24:30	1:31:00	1:37:30
0nM	2033,25	3268,15	4182,4	4894,5	5426,5	5834,5	6135,8	6374,9	6530,8	6747,4	6914,25	7004,9	7039	7084,5	7142,4	7140,05
5nM	872,75	1849,05	2680	3410	4010,25	4487,15	4870,3	5197,05	5471,9	5697,8	5847,15	5977	6086,55	6163,15	6248,75	6278,9
20nM	638,9	1202,55	1791,15	2336,65	2835,3	3272,3	3673,8	4013,8	4309,4	4590,15	4821,3	5009,25	5196,4	5345,9	5495	5591,55
100nM	384	694,4	1014,05	1313,15	1591,15	1859,65	2094,9	2309	2500,65	2683,65	2821,5	2933,15	3097,4	3191,15	3260,15	3370,3
200nM	336,5	603,4	881,75	1162,3	1437,3	1700,75	1955,5	2202,55	2436,4	2666,15	2865,4	3039,15	3243,4	3397,05	3553,9	3693,4

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:06:30	0:13:00	0:19:30	0:26:00	0:32:30	0:39:00	0:45:30	0:52:00	0:58:30	1:05:00	1:11:30	1:18:00	1:24:30	1:31:00	1:37:30
0nM	2033,25	3268,15	4182,4	4894,5	5426,5	5834,5	6135,8	6374,9	6530,8	6747,4	6914,25	7004,9	7039	7084,5	7142,4	7140,05
5nM	1066	2051,05	2883,25	3554,15	4102,4	4522,4	4894,9	5173,55	5398,5	5599,3	5739,65	5851,65	5935,3	6015,9	6072,15	6128,15
20nM	760,4	1436,4	2086,65	2667,65	3182,65	3613,65	3964,75	4278	4532,25	4783,4	4956,5	5108,9	5249,4	5385,15	5450,5	5499,65
100nM	596,9	1112,5	1641,15	2130,8	2589,55	2995,9	3331,8	3684,65	3983,25	4243,65	4460,05	4667,75	4823,25	4977,55	5119,15	5232,9
200nM	426,9	804,15	1201,15	1599,5	1983,75	2354,75	2705,9	3049,5	3358,05	3673,65	3939,15	4203,05	4463,8	4686,9	4896,25	5092,8

Tab. 5B Měření inhibiční aktivity rEnKC1 proti Faktoru Xa

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:01:25	0:02:50	0:04:15	0:05:40	0:07:05	0:08:30	0:09:55	0:11:20	0:12:45	0:14:10	0:15:35	0:17:00	0:18:25	0:19:50	0:21:15	0:22:40	0:24:05	0:25:30	0:26:55	0:28:20	0:29:45
0nM	119,375	237,5	363,25	489,875	623,75	765,25	903,275	1047,88	1181,9	1319,65	1459,75	1596,4	1732,9	1874	2003,55	2133,75	2274,65	2406,05	2514	2654,15	2773,5	2891,9
20nM	122,75	229,5	334,375	443,025	553,375	662,4	769,775	878,25	986	1093,28	1199,9	1301,13	1405,78	1509,5	1613,78	1711,53	1814,38	1913,03	2007,75	2110,28	2202,9	2296,13
88nM	79,625	153,625	229,25	304,75	383,75	461,375	538,4	616,625	690,5	765,65	839,375	910,4	984,525	1055,63	1124,4	1197,38	1266,15	1336,05	1405,65	1468,9	1539,4	1602,75
440nM	68,75	120,375	174,938	228,375	284,813	340,313	395,45	451,625	505,125	559,575	613,75	664,95	719,263	772	822,65	875,25	926,525	978,163	1028,89	1077,9	1130,03	1176,56
880nM	56	87,125	120,625	152	185,875	219,25	252,5	286,625	319,75	353,5	388,125	419,5	454	488,375	520,9	553,125	586,9	620,275	652,125	686,9	720,65	750,375
2200nM	43,5	63,625	84	107	126,625	147,125	167,75	186,625	205,5	227,375	249	266,875	288,75	306,375	328,125	346,75	369,625	387,375	406,25	427,625	445,5	465,625
4400nM	37,125	51,875	66,625	84,25	99,375	115,875	130,875	147,125	162,875	181,375	198	211,25	228,5	245,375	261,125	278,5	297,5	311,375	325,75	343	359,25	376,75

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:01:40	0:03:20	0:05:00	0:06:40	0:08:20	0:10:00	0:11:40	0:13:20	0:15:00	0:16:40	0:18:20	0:20:00	0:21:40	0:23:20
0nM	59	134,75	211,625	286,375	362	437,625	511,25	585	655,9	725,65	794,75	865,4	928,4	994,4	1057,75
50nM	34,625	82,25	128,125	174,375	220	266,375	311,625	355,5	398,625	443,25	487,25	528	570,5	614	652,375
100nM	21,25	55	90,375	123,5	156	193,625	226,75	260,375	294,5	327,625	361,125	393,75	425,375	460,375	490,375
200nM	32,75	65,625	98	128,25	159	192,625	224,125	255,25	285,625	317,625	349	381,125	408,625	440,5	469,625

Koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:30	0:05:00	0:07:30	0:10:00	0:12:30	0:15:00	0:17:30	0:20:00	0:22:30	0:25:00	0:27:30	0:30:00	0:32:30	0:35:00	0:37:30	0:40:00	0:42:30	0:45:00	0:47:30	0:50:00	0:52:30
0nM	473,625	957,525	1453,33	1914	2360,15	2785,4	3198,4	3589,9	3966,15	4421,75	4796,65	5129,4	5438,15	5740,75	6082,4	6348,75	6620,5	6892,9	7159,75	7414	7663,25	7888,9
20nM	99,1875	662,513	1002,21	1321,33	1629,28	1930,6	2215,95	2496,9	2767,65	3096,75	3364,03	3603,78	3830,15	4057,58	4292,53	4511,45	4716,53	4927,58	5127,83	5323	5513,2	5693,58
50nM	94,0625	647,513	985,838	1255,33	1515,03	1764,48	2005,58	2231,78	2454,65	2725,63	2947,28	3142,4	3319,63	3499,83	3682,88	3866,05	4028,98	4195,28	4347,68	4498,75	4648,15	4782,43
88nM	143,656	507,506	788,369	991,988	1206,71	1420,14	1619,54	1819,34	2011,9	2248,09	2439,34	2610,28	2770,89	2937,11	3106,26	3270,1	3420,76	3577,26	3721,79	3863,38	4003,65	4140,34
440nM	193,25	367,5	509,9	728,65	898,4	1075,8	1233,5	1406,9	1569,15	1771,75	1931,4	2078,15	2222,15	2374,4	2522,65	2674,15	2821,55	2999,25	3095,9	3232	3363,15	3498,25
880nM	133,5	248,75	372,5	492,15	607,9	725,15	830,9	948,15	1061,3	1196,4	1303,4	1408,15	1507,15	1616,15	1710,15	1813,15	1912,75	2012,8	2107,25	2199,25	2295,4	2389,25
2200nM	5,125	15	16,375	66	114,25	166,125	210,375	265,125	313	371,125	416,75	461,375	510,525	557,75	602,65	645,4	687,55	732,3	780,15	824,25	865,05	911,15



**Tab. 5C Měření inhibiční aktivity rEnKC1 proti kallikreinu**

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:30	0:05:00	0:07:30	0:10:00	0:12:30	0:15:00	0:17:30	0:20:00	0:22:30	0:25:00	0:27:30	0:30:00	0:32:30	0:35:00	0:37:30	0:40:00	0:42:30	0:45:00	0:47:30
0nM	131	367,5	560,9	750,9	932,15	1110,55	1273	1425,3	1570,05	1716,15	1895,65	2026,55	2153,75	2259,9	2366,65	2471,9	2569,3	2663,55	2760,9	2846,3
5nM	186,5	441	655,9	869,05	1067,9	1260,4	1445,15	1614,75	1776,65	1938,25	2136,9	2278	2421,65	2537	2663,05	2769,65	2883,25	2991,55	3092,25	3193,4
20nM	201,125	462,25	691,55	916,8	1132,15	1347,8	1557,05	1747,65	1938,05	2138,65	2367,55	2546,5	2717,65	2879,05	3040,5	3196,55	3357,75	3500,5	3653,65	3809,15
50nM	125,125	333,125	528,15	713,65	888,65	1067,8	1237,8	1401,9	1561,5	1734,05	1924,5	2081,15	2231,3	2370,25	2516	2649,15	2798,25	2933,05	3063,4	3207,25
100nM	178,5	393,15	602,25	813,65	1016,55	1222,55	1422,65	1617,15	1810,9	2024,9	2247,75	2439,05	2617,8	2789,55	2968,9	3143,15	3321,55	3484,8	3662,65	3831,25

Použití substrátu Z-PFR

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00
0nM	94,5	369	617,55	830,05	1097,4	1312,55	1515,15	1706,65	1891,75	2065,3	2238,65	2403,15	2552,9	2697,65	2849,25	2982,05	3113,15	3242,75	3372,3	3485,5
5nM	157,375	427,8	679,4	922,15	1176,4	1395,9	1603,65	1798,3	1994,65	2176,4	2348,15	2517,4	2674,8	2827,4	2978,05	3118,5	3255	3385,05	3514,9	3640,9
50nM	138,75	392,15	628,4	854,65	1094	1304,15	1504,15	1699,15	1889,05	2072,15	2253,4	2435	2600,05	2769,5	2937,8	3094,25	3259,3	3412,65	3567,8	3724,65
100nM	135,125	379,25	608,15	834,75	1072,9	1288,15	1492,65	1698,4	1903,9	2098,75	2290,3	2483,4	2672,65	2856,05	3042,8	3220,55	3389,65	3577,65	3751,4	3913,3

Použití substrátu Z-PFR

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00
0 nM	31,5	72,25	109,25	145,875	179,125	213,625	244,25	273,25	303,375	327,25	354	378,25	408,25	433,75	458,625	475,75	499	516,875	533,5	551,25
25 nM	141,375	279,875	412,125	538,75	667,625	784,875	898,275	1014,15	1123,65	1225,275	1334,125	1436,9	1547,025	1660,25	1759,525	1839,9	1930,4	2020,5	2099,025	2176,025
50 nM	101,625	191,625	280,375	367,5	454,375	538,375	621,25	705	789,125	870,05	954,275	1027	1122,775	1216,4	1293,375	1365,75	1440,65	1515,25	1591,125	1660,175

Použití substrátu Z-PFR

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00
0 nM	131,25	279,25	416,875	554	667,8	773,55	870,55	957,15	1039,15	1112,65	1183,65	1248,3	1306,75	1362,75	1408,25	1458,8	1495,65	1540,55	1573,8	1610,65
25 nM	124,625	287,375	441,375	588	718,65	840,4	946	1044,65	1139,55	1227,65	1302,05	1377,15	1442,25	1511,75	1565,65	1624,4	1674,05	1723,15	1768,05	1809,9
50 nM	135,625	317	484	653	798,55	931,9	1051,65	1163,9	1268,4	1367,05	1459,3	1542,25	1619,05	1692,05	1761,65	1826,75	1885,5	1944,8	1994,3	2049,65

Použití substrátu Z-PFR

**Tab. 5E Měření inhibiční aktivity rEnKCl1 proti trombinu**

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:03:00	0:06:00	0:09:00	0:12:00	0:15:00	0:18:00	0:21:00	0:24:00	0:27:00	0:30:00
0nM	1007,55	1643,65	1722,25	1750,9	1765,15	1791,4	1808,4	1819,15	1825,9	1838,15	1841,9
5nM	750,275	1312,05	1516,8	1621,15	1686,9	1727,9	1766,05	1791,9	1805,9	1816,15	1834,3
20nM	617,25	1111,05	1371	1517,65	1605,5	1668,4	1712	1737,15	1754,9	1761,65	1779,55

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00
0nM	441,875	757,875	961,4	1103,8	1201	1272,5	1326,15	1367,05	1403,4	1430,9	1449,3	1471,55	1496,4	1520,65	1543,8	1554
5nM	179,375	327,5	448,875	557,25	648,25	729,5	799,75	860,5	915,875	962,4	1004,13	1046,8	1088,9	1127,8	1161	1183,4
20nM	542,125	757,125	872,75	950,375	1006,5	1052,63	1090,25	1124,15	1155	1178,15	1199,65	1229,03	1256	1292,4	1312	1327,63
50nM	455,125	766,275	931,15	1034,15	1109,53	1171,38	1221,4	1265,78	1305,38	1343	1373,15	1405,65	1439,65	1476,5	1511,75	1531,55
100nM	538,125	860,275	1034,75	1151,15	1235,28	1294,65	1344,55	1385,8	1421,15	1450,4	1471	1497,75	1521	1549,3	1565,9	1573,55

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:30	0:05:00	0:07:30	0:10:00	0:12:30	0:15:00	0:17:30	0:20:00	0:22:30	0:25:00	0:27:30	0:30:00
0nM	836	1492,65	2005,65	2384,15	2662,65	2855,3	3006,8	3112,05	3205,65	3337,8	3394,75	3426,15	3446,15
5nM	1058,88	1804,05	2306,9	2647,75	2871,9	3037,4	3167,75	3266,05	3355,8	3460,4	3519,5	3555,9	3573,9
20nM	1283,5	1914,75	2313,3	2589,4	2786,65	2938,55	3060,9	3157,5	3234,65	3345,8	3427,3	3466,55	3483,65
50nM	1116,65	1995,15	2546,65	2886,75	3087,55	3230,05	3319,65	3376,65	3415,4	3509,15	3563,4	3574,8	3582,65
100nM	1801,9	2719	3107,55	3283,65	3382,9	3449,05	3479,05	3517,75	3544,4	3612,9	3659,4	3671,05	3666,65

Tab. 5F Měření inhibiční aktivity rEnKC1 proti plasminu

koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:03:00	0:06:00	0:09:00	0:12:00	0:15:00	0:18:00	0:21:00	0:24:00	0:27:00	0:30:00	0:33:00	0:36:00	0:39:00	0:42:00
0nM	71,75	277,375	505,125	739,9	964,3	1187,3	1402,9	1608,9	1812,15	2015	2197,5	2396,5	2575,15	2752	2936,75
5nM	105,875	317	542,5	766,15	987,4	1212,9	1432,8	1632,65	1834,15	2028	2213,15	2404,8	2592,55	2762,65	2931,65
20nM	122,625	306,625	507,625	708,875	898,25	1092,4	1282,8	1468,5	1650,05	1814,4	1990,65	2164,15	2332,15	2490,5	2646,65
0nM	0:45:00	0:48:00	0:51:00	0:54:00	0:57:00	1:00:00	1:03:00	1:06:00	1:09:00	1:12:00	1:15:00	1:18:00	1:21:00	1:24:00	1:27:00
5nM	3103,55	3266,15	3430,4	3593,25	3751,65	3904,4	4059,65	4204,05	4352,15	4476,9	4621,15	4761,65	4889,65	5027,65	5173,25
20nM	3091,15	3263,15	3427,9	3581,15	3738,5	3890,8	4048,8	4189,3	4327,75	4470,15	4600,25	4731	4872,9	5001,25	5146,65
	2795,15	2954,75	3092,15	3233,3	3385	3534,15	3662,5	3775,65	3914,65	4055,05	4171,4	4303,15	4431,5	4544,9	4687,75
koncentrace Kunitz inhibitoru	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00
0nM	257	613	1006,15	1420,4	1838,65	2266,8	2732,15	3150,75	3527,65	3867,8	4161,15	4409,05	4632,5	4865,15	5103,4
5nM	316,375	700,55	1100,4	1513	1920,4	2350,15	2783,4	3173,4	3502,4	3830,9	4116,5	4364,05	4607,9	4840,05	5099,15
50nM	440,25	896	1371,4	1861	2348,9	2887,65	3416,25	3890,8	4301,9	4713,8	5076,75	5379,65	5683,75	5969	6279,15
0nM	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00	0:40:00	0:42:00	0:44:00	0:46:00	0:48:00	0:50:00	0:52:00	0:54:00	0:56:00	0:58:00
5nM	5358,5	5613,9	5887,9	6156,8	6439,55	6720,75	6979,4	7280,25	7554,4	7825,8	8074,55	8288,15	8533,65	8785,5	9025
50nM	5353	5614,5	5872,15	6155,9	6433,4	6689,3	6978,4	7261,25	7540,25	7810,05	8047	8262	8518,4	8770,3	9026,65
	6598,9	6934,9	7263,3	7621,15	7979,3	8316,9	8641,65	8993,05	9348,5	9674,5	9924,75	10235,5	10503,75	10824,75	11137,25