

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Karolína Skipalová

Antikoagulační faktory a příjem krve u monogeneí čeledi Diplozoidae

Anticoagulation factors and blood uptake by monogeneans of the family Diplozoidae

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze dne 14.8.2015

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Liboru Mikešovi, Ph.D. a celému týmu helmintologické laboratoře, jmenovitě Haně Dvořákové a Lucii Jedličkové za ochotu a pomoc při studiu. Dále děkuji své rodině za velkou podporu.

Abstrakt

Abstract

Seznam použitých zkratk

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Hematofágie	2
2.2. Hemostáza	3
2.2.1. Koagulační kaskáda.....	3
2.2.1.1. Koagulační faktory	4
2.2.1.2. Model hemokoagulace.....	5
2.2.2. Inhibice hemostázy.....	7
2.2.2.1. Mechanismus inhibice koagulační kaskády	7
2.2.2.2. Inhibitory Kunitz typu	9
2.2.2.3. Annexiny	13
2.2.2.3. Serpiny a smapiny	14
2.3. Modelová skupina organismů	18
2.3.1. Třída: Monogenea	18
2.3.2. Čeleď Diplozoidae	19
2.3.2.1. Životní (Leuciscus cephalus)19	cyklus
.....	20
2.3.2.2. Patogenita	20
2.3.2.3. Příjem krve a trávení krve	21
3. CÍLE PRÁCE.....	22
4. MATERIÁL A METODIKA.....	23
4.1. Sběr a příprava materiálu	23
4.1.1. Exkrečně – sekreční produkty (ESP).....	24
4.1.2. Homogenát	24
4.1.3. Slinné žlázy komárů a flebotomů.....	24
4.2. Měření koncentrace proteinů.....	24

4.3. Měření inhibičních aktivit	24
4.4. Bioinformatické zpracování dat získaných z transkriptomových projektů <i>E. nipponicum</i>	25
4.5. Molekulární metody	26
4.5.1. Izolace RNA	26
4.5.2. Syntéza cDNA.....	26
4.5.3. PCR a elektroforéza	26
4.5.4. Klonování do neexpresního systému.....	27
4.5.5. Transformace.....	28
4.5.6. Izolace plasmidu.....	28
4.5.7. 5' a 3' RACE PCR	28
4.5.8. Exprese proteinu v <i>Escherichia coli</i>	30
4.5.8.1. Příprava rekombinantního proteinu	30
4.5.8.2. Štěpení plasmidu	31
4.5.8.3. Ligace a transformace.....	31
4.5.8.4. Kultivace.....	31
4.5.8.5. Purifikace z inkluzních tělísek.....	32
4.5.9. Exprese proteinu v metylotrofních kvasinkách <i>Pichia pastoris</i>	32
4.5.9.1. Příprava rekombinantního proteinu	32
4.5.9.2. Transformace buněk <i>P. pastoris</i>	34
4.5.9.3. Kultivace.....	34
4.5.9.4. Lyofilizace a purifikace	34
4.5.9.5. Western blot.....	35
4.5.9.6. Hmotnostní spektrofotometrie.....	35
5. Výsledky	36
5.1 Měření inhibiční aktivity vůči koagulačním faktorům.....	36
5.1.1 Inhibiční aktivita homogenátu a ES-P proti trombinu.....	36
5.1.2 Inhibiční aktivita homogenátu a ES-P proti faktorů Xa	37
5.3. Transkriptomová analýza	38
5.3.1. Analýzy získaných sekvencí kódující proteiny Kunitz typu	42
5.3.2 Analýzy získaných sekvencí kódující serpiny.....	45
5.3.3. Analýzy získaných sekvencí kódující annexiny.....	47

5.3. 5' a 3' RACE PCR	49
5.4. Exprese proteinu v bakteriálním systému E. Coli	49
5.5. Exprese rekombinantního proteinu v <i>Pichia pastoris</i>	53
5.5.1. Inhibiční aktivita vybraných klonů s rekombinantní doménou z <i>P. pastoris</i> proti trombinu 54	
5.1.4. Inhibiční aktivita vybraných klonů s rekombinantní doménou z <i>P. pastoris</i> proti faktoru Xa.....	55 55
6. DISKUZE	56
Závěr.....	61
Použitá literatura	62

Abstrakt

K úspěšnému přijímání potravy je pro hematofágní organismy nezbytná přítomnost antihemostatických molekul mezi které patří vasodilatační, antikoagulační molekuly a apyrázy. Přestože zástupci čeledi Diplozoidae (Heteronchoinea) sají krev na žábrách ryb, žádné podobné látky blokující hostitelskou hemostázu, u nich nebyly dosud identifikovány.

Cílem této práce proto byla charakterizace molekul s potencionální antikoagulační aktivitou v homogenátu a exkrečně/sekrečních produktech (ESP) zástupců čeledi Diplozoidae. Dále pak provést bioinformatickou analýzu sekvencí získaných v transkriptomovém projektu *Eudiplozoon nipponicum* a vybrané proteiny (proteinové domény) získat v rekombinantní podobě.

Inhibiční aktivita v ESP a homogenátech měřená proti koagulačním faktorům IIa a Xa spolu s jejich fluorogenními substráty byla prokázána pouze v jedné případě z pěti měření.

Z 2 transkriptomového projektů jsme vyčlenily tři skupiny inhibitorů serinových proteáz – annexiny, serpiny, Kunitz-type protein, které by mohly patřit mezi kandidáty na inhibitory koagulační kaskády. Práci jsme zaměřili na inhibitory Kunitz typu, které se vyznačují přítomností vysoce konzervované domény odpovídající za inhibici. Samotnou Kunitz doménu z vybraného proteinu jsme se následně pokusili exprimovat v rekombinantí formě v *Escherichia coli* a *Pichia pastoris*. Výsledný protein měl sloužit k otestování jeho možné inhibiční aktivity proti koagulačním faktorům. Kunitz doménu v rekombinantí formě se nám však nepodařila exprimovat.

Klíčová slova: koagulační kaskáda, hemostáze, antikoagulant, trombin, faktor Xa, krev, hematofágie, parazit, Diplozoon, Eudiplozoon, Paradiplozoon

Abstract

For the successful food intake by organisms that feed on blood is essential presence of antithrombotic molecules such as vasodilators, anticoagulant molecules and apyrases. Although members of family Diplozoidae (Heteronchoinea) are blood-feeding parasites on the gills of the fish, these molecules, that could disrupt host hemostasis, have not yet been identified.

Thus, the aim of this study was to find molecules with potential anticoagulant activity in homogenates of whole worm bodies and excretory/secretory products of the members of family Diplozoidae. Furthermore perform bioinformatics analysis of sequences obtained from transcriptome project of *Eudiplozoon nipponicum* (Heteronchoinea: Diplozoidae) and selected proteins (protein domain) then expressed in a recombinant form.

We tested inhibitory activity in excretory-secretory products and homogenates of members family Diplozoidae towards coagulation factors IIa and Xa and their specific fluorogenic with 4 negative and 1 positive results.

From the results of two transcriptome analysis we discovered three protein families of potential anticoagulants - annexins, serpins and Kunitz-domain proteins. For further analyses we focused on the Kunitz protein family. These proteins contain one or more structurally related active domains which are able to inhibit the function of proteases. By production of selected recombinant Kunitz proteins and their domains in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* we intend to confirm their anticoagulation activity by inhibition tests towards coagulation factors. The recombinant Kunitz domain wasn't expressed.

Key words: coagulation cascade, hemostasis, anticoagulant, thrombin, factor Xa, blood, haematophagy, parasite, Diplozoon, Eudiplozoon, Paradiplazoon

Seznam použitých zkratek

AA - aminokyselina

ATB - antibiotikum

BMG - pufr pro inkubaci kvasinek *P. pastoris* („buffered minimal glycerol“)

BMM- pufr pro indukci exprese v kvasinkách *P. pastoris* („buffered minimal methanol“)

ESP – exkrečně/sekreční produkty

IPTG - *isopropyl*-beta-*D*-thiogalaktopyranosid

NCBI – Národního centrum pro biotechnologické informace (The National Center for Biotechnology Information)

OD - optická denzita

PBS-T - fosfátový pufr s 0,05 % tweenem

RE – restriční endonukleázy

RT - pokojová teplota (z ang. „room temperature“)

YPD - medium pro inkubaci kvasinek („yeast peptone dextrose medium“)

1. ÚVOD

Monogenea čeledi Diplozoidae jsou ektoparazitičtí neodermátní ploštěnci s přímým vývojem vázaným na vodní prostředí. Sají krev na žábrách především kaprovitých ryb. Ve vyšších infekčních dávkách mohou být pro své hostitele do jisté míry patogenní, a to zejména kvůli mechanickým poškozením tkání, doprovázeným sekundární infekcí. Náchylnější bývají ryby v komerčních chovech, kde je vysoká populační hustota a tím i větší pravděpodobnost přenosu monogeneí (Matějusová *et al.* 2001; Reed *et al.* 2002). Při sání krve je pro hematofágní organismy nezbytné udržet hostitelskou krev v tekutém stavu a vyvarovat se jejího srážení. Během evoluce si proto vyvinuly určité mechanismy, prostřednictvím kterých obcházejí a inhibují hostitelskou hemostázu. Především se jedná o antikoagulační či fibrinolytické faktory (inhibitory proteáz koagulační kaskády či fibrinolytické enzymy) a molekuly zabraňující agregaci krevních destiček. Světový výzkum v této oblasti je soustředěn převážně na faktory krevsajících přenašečů infekčních onemocnění (apyrázy a antikoagulační faktory komárů, klíšťat a ploštic), popřípadě krevsajících helmintů, významné buď z hlediska patogenity (např. inhibitory proteáz koagulační kaskády u *Ancylostoma* sp.) či využitelné z hlediska klinické medicíny (např. antikoagulant hirudin z pijavky *Hirudo medicinalis*). Stále však existuje celá řada skupin krevsajících parazitů (včetně třídy Monogenea), u kterých doposud antihemostatická aktivita nebyla studována. U zástupců č. Diplozoidae neexistují žádné informace, které by popisovaly antikoagulační ani jiné molekuly zapojené do procesů inhibice hostitelské hemostázy. Z tohoto důvodu bylo cílem mé diplomové práce objasnění mechanismu, kterým zástupci z čeledi Diplozoidae (Monogenea) inhibují koagulační kaskádu hostitele během sání krve.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Hematofágie

Krev nabízí nutričně bohatý a stabilní zdroj obživy, což vyvolalo v průběhu evoluce u řady organismů vznik potravní strategie – hematofágie. Dnes nalezneme krevsající druhy ve skupině ploštěnci (Platyhelminthes), hlístice (Nematoda), kroužkovci (Annelida), a nepochybně s největším zastoupením nalezneme v rámci kmene Euarthropoda, kde se jen z třídy Insecta krví živí přibližně 15 tisíc druhů (Azar *et Nel* 2012). Přizpůsobení se k hematofágnímu způsobu života vyžadovalo vznik řady regulací a mechanismů, které by eliminovaly překážky vzniklé s příjmem krve. Důležitý aspekt je schopnost trávení krve samotné a dále zneškodnění toxických (mezi)produktů vznikajících při lyzi krevních buněk a trávení hemoglobinu (Dalton *et al.* 2003). Neméně důležité je potlačení hemostázy, reakcí imunitního systému hostitele a popř. i citlivosti kůže v místě sání (Stark *et James* 1996). U řady krevsajících přenašečů parazitárních a infekčních nákaz či u krevsajících helmintů byly popsány antihemostatické a imunomodulační látky, které tyto organismy během sání krve produkují. Dobře popsané jsou např. antikoagulační faktory a apyrázy zabraňující agregaci trombocytů u komárů *Anopheles sp.*, přenašečů plasmodií způsobující malárii (Figueiredo *et al.* 2012; Biomedicine 2014), dále pak u *Aedes aegypti*, který je schopen šířit řadu virových onemocnění včetně viru žluté zimnice a dengue (Oktarianti *et al.* 2015), u ploščic čeledi Reduviidae, přenašečů *Trypanosoma cruzi*, původce Chagasovy choroby (Rocha *et al.* 2010), nebo u klíšťat, která jsou schopna během sání šířit celou řadu bakteriálních, virových i protozoárních nákaz (Chmelař *et al.* 2012). Z řad helmintů jsou známé inhibitory hemostázy např. u ankylostom působících hemoragické střevní onemocnění (Cappello *et al.* 1996; Del Valle *et al.* 2003) nebo u pijavek (Hirudinea), kde byl mimo jiné izolován jeden z nejznámějších antikoagulantů – hirudin - z pijavky lékařské *Hirudo medicinalis* (Markwardt, 1993). Ten je díky své silné antikoagulační aktivitě vyráběn v rekombinantní formě a běžně využíván v klinické medicíně (Greinacher *et Lubenow* 2001). U zástupců Ixodida, Diptera, Heteroptera a Hirudinea jsou tyto látky produkovány prostřednictvím slinných žláz (Salzet, 2001), zatímco u parazitických hlístic čeledi Ancylostomatidae žlázami esofageálními (Jiang, Desheng *et al.* 2011). U krevsajících monogeneí se předpokládá přítomnost těchto látek ve speciálních žlázách v hlavové části poblíž jícnu (Valigurová *et.al* 2011).

2.2. Hemostáza

Hemostázou rozumíme soubor obranných mechanismů, které zabraňují spontánnímu krvácení v případě poškození kontinuity cévního endotelu. Hemostatická rovnováha je výsledkem vyváženého fungování reflexní vazokonstrikce, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnujících koagulační, fibrinolytický systém a jejich inhibitory (Subhasish *et al.* 2010). Krevní destičky a koagulační kaskáda působí a vzájemně se ovlivňují na mnoha místech. Drobné cévní defekty jsou trombocyty schopny zacelit bez pomoci hemokoagulace. Aktivují se adhezí na obnažený kolagen v endotelu, kde dochází k jejich agregaci a tvorbě provizorní trombocytové zátky. Při rozsáhlejší poškození se startuje tzv. sekundární agregace spojená s degranulací krevních destiček, při níž se uvolňuje ADP a ATP, posilující rozběhnutí reakcí koagulační kaskády. Výsledkem kaskády je fibrinová síť zpevňující masu rozpadlých destiček a zachycených červených krvinek, která vytváří definitivní krevní sraženinu. Trombocyty při degranulaci zároveň uvolňují tromboxan a serotonin, látky vyvolávající vazokonstrikci a omezující tak průtok krve (Heemskerk *et al.* 2002; Ruggeri *et Mendolicchio* 2007). Agregaci a aktivaci trombocytů podporují mimo jiné i trombin a fibrinogen z koagulační kaskády (Pecka, 2003).

2.2.1. Koagulační kaskáda

V krvi cirkuluje mnoho různých plazmatických proteinů, k nimž patří i koagulační faktory a jejich inhibitory. Koagulační faktory se účastní sérii reakcí vedoucích k tvorbě trombinu a následné produkci nerozpustného fibrinu. Celý proces je kaskádou proteolytických štěpných reakcí ve specifických místech peptidových řetězců, kde se z koagulačně neaktivních faktorů stávají jejich aktivované formy (Hellmann *et Hawkins*, 1963). Enzymem je v této reakci aktivovaný koagulační faktor a substrátem je inaktivní prekurzor jiného koagulačního faktoru, stávající se aktivním až tehdy, kdy se jeho neaktivní část molekuly proteolyticky odštěpí. Toto štěpení zajistí konformační změny ve struktuře, které vystaví aktivní místo enzymu (Mann 1999, Pecka, 2006).

2.2.1.1. Koagulační faktory

Koagulační faktory představují velkou rodinu proteinů, kde má každý její člen specifickou pozici v koagulačním systému. Patří mezi plazmatické globuliny, jejichž proenzymy se přirozeně vyskytují v krevní plazmě. Výjimku tvoří tkáňový faktor (fIII), který je vázán na plazmatickou membránu. Jak už bylo zmíněno, pro svoji aktivitu vyžadují proteolytické štěpení. Jediný z faktorů, který koluje v plazmě v aktivované podobě, byť v malém množství, je faktor VII (Pecka, 2006). Jednotlivé faktory jsou tradičně označovány pomocí římských číslic, přičemž k aktivovaným formám se připisuje písmeno „a“. Většina faktorů vykazuje enzymatickou aktivitu a řadí se mezi serinové proteázy (viz tab.1).

Číslo faktoru	Název koagulačního faktoru	Číslo faktoru	Název koagulačního faktoru
I	Fibrinogen	VIII	Antihemolytický f.
II ^{1*}	Protrombin	IX ^{1*}	Christmasův f.
III	Tkáňový tromboplastin	X ^{1*}	Stuart-Prowerové f.
IV	Vápenaté ionty	XI ¹	PTA (plasma thrombin antecedent)
V	Proakcelerin	XII ¹	Hagemanův f.
VII ^{1*}	prokonvertin	XIII	Fibrin stabilizující f.

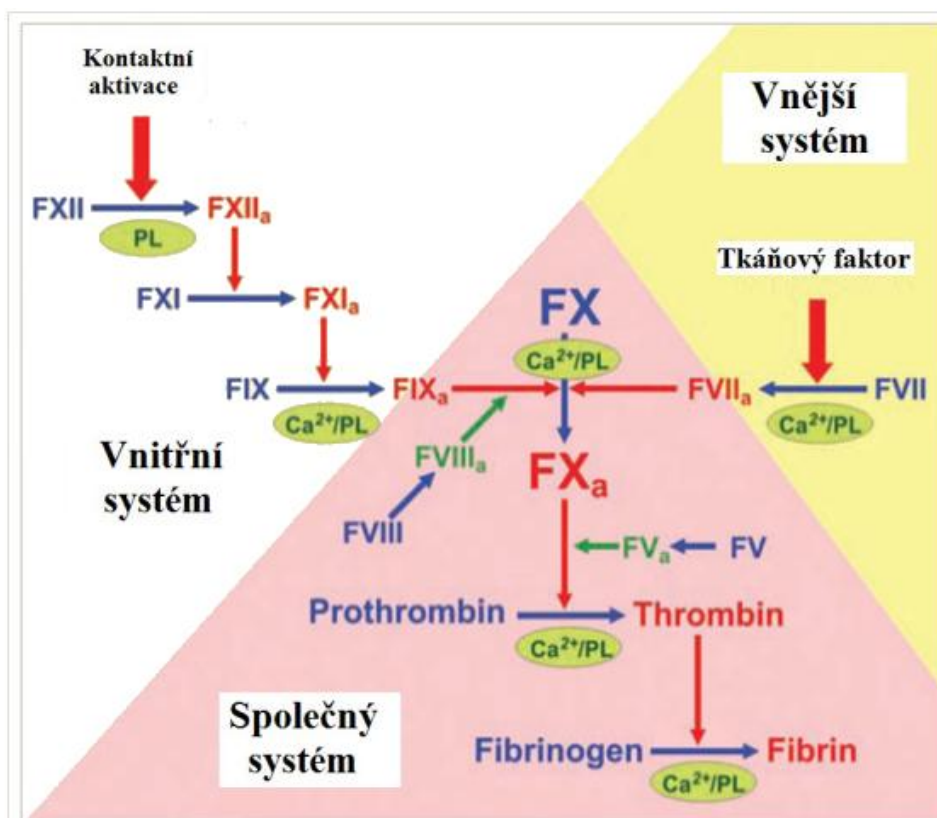
Tab.1. koagulační faktory (<http://fbt.cz>, upraveno)

¹serinová proteáza

* vitamín K dependentní proteáza

2.2.1.2. Model hemokoagulace

K aktivaci koagulační kaskády dochází dvěma způsoby – aktivací tkáňovým faktorem (iniciační fáze, dříve vnější systém) nebo kontaktem s nefyziologickými povrchy (amplifikační fáze, dříve vnitřní systém). Tyto dva mechanismy od sebe však nejsou striktně odděleny, naopak spolu v určitých bodech reagují, prolínají se a vyúsťují do společné dráhy (propagační fáze). Setkávají se v momentě aktivace faktoru X, odkud jednotnými kroky pomáhají vzniku konečného produktu kaskády – fibrinové sítě. Na procesech krevního srážení se uplatňují i destičkové fosfolipidy a Ca^{2+} ionty, které umožňují komplementaci a spolupráci koagulačních faktorů. Výsledkem je vznik enzymových komplexů na povrchu aktivovaných trombocytů, jenž podmiňuje přesné zacílení hemostázy (Heemskerk *et al.* 2002; Šlechtová, 2007).



Obr.1. Schéma koagulační kaskády, (upraveno podle <http://sbi.imim.es/web>)

Iniciační fáze

Spouštěcí impuls iniciační fáze (vnější systém) vzniká při poškození tkáně a obnažení cévního endotelu v krevním řečišti. Tkáňový faktor (TF či FIII) je vázán v subendoteliální tkáni a za běžných fyziologických podmínek se volně v cirkulující krvi nevyskytuje. Při jeho expozici se na něj specificky navazuje koagulační faktor VII, který je přítomen ve stopovém množství v krvi. Touto vazbou se oba faktory aktivují a dohromady spolu s destičkovými fosfolipidy a Ca^{2+} ionty vytváří komplex, tzv. vnější tenázu. Vnější tenáza spouští další kroky kaskády tím, že aktivuje FIX a FX. Aktivovaný faktor Xa společně s FVa, destičkovými fosfolipidy a Ca^{2+} ionty vytváří komplex protrombinázu přeměňující malé množství protrombinu na trombin, které ovšem není dostatečné pro tvorbu fibrinového koagula (Osterud *et Rapaport*, 1977; Davie *et al.* 1991; Mann *et al.* 2006). Reakce v této fázi probíhají na povrchu monocytů (Šlechtová, 2007).

Amplifikační fáze

Fáze amplifikace (vnitřní systém) se spouští kontaktem krve s negativně nabitými povrchy (např. sklo nebo umělá hmota). Trombinem vzniklým v iniciační fázi se aktivuje faktor XII, který následně aktivuje FXIa a ten FIXa. Faktor IXa se svým kofaktorem fVIIIa vytvářejí společně s fosfolipidy a Ca^{2+} ionty komplex zvaný vnitřní tenáza, který stejně jako vnější tenáza dokáže aktivovat FXa. Faktor Xa se vyskytuje na začátku společné cesty koagulace. Faktory kontaktní fáze ovlivňují řadu důležitých biologických mechanismů jako např. aktivaci fibrinolýzy (Davie *et al.* 1991; Mann *et al.* 2006).

Propagační fáze

Ve fázi propagace generuje FXa aktivovaný z předchozích reakcí, mohutnou produkci trombinu z protrombinu. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu rozpustného fibrinogenu na nerozpustné, spontánně polymerující fibrinové monomery, což je finální produkce kaskádových koagulačních reakcí. Vzniklá pevná fibrinová síť pevně pospojovaných bílkovinných řetězců je stabilizována působením FXIIIa, blokuje místo poranění a zastavuje krvácení. (Mann *et al.* 2003; Mann *et al.* 2006; Šlechtová, 2007).

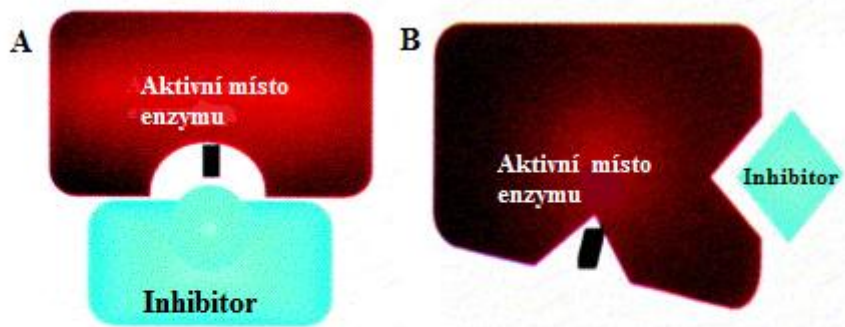
2.2.2. Inhibice hemostázy

Za účelem udržení rovnovážného stavu prokoagulačních a antikoagulačních reakcí je proces srážení krve neustále složitě regulován. Zamezuje tak vzniku nežádoucích krvácivých stavů či naopak nekontrolovatelnému krevnímu srážení. Tato regulace je zajišťována řadou v těle přirozeně se vyskytujících endogenních inhibitorů (Šlechtová, 2007). Mezi hlavní endogenní inhibitory řadíme TFPI (inhibitor tkáňového faktoru), protein C, antitrombin (AT), heparinový kofaktor II (HC II) či serpiny (Salte *et al.* 1995; Tavares-Dias *et al.* 2009; Falco *et al.* 2012; Gettins, 2002).

Krevsající organismy dokážou syntetizovat celou řadu antikoagulačních faktorů. Většina z nich spadá do významných proteinových rodin inhibitorů serinových proteáz: annexiny, serpiny nebo proteiny Kunitz typu (viz dále).

2.2.2.1. Mechanismus inhibice koagulační kaskády

Mechanismus inhibice koagulačních faktorů (a enzymů obecně) můžeme tradičně rozdělit do 3 skupin: nekompetitivní, kompetitivní a akompetitivní. Nekompetitivní inhibitory se váží na alosterická místa enzymů (obr.2). Vazba alosterického efektoru způsobí konformační změnu cílené molekuly enzymu, čímž dojde ke změně afinity enzymu k substrátu. Opačný mechanismus vykazují inhibitory kompetitivní, které soutěží o vazebné místo enzymu se substrátem (obr.2). Strukturou připomínají molekulu substrátu a enzym tak není schopen mezi nimi rozeznat rozdíl. Inhibitor se naváže do aktivního místa enzymu a zabrání tak enzymové reakci. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže na komplex enzym-substrát a zamezuje přeměnění substrátu na finální produkt (Vodrážka, 1998). Většina inhibitorů spadající do těchto tří skupin působí reverzibilně. Inhibitor se tedy na enzym neváže kovalentně, ale interaguje s enzymem jen na základě komplementarity (stejně jako substrát). Po určité době tak dojde k uvolnění inhibitoru. Naopak ireverzibilní inhibitory nevratně poškozují enzym tím, že kovalentně modifikují jeho vazebná katalytická místa nebo se na něj jinak nevratně navážou (Sharma, 2012).



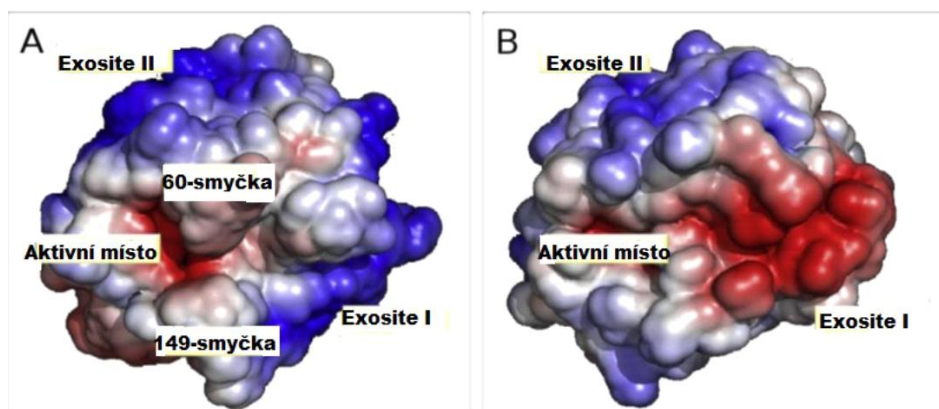
Obr.2. Mechanismus inhibice

A - kompetitivní inhibice

B - nekompetitivní inhibice

Mechanismus účinku antikoagulační aktivity se dále může členit na přímý a nepřímý. Přímé inhibitory svojí vazbou na vybrané koagulační faktory blokují jejich funkci. Takto funguje většina popsaných antikoagulantů u krevsajících parazitů. Naproti tomu nepřímé inhibitory koagulace fungují jako antagonisté vitamínu K, čímž ruší jeho funkci nebo absorpci v játrech a tím potlačují syntézu vybraných koagulačních faktorů, jejichž tvorba je na vitamínu K závislá (Malý *et al.* 2003).

Důležitou roli v inhibici hrají jednotlivé povrchové oblasti koagulačních faktorů. Kvůli své klíčové pozici v koagulační kaskádě patří mezi nejčastěji inhibované faktory trombin a FXa. Mechanismy jejich inhibice jsou proto dobře známé. Na molekule trombinu existují dvě vazebná místa pro fibrinogen - exosite I a II (obr.3.) (Stubbs *et Bode* 1995). Pokud se do těchto míst naváže inhibitor, znemožní vazbu fibrinogenu a tím i jeho indukovanou přeměnu na nerozpustný fibrin. Mimo jiné se zablokuje i trombinem indukovaná agregace krevních destiček (Crawley *et al.* 2007). Pokud se inhibitor naváže do aktivního místa trombinu, zablokuje tím jeho proteolytickou aktivitu. Na tomto principu funguje i inhibice faktoru Xa. Antikoagulant vazbou do aktivního místa (obr. 4) zabrání následné konverzi protrombinu na trombin níže v kaskádě.



Obr.3. Molekuly A) trombin B) faktor Xa

Červeně jsou vyznačeny záporně nabitě oblasti, modře oblasti nabitě kladně (upraveno podle Corral-Rodríguez *et al.* 2009).

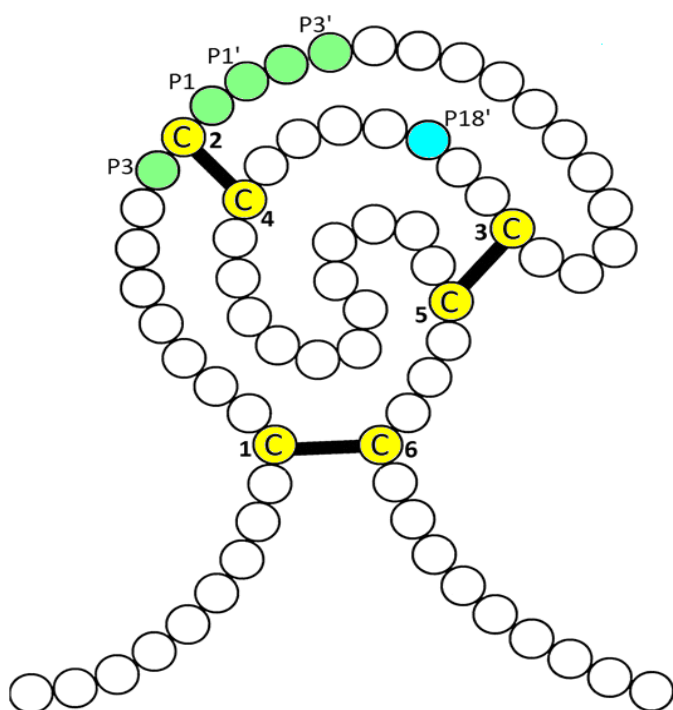
2.2.2.2. Inhibitory Kunitz typu

Mezi významné inhibitory serinových proteáz patří proteiny Kunitz typu. Jejich působení zasahuje i do dalších biologických dějů, zahrnujících např. zánětlivé mechanismy, remodelace a formování tkání, extracelulární regulace či buněčné proliferace (Shigetomi *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010). Popsány byly i v jedových žlázách vybraných bezobratlých organismů, kde se účastní blokování iontových kanálů. Společně se označují jako skupina toxinů Kunitz typu (KTT). Charakterizovány byly u mořských sasenek (Peigneur *et al.* 2011), škorpiónů (Zhao *et al.* 2011), pavouků (Yuan *et al.* 2008), hadů (Millers *et al.* 2009) a dalších. Působením KTT dochází k blokování především draslíkových kanálů, které jsou nezbytné pro regulaci některých procesů v hemostáze, např. srážení krve a fibrinolýza (Paesen *et al.* 2009).

Charakteristickou strukturou je na cysteiny bohatá aktivní Kunitz doména (obr.4.). Šest cysteinových zbytků vytváří 3 disulfidické můstky zajišťující struktuře proteinu stabilitu a přirozenou konformaci (Laskowski *et al.* 1980). Délka motivu je poměrně krátká, pohybuje se v rozmezí 50 – 60 aminokyselin, přičemž protein jich může obsahovat i více. U parazitické hlístice *Ancylostoma caninum* bylo např. popsáno až 12 Kunitz domén v rámci jednoho proteinu (Hawdon *et al.* 2003). V některých případech může docházet k asociaci s jinými doménami (Fessler *et al.* 2004).

Za samotnou inhibici je odpovědná tzv. reaktivní vazebná smyčka P3 – P3', která je součástí domény (Grzesiak *et al.* 2000). Centrální pozice smyčky P1 – P1' se váže do

aktivního místa inhibované proteázy a blokuje tak její funkci. Jedná se tedy o kompetitivní reverzibilní inhibici (Ascenzi *et al.* 2003). Každá skupina inhibitorů má v P1 popř. v P1' pozici svou konzervovanou aminokyselinu. Zástupci skupiny trypsin-like inhibitorů mají v P1 pozici typicky aminokyselinu Arg (R) nebo Lys (K) a v P'1 místě Ala (A) či Gly (G), zatímco chymotrypsin-like inhibitory se vyznačují v P1 místě přítomností Leu (L) nebo Met (M). Vysoká variabilita v místě P1' je charakteristická pro neinhibující Kunitz toxiny, což naznačuje význam pozice s Ala/Gly pro inhibici (Grzesiak *et al.* 2000a). Další vysoce konzervované místo v doméně je P18 s AA fenylalaninem (F), který stabilizuje reaktivní smyčku (Chand *et al.* 2003).



Obr.4. Predikovaná struktura Kunitz domény znázorňující šest cysteinových reziduí tvořící 3 disulfidické můstky (žlutě); aktivní místo P3 – P3' (zeleně) a vysoce konzervované místo P18' (modře) (Chand *et al.* 2003, upraveno).

Kunitz proteiny u parazitů

U parazitických helmintů fungují Kunitz proteiny především jako ochrana před hostitelskými enzymy v zažívacím traktu. První Kunitz protein izolovaný z parazitické hlístice byl inhibitor trypsinu a elastázy u *Anisakis simplex* (Morris *et al.* 1993). Dnes jsou již známy i u dalších helmintů, které uvádím v následující tabulce 2.

Organismus	Název inhibitoru	Inhibovaný enzym	Reference
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	AceKI	trypsin, chymotrypsin, elastáza	Milstone <i>et al.</i> 2000
<i>Ancylostoma caninum</i>	Ac-KPI	trypsin, chymotrypsin (Cappello <i>et al.</i> 1996)	<i>et al.</i> 2003
<i>Fasciola hepatica</i>	Fh-Ktm	trypsin, chymotrypsin, elastáza	Ascenzi <i>et al.</i> 2003
<i>Haemonchus contortus</i>	-	trypsin	Kooyman <i>et al.</i> 2009
<i>Echinococcus granulosus</i>	EgKU-8	trypsin, chymotrypsin	Gonzalez <i>et al.</i> 2009

Tab.2. Přehled popsáných Kunitz proteinů, účastnících se inhibice trávicích enzymů u parazitických helmintů (Ranasinghe *et al.* 2013, upraveno)

Proteiny Kunitz typu se také hojně vyskytují v extracelulární matrix hlístic, kde jsou zapojeny do procesů remodelace a budování kutikuly. Konkrétně inhibicí syntézy kolagenu, který tvoří převažující složku matrix (Page *et al.* 2006). Charakteristickým znakem pro tyto proteiny je přítomnost více Kunitz domén nebo asociace s jinými motivy. Velké zastoupení mají v extracelulární matrix proteiny zvané papiliny. Kunitz motiv je u nich v asociaci s thrombospondin-like proteiny, Ig-like proteiny a PLAC (protease and lacunin) doménou, pro kterou je stejně jako pro Kunitz doménu typická přítomnost šesti cysteinových zbytků (Kramerová *et al.* 2000).

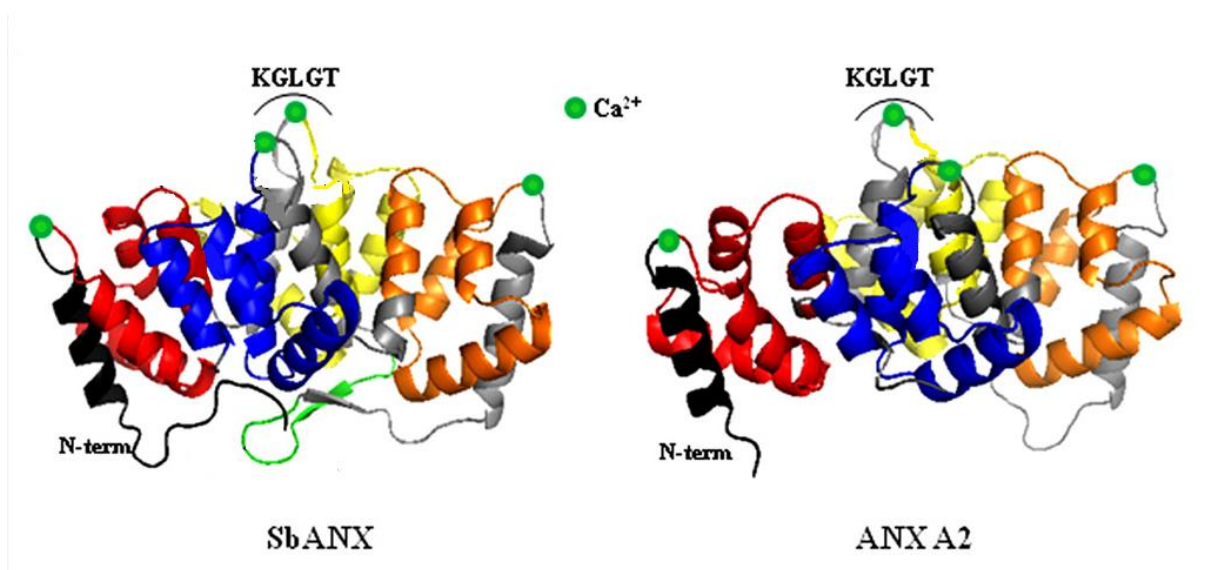
U krevsajících členovců mají Kunitz proteiny inhibiční aktivitu tradičně namířenou vůči koagulačním faktorům (Ranasinghe *et* McManus 2013). Většina antikoagulantů byla popsána z klíšťat a klíšťáků (tab.3.), kde působí především proti trombinu a faktoru Xa (Stark *et* James 1996). U krevsajících dvoukřídlých byly popsány např. u muchničky *Simulium vittatum*, kde působí proti fXa, elastáze a katepsinu G (Tsujimoto *et al.* 2012).

Organismus	Název inhibitoru	Inhibovaný enzym	Reference
<i>Ixodes scapularis</i>	ixolaris	faktor Xa, VII/TF	Francischetti <i>et al.</i> 2002
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	faktor Xa	Waxman <i>et al.</i> 1990
<i>Rhipicephalus heamaphysaloides</i>	rhipilin	trombin	Gao <i>et al.</i> 2011
<i>Orithodoros moubata</i>	ornithodorin	trombin	van de Locht <i>et al.</i> 1996
<i>Amblyomma hebraeum</i>	amblin	trombin	Lai <i>et al.</i> 2003
<i>Boophilus microplus</i>	boophilin	trombin	Macedo-Ribeiro <i>et al.</i> 2008
<i>Heamaphysalis longicornis</i>	hemalin	trombin	Liao <i>et al.</i> 2009
<i>Argas monolakensis</i>	monobin	trombin	Mans <i>et al.</i> 2007
<i>Simulium vittatum</i>	simukunin	Faktor Xa, elastáza katepsin G	Tsujimoto <i>et al.</i> 2012
<i>Tabanus yao</i>	tabkunin	trombin	Xu <i>et al.</i> 2008

Tab.3. Přehled některých inhibitorů Kunitz typu u Ixodida a Diptera (Ranasinghe *et* McManus 2013, upraveno).

2.2.2.3. Annexiny

Annexiny tvoří velkou evolučně konzervovanou proteinovou rodinu vázající Ca^{2+} ionty a fosfolipidy. Jsou široce exprimovány napříč všemi eukaryotickými organismy, kde jsou zapojeny do celé řady buněčných procesů zahrnujících endocytózu, exocytózu, imunomodulaci, antikoagulaci, membránový transport, regulační mechanismy při transportu iontů (Ca^{2+}) či signalizační dráhy (Gerke *et Moss*, 2002; Moss *et Morgan*, 2003). Ačkoliv nebyla u annexinů popsána signální sekvence pro sekreci, byly popsány i extracelulárně. Konkrétně v krevním řečišti na povrchu membrány endoteliálních buněk a krevních destiček, což naznačuje zapojení do antihemostatických a protizánětlivých mechanismů. Strukturálně je pro annexiny charakteristická doména opakující se každých 70-80 AA. Skládá se ze 3 homologních AA zbytků (**K-G-X-GT**) a obsahujících 5 alfa helixů (obr.5.) (Gerke *et Moss* 2002).



Obr.5. Struktura annexinů – konzervovaná doména K-G-X-G (de la Torre-Escudero *et al.* 2012, upraveno).

Annexiny u parazitů

Jak už bylo zmíněno, annexiny mohou zasahovat do inhibičních dějů spojených s koagulačním systémem. Například v lidském těle jsou známy antikoagulační annexiny (A2 a A5), které se kompetitivně vážají na povrchové fosfolipidy krevních destiček a endoteliálních buněk, čímž narušují funkci aktivovaných koagulačních komplexů (Gerke *et Moss*, 2002). U parazitických helmintů byly popsány annexiny zapojené do antihemostatických dějů u *Taenia solium* - Tso ANXB2, Tso ANXB1 (Wang *et al.* 2006) a *Schistosoma bovis* – SbANX (de la Torre-Escudero *et al.* 2012). Studie, které se zabývaly interakcí schistosomy *S. bovis* s hemostázou hostitele identifikovaly annexiny s antikoagulační aktivitou v tegumentu a exkrečně/sekrečních produktech. Společně s ostatními proteiny tegumentu, u kterých byla také prokázána fibrinolytická aktivita (např. enoláza), mohou chránit dospělce před vznikem krevní sraženiny, což by bylo pro červa letální (Ramajo-Hernández *et al.* 2007; De la Torre-Escudero *et al.* 2012). S přihlédnutím ke skutečnosti, že se annexiny účastní širokého spektra buněčných mechanismů, není vyloučené, že tento annexin vykonává i další funkce jako např. imunomodulační aktivitu, podobně jako u *T. solium* (Gao *et al.* 2007; Yan *et al.* 2008). Několik annexinů bylo identifikováno také na povrchu tegumentu dospělců a schistosomul *Schistosoma mansoni* (Braschi *et Wilson*, 2006; Castro-Borges *et al.* 2011) a *Schistosoma japonicum* (Mulvenna *et al.* 2010a). Antikoagulační aktivita u nich však dosud nebyla potvrzena.

U monogeneí byl popsán jediný annexin z *Microcotyle sebastis*. Jedná se o hematofágního zástupce podtřídy Polyopisthocotylea parazitujícího u mořských ryb. Pomocí imunohistochemických metod byl lokalizován v oblasti ovárií, farynxu a v zažívacím traktu. Fylogenetické analýzy prokázaly příbuzenské vztahy s annexiny *S. japonicum*, *S. mansoni* a *T. solium* (Choi *et al.* 2009).

2.2.2.3. Serpiny a smapiny

Serpiny jsou další široce rozšířenou skupinou inhibitorů serinových proteáz (**Serine Protease Inhibitor**), zapojujících se do nejrůznějších biologických procesů. U obratlovců je to např. koagulační kaskáda, aktivace komplementu, fibrinolýza, angiogeneze či při zánětových

mechanismech (*Stein et al.* 1995).

Struktura serpinů se vyznačuje přítomností konzervované domény skládající se ze tří β listů, 8-9 α -helixů a tzv. reaktivní centrální smyčky (RCL), která se podílí na kompetitivním inhibičním mechanismu (obr.6.) (Gettins, 2002). Reaktivní smyčka umí rozpoznat aktivní místo cílové proteázy, do kterého se následně navazuje. Vzniklá vazba mající za následek konformační změnu ve struktuře serpinu způsobí rozrušení aktivního místa proteázy, což zajistí celkovou inaktivaci enzymu hostitele (Irving *et al.* 2000; Molehin *et al.* 2012). V tomto případě se jedná se o ireverzibilní inhibici, kdy se RCL serpinů kovalentně váže na proteázu. Popsány byly však i výjimky, kde se jedná i o reverzibilní nekovalentní inhibiční mechanismus (van Gent *et al.* 2003).

Ačkoliv jsou serpiny přednostně inhibitory serinových proteáz, některé dokáží působit i proti cysteinovým peptidázám (Irving *et al.* 2000). Některé další serpin-like proteiny dokonce nevykazují žádnou inhibiční aktivitou a mohou fungovat jako transportní proteiny (Hammond *et al.* 1987) nebo jako chaperony (Clarke *et al.* 1991).



Obr.6. Doména serpinu s reaktivní smyčkou (Gettins 2002, upraveno)

Antikoagulační serpiny

Serpiny vykazující antikoagulační aktivitu bychom našli např. ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*, u něhož byl popsán inhibitor IRIS působící proti trombinu a FXa (Prevot *et al.* 2006). V rámci řádu Diptera jsou popsány dva serpiny vykazující reverzibilní inhibici. Ze slinných žláz komára *Aedes albopictus* je to alboserin inhibující trombin a FXa (Calvo *et al.* 2011), u *Aedes aegypti* byla potvrzena antikoagulační aktivita pouze proti FXa (Stark *et James* 1998). U hlístice *Haemonchus contortus* (č. Trichostrongylidae) byla identifikována nespecifická antikoagulační aktivita u serpinu H, který se primárně účastní inhibice trypsinu. Inkubace H-serpinu s čerstvou králičí krví výrazně prodlužovala koagulační čas (Yi *et al.* 2010).

Smapiny

Relativně nedávno se osamostatnila skupina malých inhibitorů serinových proteáz odvozená od serpinů - smapiny (**S**mall **S**erine **P**rotease **I**nhibitors). Jejich délka nepřesahuje 100 aminokyselin (klasické serpiny mají 350-300A). Typickým rysem je přítomnost 10 cysteinů tvořících 5 disulfidických můstků (van Gent *et al.* 2003; Dzik, 2006).

Dosud byly smapiny identifikovány z parazitických hlístic či pijavek (viz tab.4-6.), kde se zapojují do nejrůznějších obranných mechanismů. Inhibují například působení trávicích enzymů hostitele ve střevním prostředí nebo koagulačních faktorů během příjmu krve (Zang *et Maizels* 2001).

Organismus	Název	Inhibovaný faktor	Lokalizace	Reference
A.caninum	NAP5	VIIa, Xa	esofágus	Duggan <i>et al.</i> 1999
	NAP6			
	NAPc2			
A.caninum	AcApc5	Xa	Amphidialní/Cephalické	Stassens <i>et al.</i> 1996

	AcApc6		žlázy	
	ApApc2	VIIa/TF	ezofágus	Stassens <i>et al.</i> 1996
	AcAp12	Xa	ezofágus	Jiang <i>et al.</i> 2011
<i>A.ceylanicum</i>	AceAP-1	VII, Xa	neidentif.	Mieszczanek <i>et al.</i> 2003
<i>A.duodenale</i>	AduNAP3	Xa, XIa	neidentif.	Gan <i>et al.</i> 2009

Tab. 4. Smapiny s inhibiční aktivitou proti koagulačním faktorům u ankylostom. (Molehin *et al.* 2011, upraveno)

Organismus	název	Inhibovaný faktor	reference
<i>Hirudo medicinalis</i>	hirudin	trombin	Talbot, 1989
<i>Hirudinaria manillensis</i>	bufrudin	trombin	Electricwala <i>et al.</i> 1993
<i>Haemadipsa sylvestris</i>	haemadin	trombin	Corral-Rodriguez <i>et al.</i> 2010
<i>Haementeria officinalis</i>	antistasin	Xa	Nutt <i>et.al.</i> 1988
<i>Haementeria ghilinaii</i>	ghilanten	Xa	Blankeship, 1990

Tab. 5. Antikoagulační smapiny u Hirudinea (Salzet *et al.* 1999, upraveno).

Organismus	Název	Inhibovaný proteáza	reference
B.malayi	Bm-SPN-2	elastáza, katepsin G	Stanley et Stein.2003
T. spiralis	Ts11-1	trypsin	Nagano <i>et al.</i> 2001
S. mansoni	Smpi56	neutrofily a elastáza	Ghendler <i>et al.</i> 1994
C. sinensis	CsSERPIN	chymotrypsin	Kang <i>et al.</i> 2010
E. multilocularis	SerpinEmu	Trypsin a elastáza	Merckelbach et Ruppel 2007

Tab. 6. Smapiny účastníci se inhibice trávicích enzymu u helmintů (Salzet *et al.* 1999, upraveno).

2.3. Modelová skupina organismů

2.3.1. Třída: Monogenea

Monogenea patří mezi ploštěnce (Platyhelminthes, Neodermata). Na rozdíl od většiny ostatních parazitických neodermátních ploštěnců mají životní cyklus přímý, typicky bez meziphostitele. Až na výjimky jsou to oviparní hermafrodité vykazující vysokou hostitelskou a často i orgánovou specifitu (Buchmann *et* Bresciani 2006), což je zajímavé mimo jiné z hlediska koevolučních studií mezi parazitem a hostitelem. Většina monogeneí žije ektoparaziticky na sladkovodních a mořských rybách, kde se vyskytují na kůži, ploutvích a žábrách. Existují však i endoparazitičtí zástupci, které bychom našli v ústní či nosní dutině, močovém měchýři, žaludku, v oku nebo v srdeční dutině. Mimo ryb parazitují i u obojživelníků, paryb, plazů, savců či některých bezobratlých (Smyth *et* Halton, 1983).

Na základě potravní strategie můžeme tř. Monogenea rozdělit na podtřidu Polyonchoinea, parazity živící se epitelovými buňkami nebo mukusem a podtřidu Heteronchoinea, zahrnující krevsající parazity (Boeger *et* Kritsky 2001, Buchmann *et* Bresciani, 2006).

2.3.2. Čeleď Diplozoidae

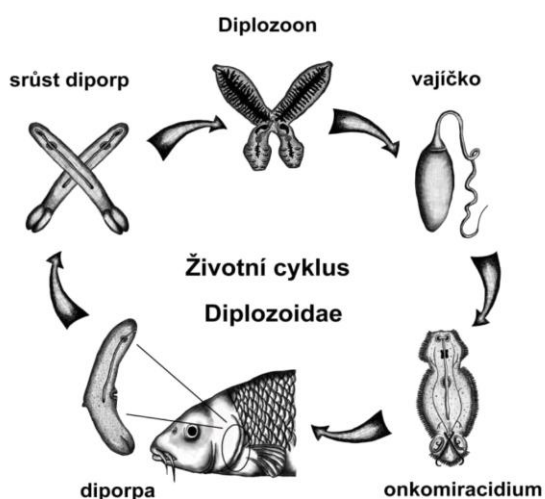
Zájmem této práce jsou zástupci čeledi Diplozoidae (Heteronchoinea), která zahrnuje hematofágní druhy vyskytující se hlavně na žábřácích kaprovitých ryb. Druhy, které byly použity v této práci, jsou zaznamenány v tab.7.

Rod	Druh	Hostitelký organismus
Eudiplozoon	<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	<i>Kapr obecný</i> (<i>Cyprinus carpio</i>)
Paradiplozoon	<i>Paradiplozoon bliccae</i>	<i>Cejnek malý</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)
	<i>Paradiplozoon homoion</i>	<i>Střevle potoční</i> (<i>Phoxinus phoxinus</i>) <i>Plotice obecná</i> (<i>Rutilus rutilus</i>) <i>Jelec tloušť</i> (<i>Leuciscus cephalus</i>)

Tab. 7. – Druhy č. Diplozoidae využité k této práci a jejich hostitelé (Matějusová *et al.* 2001, upraveno)

2.3.2.1. Životní cyklus

Životní cyklus (obr.8.) je přímý, bez přítomnosti mezipřehostitele, stejně jako u ostatních monogeneí. Z vajíčka, které je opatřeno dlouhými filamenti, se ve vodě líhne pohyblivé larvální stádium – onkomiracidium. Toto stádium je vybaveno mimo jiné přichycovacím orgánem (opisthaptorem) a řasinkami umožňujícími aktivní pohyb ve vodě. Poté, co nalezne vhodného hostitele a přichytí se k němu, vyvíjí se do stádia diporpy. Následuje kritický moment, kdy jedna diporpa musí nalézt diporpu druhou, se kterou srůstá a společně se vyvíjí do stádiaschopného reprodukce a zraje v dospělce. Dochází k fúzi nervové, svalové, trávicí i pohlavní soustavy, přičemž samotná diporpa není schopna dosáhnout pohlavní dospělosti. (Matějusková *et al.* 2001; Zurawski *et al.* 2001; Roberts *et al.* 2005).



Obr.7. Životní cyklus zástupců č. Diplozoidae (dle Mgr. L. Jedličková)

2.3.2.2. Patogenita

Z hlediska patogenity nepatří č. Diplozoidae k ekonomicky významným parazitům. Zcela běžně se vyskytují u chovných i volně žijících ryb, ale obvykle ne v počtu, který by byl pro ryby nebezpečný. Riziko infekce je zvýšené u ryb pobývajících společně v nádržích ve stísněných podmínkách s vysokým infekčním tlakem. Přítomnost vyššího počtu těchto

parazitů na žábrách nebo kůži může vést k mechanickému poškození, často doprovázeném sekundárními infekcemi, sníženou fyzickou kondicí a v krajním případě i s chudokrevností nebo zvýšenou mortalitou ryb (Reed *et kol.* 2009; Roberts *et Janovy* 2005; Buchmann *et Bresciani* 2006).

2.3.2.3. Příjem krve a trávení krve

Trávicí soustava je u monogeneí dobře vyvinuta. Začíná ventrálními ústy zajišťujícími primární kontakt s hostitelskou tkání, na ně navazuje ústní dutina s párem ústních (bukálních) přísavek, svalnatý farynx, ezofágus a rozvětvená párová slepá střeva. Ústní přísavky jsou opatřeny svorkami a háčky, které pomáhají k přichycení na žaberní lamely. Zároveň byla v okolí úst pozorována ciliatura zastávající s největší pravděpodobností senzoryckou funkci (Hodová *et al.* 2010).

Příjem krve je zprostředkován přes párové ústní přísavky, které přilnou k povrchu žaberní lamely a peristaltickými kontrakcemi svalů farynxu vyvolávají podtlak, takže lamelu protrhávají. Uvolněná krev postupuje dále do střeva (Smyth *et Halton* 1983; Hodová *et al.* 2010). Okolo ezofágu existují přídatné žlázy, u kterých se předpokládá, že vylučují různé antihemostatické molekuly vč. antikoagulačních faktorů a látek podílejících se na trávení krve v lumenu střeva. K trávení krve dochází pravděpodobně intracelulárně v buňkách gastrodermis slepých střev v lyzozomálním cyklu. U skupiny Polyopisthocotylea se gastrodermis skládá ze separovaných trávicích buněk a syncytiální tkáň vystýlající povrch celého střeva. Syncytium tvoří rozsáhlou kompaktní plochu, která je přerušena pouze v místě vyústění apikálních částí trávicích buněk. Pod gastrodermis se nachází bazální lamina a vrstva svalových vláken, která poskytuje mechanickou oporu (Smyth *et Halton*, 1983; Halton, 1997). V momentě, kdy se krev dostane do lumenu střeva, je již lyzovaná. Mechanismus hemolýzy není znám. Hemoglobin z červených krvinek je endocytován trávicími buňkami a degradován na globin a hem. Hem je oxidován na nerozpustný ferriporfyrin hematin, který je hromáčen v buňce, následně vyloučen z buňky do lumenu střeva a regurgitací odstraněn z těla (Halton, 1997). Jak už bylo zmíněno výše, globiny jsou tráveny intracelulárně a to v lyzozomálním cyklu podobně jako u krevsajících roztočů, např. klíš'at (Sojka *et al.*, 2013). Od ostatních krevsajících helmintů, jako jsou např. schistosomy, fascioly či ancylostomy, které tráví hostitelské proteiny extracelulárně v lumenu střeva, se krevsající monogenea značně odlišují (Halton 1997; Dalton *et al.* 2003; Knox, 2007). O biochemii trávení krevních proteinů u

krevsajících monogeneí je velmi málo informací v porovnání s ostatními krevsajícími parazity. Předpokládá se však, že procesu trávení se účastní cysteinové peptidázy a to zejména katepsin L (Jedličková *et al.* 2015, nepublikováno).

3. CÍLE PRÁCE

- biochemická detekce inhibitorů koagulačních faktorů v homogenátech a exkrečně/sekrečních produktech zástupců č. Diplozoidae
- bioinformatická analýza a anotace sekvencí potencionálních antikoagulantů získaných z transkriptomů dospělců *E. nipponicum*
- tvorba vybraných rekombinantních Kunitz proteinů *E. nipponicum* a jejich purifikace
funkční charakterizace rekombinantních Kunitz proteinů

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Sběr a příprava materiálu

Materiál na pokusy byl získán sběrem dospělých červů tří druhů z čeledi Diplozoidae - *Eudiplozoon nipponicum* (obr.8., hostitel *Cyprinus carpio*), *Paradiplozoon bliccae* (obr.9.; hostitel *Blicca bjoerkna*) (Matějusová *et al.* 2001; Pečínková *et al.* 2007) ze žaber odchycených ryb. Sběr se uskutečnil ve spolupráci se Zpracovnou ryb - Rybářství Třeboň Hld. a.s., Ústavem botaniky a zoologie PřF MU v Brně a Fakultou rybářství a ochrany vod JČU v ČB. Samotná pitva probíhala pod binokulární lupou, kdy byli za pomoci preparačních jehel jednotliví jedinci odejmuti, očištěni od zbylé tkáně žaberních oblouků a skladováni podle potřeby experimentů.



Obr. 8. *Eudiplozoon nipponicum*(scan)
(RNDr. J. Bulantová)



Obr. 9. *Paradiplozoon bliccae* (scan)
(RNDr. J. Bulantová)

4.1.1. Exkrece – sekreční produkty (ESP)

Dospělí živí červi byli inkubováni v 1 ml 10 mM fosfátovém pufru pH 7.4 po 10 kusech cca 4 hodiny. Následně byli odebráni, supernatant zkoncentrován ultrafiltrací (Amicon Ultra 0,5 ml; 3 kDa; Millipore; 14000 x g; 4 °C; 20 min) a skladován v -20 °C popř. v -80 °C (pro dlouhodobé uchování vzorku).

4.1.2. Homogenát

Celí červi byli mechanicky homogenizováni ve zkumavce s 0,5 ml ddH₂O, následně pak sonikováni na ledu (Vibra cell 72405, Bioblock scientific; 30 W; 6 x 10 s), homogenát byl centrifugován (16000 x g; 4 °C; 20 min) a skladován v -20 °C popř. v -80 °C.

4.1.3. Slinné žlázy komárů a flebotomů

Slinné žlázy z *Aedes aegypti* a *Phlebotomus papatasi* byly vypitvány z 5 dní starých nenasátých samic. Pitvy probíhaly ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem a Laboratoří biologie hmyzích vektorů (Katedra parazitologie, PřF UK). Výsledný vzorek v poměru 1 pár žláz : 1 µl 20 mM Tris-HCL pufru pH 7,2 se 150 mM NaCl byl mechanicky homogenizován a uchován v -20 °C.

4.2. Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena kitem Quant-IT™ Protein Assay Kit (Q33210, Invitrogen) dle manuálu na fluorometru Infinite M200 (TECAN) v černé mikrotitrační destičce (Nunc).

4.3. Měření inhibičních aktivit

Detekce inhibiční aktivity potenciálních antikoagulačních faktorů zástupců čeledi Diplozoidae byla provedena v ESP a homogenátech, s využitím vybraných bovinních faktorů koagulační kaskády – trombinu (faktor IIa) a faktoru Xa (Sigma), spolu s jejich specifickými fluorogenními substráty VPR (Val-Pro-Arg-AMC), resp. IEGR (Ile-Glu-Gly-Arg-AMC).

Vzorky ESP, homogenátů nebo rekombinantního Kunitz proteinu v médiu po expresi (viz dále) o různém množství (tab.9). byly inkubovány s reakčním pufrům (100 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) a koagulačním faktorem (finální koncentrace 100 µg/ml) 15 minut před začátkem měření v 96 jamkové mikrotitrační destičce (Nunc) při pokojové teplotě. Následně byl ke vzorku přidán fluorogenní substrát (finální koncentrace 10 mM) a reakce byla měřena na fluorometru (Infinite M200, TECAN) při excitační vlnové délce 355 nm, emisní 460 nm, po 2 minutách ve 30 cyklech. Jako pozitivní kontrola byly využity homogenáty slinných žláz z *Aedes aegypti* a *Phlebotomus papatasi* obsahující antikoagulační faktory. U *A. aegypti* byla popsána inhibiční aktivita vůči trombinu (Watanabe *et al.* 2010), zatímco u *P. papatasi* pouze proti faktoru Xa (Collin *et al.* 2012).

vzorek / organismus	průměrná koncentrace vzorku (µg/ µl)	použité množství vzorku (µg/)
ESP / <i>E. nipponicum</i>	0,6	2,4 – 4
homogenát / <i>E.nipponicum</i>	5,65	7,2 – 140
homogenit / <i>P. bliccea</i>	2,9	7,2 – 22
slinné žlázy / <i>A.aegypti</i> P. papatasi	0,4	1,8 – 10,8

Tab.9. Přehled použitých vzorků a jejich množství na měření inhibiční aktivity.

4.4. Bioinformatické zpracování dat získaných z transkriptomových projektů *E. nipponicum*

Sekvenční data v podobě contigů získaná z transkriptomových projektů *E. nipponicum* - GS FLX Systém, Roche (Jedličková, 2013) a Illumina MiSeq (Kašný *et al.*, nepublikováno) byla zpracována bioinformaticky. Po anotaci sestavených genů programem Blast2GO (verze 3.0) a NCBI (algorismu blastx) jsme z celého transkriptomu vyčlenili sekvence kódující tři proteinové skupiny inhibitorů serinových proteáz: annexiny a proteiny Kunitz-type, s kterými byly provedeny následující analýzy. Čtecí rámce získaných sekvencí byly identifikovány pomocí programů Expasy Translate Tool (<http://web.-expasy.org/translate>) a Open Reading Frame NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Za účelem srovnání primárních

sekvenčních informací na úrovni aminokyselin a rozpoznání homologních sekvencí uložených v databázi NCBI byl použit algoritmus BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.* 1990). K ověření přítomnosti signálního peptidu byl využit program SignalP 4.1.Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Aktivní domény proteinu či transmembránové domény byly predikovány pomocí programů Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>), TMHMM Server v. 2.0. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Sekundární struktury proteinů byly odhadnuty s využitím programu PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Pro úpravy a porovnání sekvencí byl vytvořen multiple sequence alignment prostřednictvím programů ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a BioEdit 7.2.

4.5. Molekulární metody

4.5.1. Izolace RNA

Izolace celkové RNA z dospělých červů probíhala dle protokolu TRIzol® Reagent (GibcoBRL, cat.n15596). Získaná RNA (koncentrace 177ng/μl) byla rozpuštěna ve 20 μl v RNase free ddH₂O, koncentrace změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) a skladována v -80 °C.

4.5.2. Syntéza cDNA

Jednovláknová cDNA byla syntetizována z RNA pomocí kitu SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen No. 18080-400). Koncentrace cDNA byla opět měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) a vzorek následně uchován při -20 °C.

4.5.3. PCR a elektroforéza

Získaná cDNA sloužila jako templát pro PCR reakci se specificky navrženými primery v programu OligoAnalyzer - Integrated DNA Technologies (viz tab.10.). Reakce probíhala v cycleru C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad) za podmínek, které jsou spolu se

směsí reakce shrnuty v tab.11. Vzorky byly nanášeny na 1,5 % agarózový gel obsahující Sybr green v 1x TAE pufru (Invitrogen) a jako marker sloužil GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder. PCR produkty o předpokládané velikosti byly vyříznuty z gelu, přečištěny dle návodu kitu The ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) a eluovány do 10 µl dH₂O. Koncentrace purifikovaných fragmentů DNA byla změřena na spektrofotometru ND-1000.

Název primeru	sekvence
Kunitz5995F	5' TTTACGGCATTGGTTATCTTGG 3'
Kunitz5995R	5' AAGCACTGGACAGGTTGA 3'
Kunitz5641F	5' ATGGGCAGTAAGTTAATCTTATC 3'
Kunitz5641R	5' TTAACCACTGGACAGGT 3'

Tab.10. Specifické primery pro amplifikaci genů kódujících Kunitz proteiny z *E. nipponicum*

Maste mix (emerald)	12,5 µl	95 °C	2 min
cDNA (100ng)	1 µl	95°C	30 s
Forward primer (10nm)	1 µl	55°C	30 s
Reverse primer (10nm)	1 µl	72°C	1 min
ddH ₂ O	9,5 µl	72°C	10 min

Tab. 11. Složení směsi a nastavení programu PCR reakce

4.5.4. Klonování do neexpresního systému

Získané fragmenty DNA byly klonovány do neexpresního systému za účelem sekvenace. Ke klonování byl využit systém pGEM®-T Easy Vectors (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems -Promega).

PCR produkt	3 µl	22 °C
ligační pufr	5 µl	
vektor	1 µl	5 min
T4 DNA ligáza	1 µl	

Tab.12. Složení a inkubace ligační směsi

4.5.5. Transformace

Plazmid pGEM obsahující inzert byl zakomponován do kompetentních bakteriálních buněk (*Escherichia coli*, XL1 blue) pomocí „heat shock transformace“. Transformované buňky byly inkubovány 1 ½ h ve 37 °C, následně vysety na plotny s LB médiem obsahující příslušné antibiotikum a inkubovány přes noc ve 37 °C. Podrobný postup viz manuál kitu pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).

4.5.6. Izolace plasmidu

U vybraných bakteriálních kolonií byla provedena kontrolní PCR reakce (tab.13.) s vektor - specifickými primery M13Forw/Rev (tab.14.), za účelem ověření přítomnosti inzertu v plazmidu. Plazmidy s potvrzeným inzertem byly izolovány z buněk pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) a odeslány do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Vzorky pro analýzu byly připraveny dle protokolu sekvenační laboratoře (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>).

94°C	2 min	} 30x
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

Název primeru	sekvence
M13 Forw	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'
M13 Rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'

Tab.14. Specifické primery M13

Tab.13. Průběh PCR reakce s M13 primery

4.5.7. 5' a 3' RACE PCR

K získání neznámé sekvence 5' a 3' konců vybraných genů byl využit GeneRacer™ Kit (Invitrogen). RACE cDNA byla připravena z celkové RNA získané z dospělých červů *E. nipponicum* dle návodu z kitu. Jednovláknová RACE cDNA byla následně využita v RACE PCR reakci (tab.15.-16.) se specifickými RACE primery (tab.17.).

94 °C	2 min	
94°C	30 s	5x
72°C	1 min	
94°C	30 s	5x
70°C	1 min	
94°C	30 s	25x
63°C	30 s	
70°C	1 min	
70°C	10 min	
4°C	~	

EmeraldAmp PCR master mix (Clontech)	12,5 µl
RACE cDNA	1 µl
GeneRacer primer Rev/ GeneRacer primer Forw	3 µl
vlastní primery forward/reverse (tab.)	1 µl
dd H2O	7,5 µl

Tab. 16. Složení PCR směsi na

Tab.15. Program PCR reakce

Název primeru	sekvence
Race6228F	5' GGATTTCCGAGGCAACTGCAA 3'
Race6228R	5'CTGGACAGGTTGACTCGCATT 3'
Race4151F	5'GGATTGCCGAAGCTCGCATTG 3'
Race44151R	5'CGTGGTATACTCGCATGGCAA 3'
Race558F	5'CCTTCTGGTGGTCAAATGAGT 3'
Race558R	5'AAGCACTGGACAGGTTGACTC 3'
GeneRacer™ Forw Primer	5' CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA 3'
GeneRacer™ Rev Primer	5' GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G 3'

Tab.17. Použité RACE primery

Výsledek byl vyhodnocen elektroforézou v 1,5 % agarózovém gelu. Jako marker byl použit HyperLadder II (BioLine). PCR produkty byly z gelu vyříznuty pod modrým světlem, purifikovány a klonovány do pGEM®-T Easy Vectors. Následně byly plazmidy s inzertem poslány k ověření do laboratoře sekvenace DNA - viz podkapitoly 4.5.1.4. – 4.5.1.6.

4.5.8. Exprese proteinu v *Escherichia coli*

4.5.8.1. Příprava rekombinantního proteinu

Pro tvorbu rekombinantního proteinu v bakteriích (*E. coli* - BL21) byl využit pET systém s expresním vektorem pET28a+ (Novagen) a kódující sekvence samostatné Kunitz domény, která byla získána z transkriptomové analýzy *E. nipponicum* (tab.18.).

actgcaagtccactatcaacttgt	caactgccccaaatgggc	ggatgtgcagagcgagtttt
T A S P L S T	C Q L P Q M V G M C R A S F	
cctcgattctattttgatgggaaaaaatgcacagaattcatttatggaggttgggggaaat		
P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C G G N		
gcaaacattttcagacgaaagc	ggaatgcgagtcaacctgt	ccagtgggttTAA
A N N F Q T K A E C E S T C	P V V *	

Tab. 18. Sekvence 5641 kódující Kunitz doménu *E. nipponicum* s vyznačenou doménou (žlutě), zeleně vyznačené specifické primery.

Na základě této sekvence byly navrženy specifické primery (tab.19.), jejichž součástí byly i sekvence specifické pro štěpení restričními endonukleázami NdeI a SacI. Jako templát pro PCR reakci byla použita cDNA *E. nipponicum*. Složení PCR směsi a průběh PCR reakce je zobrazeno v tabulkách 20. a 21.

Název primeru	Sekvence s vyznačenými restričními endonukleázami
5641rekdomF	5' TCTCATATGCAACTGCCCAAATGGTC 3'
5641rekdomR	5' ATGAGCTCTCAACAGGTTGACTCGCATTCC 3'

Tab.19. Specifické primery pro rekombinantní Kunitz doménu.

PrimeStar Max Premix	12,5 µl			
5641rekdomF	1 µl	98°C	10 s	} 35x
5641rekdomR	1 µl	60°C	10 s	
cDNA <i>E. nipponicum</i> (100 ng/µl)	1 µl	72°C	5 s	
ddH ₂ O	9,5 µl			

Tab.20. PCR směs a průběh reakce

Naamplifikované PCR produkty byly zaklonovány do pGEM®-T Easy Vectors a transformovány do buněk XL1 blue. Plazmidy s inzertem byly poslány k ověření do laboratoře sekvenace DNA (viz 4.5.4. - 4.5.6.).

4.5.8.2. Štěpení plazmidu

Po kontrolní sekvenaci byly plazmidy s inzertovanou Kunitz doménou (1μg) štěpeny restriktivními endonukleázami NdeI (1μl/10U) a SacI (1μl/10U; New England BioLabs) v 10x NEBpufu (5 μl) a dH₂O (43 μl). Inkubační doba reakce byla 4 hodiny při 37 °C s následnou inaktivací restriktivních enzymů v 65 °C po dobu 20 minut.

4.5.8.3. Ligace a transformace

Restriktázou ošetřený inzert - Kunitz doména (c = 43ng/μl, použité množství 8,5μl) byl vložen do linearizovaného expresního vektoru pET28a+ (c = 50ng/μl, použité množství 8,5μl), který byl rozštěpen stejným způsobem (totožnými restriktivními endonukleázami). Ligační směs mimo plazmidu s inzertem obsahovala 1 μl T4 DNA ligáza (5 U) a 2 μl 10X ligačního pufu T4. Reakce probíhala přes noc ve 14 °C. Výsledný plazmidový konstrukt byl transformován do kompetentních buněk BL21 *Escherichia coli* (Invitrogen; viz podkapitola 4.5.5.). U vybraných kolonií byla provedena kontrolní PCR s vektor - specifickými primery T7 pro ověření přítomnosti inzertu v plazmidu. Plazmidy s potvrzeným inzertem byly izolovány a poslány k sekvenaci (viz 4.5.6.)

4.5.8.4. Kultivace

Kultivace bakteriálních buněk s inzertem probíhala v LB médiu s kanamycinem (c=100μg/ml) v 50 ml Erlenmeyerově baňka (E. baňka) za standardních podmínek na třepačce (37 °C, 200 – 220 rpm) přes noc. Následující den byl z narostlé kultury odebrán 0,5 ml vzorek, který byl přenesen do nové falkony s 20 ml LB média s kanamycinem a vrácen do laboratorní třepačky s 37 °C. Po dosažení hodnoty OD 0,5 - 0,7 v bakteriální kultuře, tzn. v exponenciální fázi, byl do kultury přidán 0,1 M IPTG (spuštění exprese vloženého genu). Po 4 hodinové inkubaci bylo médium s bakteriemi stočeno na centrifuze (15000 g/5 min) a vzniklý pelet byl použit k purifikaci nebo byl zamražen v – 20 °C.

4.5.3.5. Purifikace z inkluzních tělísek

Purifikace proteinu z inkluzních tělísek *E. coli* probíhala v denaturačních i nativních podmínkách. V denaturačním prostředí byl bakteriální pelet nejprve resuspendován v lyzačním pufru (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 6 M GuHCl, pH 8; 3ml pufru/1g peletu), 1hod v pokojové teplotě. Vzorek byl poté centrifugován (10 000g/30min) a vzniklý supernant inkubován s Ni-NTA agarózou (QIAGEN) v poměru 1ml agarózy/4ml vzorku, 1 hod. Následovala chromatografie na Ni-NTA koloně za použití promývacího pufru (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8M urea, pH 6,3) a eluačních pufrů (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8M urea, pH 5,9 – 4,5), z každého kroku byl odebrán vzorek na následnou kontrolu na SDS - PAGE elektroforéze.

Při nativních podmínkách byl bakteriální pelet resuspendován v lyzačním pufru (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8). Následně byl ke vzorku přidán lysozym (1mg/ml) a inkubován 30min na ledu. Po uplynutí doby byl vzorek sonikován na přístroji Vibra cell 72405 (Bioblock scientific; 10 W; 6 x 10 s) a centrifugován (10 000g/30min; 4°C). Další kroky viz purifikace v denaturačních podmínkách, pouze s pozměněným složením pufrů (promývací pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8; eluační pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8). Podrobný návod viz manuálu The QIAexpressionist™ (Qiagen).

4.5.9. Expres proteinu v metylotrofních kvasinkách *Pichia pastoris*

4.5.9.1. Příprava rekombinantního proteinu

Pro expresi Kunitz proteinu 5641 proteinu z *E. nipponicum* v kvasinkách *Pichia pastoris* (kmen X33) byl použit jednak inzert celého genu jednak část genu kódující pouze Kunitz doménu (viz 4.5.3.1). Příprava probíhala dle upraveného manuálu EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) s expresním vektorem pPic α B. Součástí primerů byla místa pro restriční endonukleázy Not1, Xho1 a reverzní primer obsahoval His-tag sekvenci (tab.2.). Amplifikace pomocí PCR, štípání, ligace i transformace do kompetentních XL1 blue

buněk *Escherichia coli*, za účelem ověření funkčnosti primerů proběhly viz 4.5.3. – 4.5.6. s rozdílem použitých vektor – specifických primerů a antibiotika. Místo primerů T7 se při kontrolní PCR reakci a následné sekvenaci uplatnily primery AOX1. Antibiotikum kanamycin bylo nahrazeno zeocinem (25 ug/ml). K izolaci plazmidů z *E. coli* byl použit kit Genopure Plasmid Maxi kit (Roche). Izolované ověřené plazmidy byly linearizovány restrikním enzymem SacI a přečištěny ethanolom (dle manuálu EasySelect™ *Pichia* Expression Kit).

1	ATG ggcagtaagttaatcttatctatggcactccttgccatggctgtagctacgctttggata M G S K L I L S M A L L A M A V A T L W I
63	gccgaagtgagtggg ggagtaaccgaaatttcattctgggtgggtcaaagtgagtg gggagcacat A E V S G G V P K F H S G G Q M S G G A H
126	aaatttcttcttgagggtcaaagtgagtggtgaagtaccgaaatttcttcttgatggccaaca K F L L G G Q M S G E V P K F L L D G Q T
189	actgca agtccaactatcaacttgtcaactgccccaaatgggtcgg tatgtgcagagcgagtttt T A S P L S T C Q L P Q M V G M C R A S F
252	cctcgattctattttgatgggaaaaaatgcacagaattcatttatggaggttggtgggggaaat P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C G G N
315	gcaaacaaattttcagacgaaagcggaatgag tcaacctgtccagtggt TAA A N N F Q T K A E C E S T C P V V * 366

Tab. 21. Kompletní sekvence 5641 Kunitz-type proteinů *E. nipponicum* s vyznačenou doménou (žlutě), zeleně vyznačené specifické primery pro celý protein, červeně specifický forward primer pro Kunitz doménu

5641FCpichia (CP)	ATA CTC GAG AAA AGA GGA GTA CCG AAA TTT CAT TCT GGT GGT CAA ATG AGT GGT GG
5641RCpichia (CP)	AT GCGGCCGC TT AA TGATGATGATGATGATGA A CCA CTG GAC AGG TGA
5641FDpichia(doména)	ATA CTC GAG AAA AGA AGT CCA CTA TCA ACT TGT CAA CTG CCC CAA ATG GTC GG
5641RDpichia(doména)	AT GCGGCCGC TTAA TGATGATGATGATGATGA ACCACTGGAC AGGT TGA

Tab. 22. Kompletní použité primery Kunitz proteinu.

Zvýrazněno: **restrikní endonukleázy** – červeně; **HisTAG** – žlutě; **Stop kodon** – zeleně, CP-celý protein

4.5.9.2. Transformace buněk *P. pastoris*

Buňky *P. pastoris* X33 bez vložených inzertů byly kultivovány v 10 ml YPD (yeast extract, pepton, glukóza, agar) medi na třepačce (250 rpm /30 °C) přes noc. Po centrifugaci (1500g/5min/4°C) byl pelet s kvasinkami promyt dle protokolu (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit) a poté rozpuštěn v 1 ml 1M sorbitolu. Samotná elektroporace byla provedena v objemu 100 µl pomnožené kvasinkové kultury (v 1M sorbitolu) s 10 µl linearizovaným vektorem obsahující inzert (c = 4020ng/µl) na přístroji Gene Pulser Cell (Bio-Rad) s předem připraveným protokolem pro *Pichia pastoris* (2000V/5ms). Ihned po elektroporaci byl ke kultuře přidán 1ml vychlazeného 1M sorbitolu a suspenze buněk byla inkubována 1,5 hod při 30°C v 15 ml zkumavce. Elektroporované kvasinky byly poté vysety na YPD – agarovou plotnu s přidáním antibiotikem zeocin (100 µg/ml, Invitrogen) a kultivovány přes noc v 30°C.

4.5.9.3. Kultivace

Vybrané klony kvasinek byly inkubovány v médiu 50 ml BMG (100mM fosfátový pufr; 1,34% YNB, 4×10^{-5} % Biotin, 1% glycerol) a BMMH (100mM fosfátový pufr; 1,34% YNB, 4×10^{-5} % Biotin, 0,5 % metanol) na třepačce (200 rpm) vždy přes noc v 30°C (viz manuál EasySelect™ *Pichia* Expression Kit). Indukce exprese proteinu probíhala přidáním metanolu o finální koncentraci 0,5 %, 3krát denně po dobu 5ti dnů. Každý den byl odebrán 1 ml kontrolního vzorku z média pro analýzu exprese na SDS-PAGE, popř. Western blotu.

4.5.9.4. Lyofilizace a purifikace

Po indukci exprese bylo médium s rekombinantním proteinem odděleno od kvasinkové kultury centrifugací (3000g/10min/4°C). Buněčný pelet byl zamražen pro případnou kontrolu a supernatant přefiltrován přes 0,22 µm membránu (Millipore). Médium bylo zamraženo tekutým dusíkem a lyofilizováno přes noc. Lyofilizát byl rozpuštěn v 3 ml sterilní H₂O, z kterého byl následně purifikován protein His-tag (dle protokolu v The QIAexpressionist™ - Qiagen)

4.5.9.5. Western blot

K detekci His-tag značeného rekombinantního proteinu posloužila Western blot analýza s anti-his-tag primární protilátkou (Invitrogen). Ke každému vzorku byl přidán redukující nebo neredukující vzorkový pufr a vzorky byly ponechány cca 5 minut ve vodní lázni (cca 90 °C). Proteiny ve vzorcích byly následně separovány v pomoci SDS elektroforézy MiniProtean 3 (Bio-Rad) na 12-15 % polyakrylamidových gelech o tloušťce 1 mm při konstantním napětí 150 – 200 V. Jako marker molekulové velikosti byl použit Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad). Rozdělené proteiny byly přebíjeny na nitrocelulózovou membránu (25 V, 1.3 A, 20min; Trans-Blot Turbo, Bio-Rad). Membrána byla poté inkubována 2 hodiny v 5 % blokovacím pufru (PBS-T, Biotin Grade Blocker Non Fat Dry Milk, BIO-RAD) následně s primární anti-his-tag protilátkou (1:2000) a s anti-myší IgG sekundární protilátkou značenou peroxidázou (1:5000). Doba inkubace s protilátkami byla vždy 2 hodiny, mezi jednotlivými kroky byla membrána promyta 3 x 5 min v fosfátovém pufru pH 7.4 s obsahem 0,05% detergentu Tween (PBS-T). Blot byl vyvíjen s využitím OPTI-4CN substrátového kitu dle protokolu výrobce (Bio-Rad).

4.5.9.6. Hmotnostní spektrofotometrie

Polyakrylamidové gely s proteiny byly obarveny 10 min v Coomassie Brilliant Blue - 250 (CBBR-250) a zdokumentovány na přístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Vyřiznuté proteinové proužky o požadované velikosti byly poslány na analýzu do laboratoře hmotnostní spektrometrie (PřF UK).

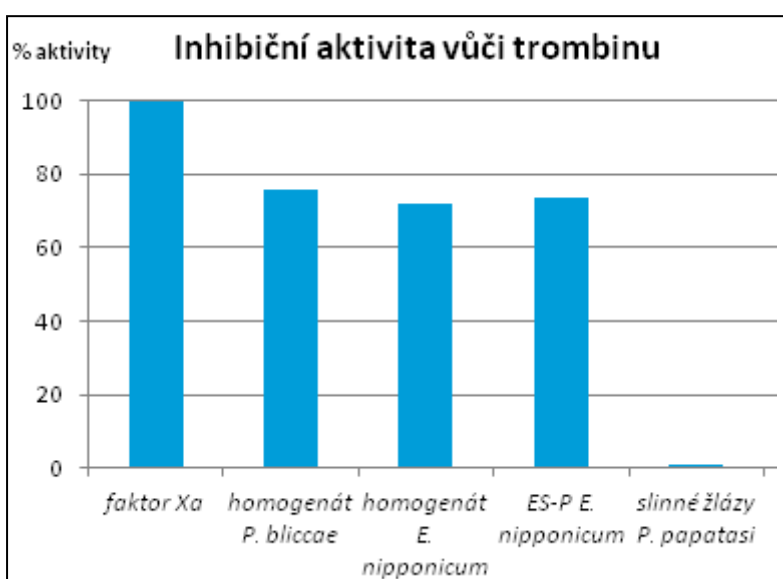
Analýza vzorků probíhala na přístroji 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex) vybaveným Nd:YAG laserem (355 nm, frekvence 200 Hz). Generovaná data byla analyzována za pomoci programu MASCOT 2,2 (Matrix Science) oproti databázi, do které byla zařazena námi dodaná sekvence Kunitz proteinu 5641 z *E. nipponicum* (L. Jedličková, 2013). Zpracování vzorků provedl Mgr. Karel Harant.

5 Výsledky

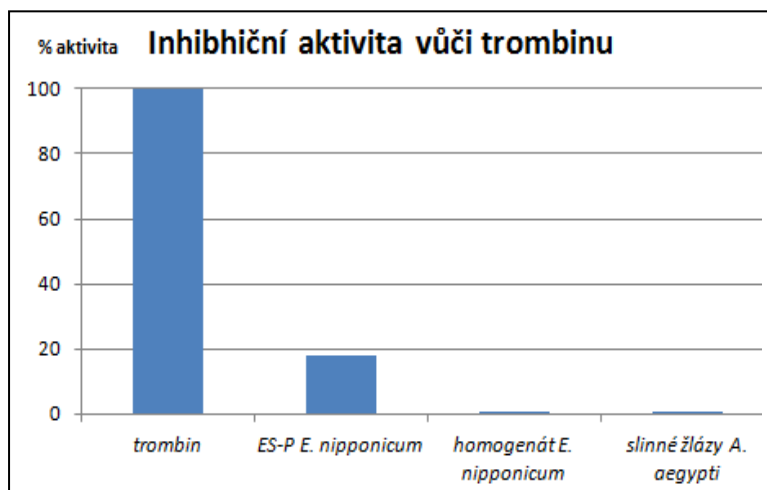
5.1 Měření inhibiční aktivity vůči koagulačním faktorům

5.1.1 Inhibiční aktivita homogenátu a ES-P proti trombinu

Detekce inhibiční aktivity homogenátu a ESP z červů č. Diplozoidae vůči trombinu probíhala se specifickým fluorogenním substrátem VPR (Val-Pro-Arg-AMC) v pH 8. Počet opakování měření bylo 5, přičemž k průkazu inhibiční aktivity došlo pouze v 1 případě.



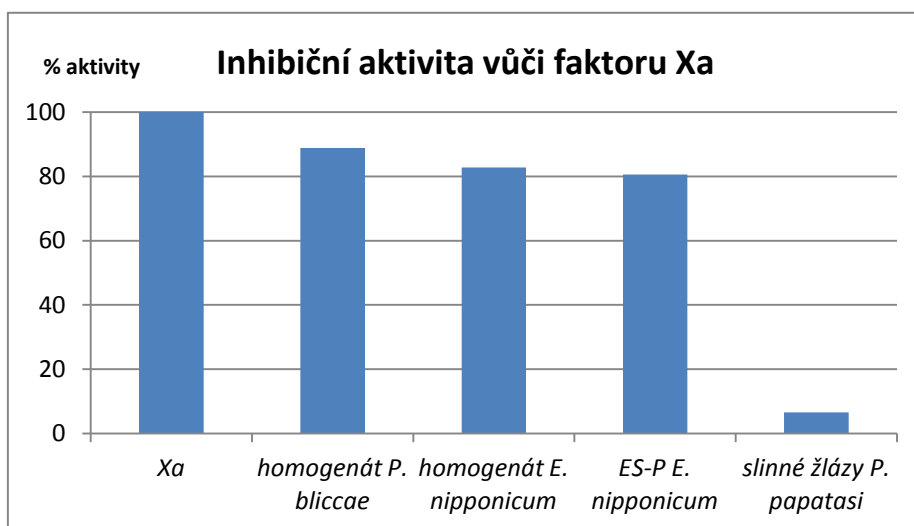
Graf.1. Výsledek měření inhibiční aktivity homogenátu a ES-P vybraných zástupců č. Diplozoidae proti FIIa s použitým množstvím proteinu v případě homogenátu v rozmezí 2,4 - 22 μg na jamku, ES-P- 0,6-2,4, u slinných žláz komára 1,8 - 10,8 μg na jamku.



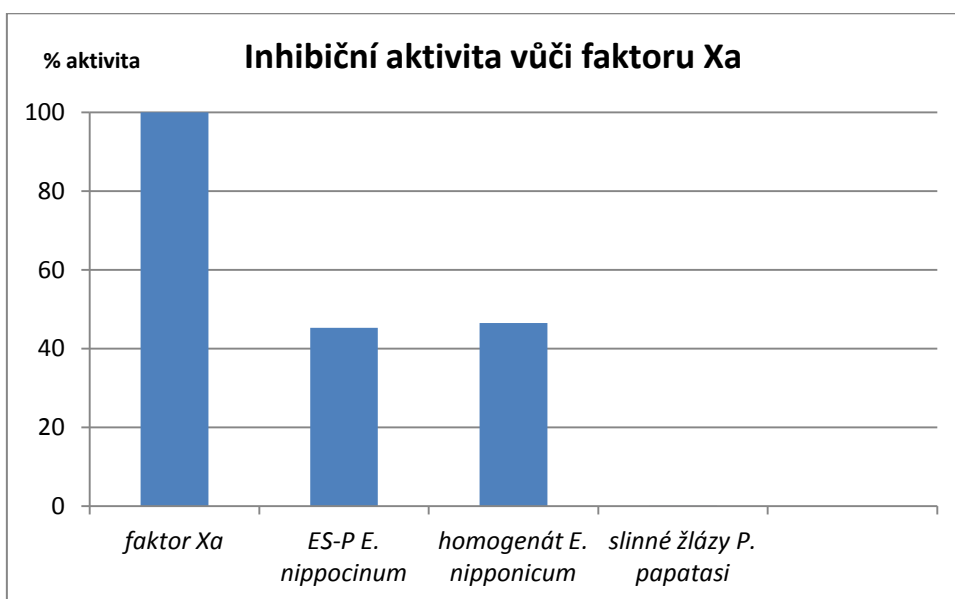
Graf.2. Jediný případ měření inhibiční aktivity homogenátu a ES-P proti FII, kdy vyšel pozitivní výsledek. Proužité množství proteinu v homogenátu se pohybovalo v rozmezí bylo 32-140 µg na jamku, ES-P 3,2 – 6,48 µg a slinných žláz komára 5,4 – 9 µg na jamku.

5.1.2 Inhibiční aktivita homogenátu a ES-P proti faktoru Xa

Detekce inhibiční aktivity homogenátu a ES-P z červů č. Diplozoidae vůči FXa probíhala se specifickým fluorogenním substrátem IEGR (Ile-Glu-Gly-Arg-AMC) v pH 8. Počet opakování měření byl stejný jako v případě trombinu. 100% inhibiční aktivita nebyla prokázána v žádném testovaném vzorku. Při použití vyšší koncentrace (graf.4.) je pozorována částečná inhibiční aktivita homogenátu i ES-P *E. nipponicum*.



Graf.3. Výsledek měření inhibiční aktivity homogenátu a ES-P vybraných zástupců č. Diplozoidae proti FXa. Použité množství proteinu v případě homogenátu v rozmezí 2,4 - 22 µg na jamku, v případě ESP 0,6-2,4, u slinných žláz komára 1,8 – 10,8 µg na jamku.



Obr. 4. Pokus měření inhibiční aktivity homogenátu a ES-P proti FXa s částečnou aktivitou. Proužité množství proteinu v homogenátu se pohybovalo v rozmezí 32-140 µg na jamku, ES-P 3,2 – 6,48 µg a slinných žláz komára 5,4 – 9 µg na jamku.

5.3. Transkriptomová analýza

Výstupem prvního transkriptomového projektu *E. nipponicum*, 454 sekvenování (Jedličková, 2013), které probíhalo na přístroji GS FLX System Roche, bylo 324 941 čtení seskupených do 6910 kontigů. Průměrná délka činila 420 pb, přičemž sekvence kratší než 100 pb byly vyřazeny. Anotace získaných sekvencí byla následně realizována prostřednictvím programu Blast2GO a NCBI. Od takto zpracovaných dat jsme začali provádět bioinformatické analýzy, kdy byly nejprve algoritmem blastx a blastn predikovány sekvence kódující geny proteinů s potenciální antikoagulační aktivitou. Jednalo se o proteinové rodiny - annexiny, serpiny a proteiny Kunitz typu. Dohromady bylo z dat vyčleněno 21 annexinů, 11 Kunitz type proteinů a 4 sekvence kódující serpiny. Sekvence získané z tohoto projektu se z velké části překrývaly se sekvencemi z projektu Illumina Helmintologické laboratoře, PšF UK, jehož výsledky nejsou zatím publikovány. Projekt re-sekvence na přístroji Illumina MiSeq CE Biosystems byl realizován z důvodu získání nekompletních sekvenačních dat z GS FLX transkriptomu. Nové získané sekvence byly na základě překrývajících se úseků seskupeny („assembly“) do kontigů platformou Trinity. Z vytvořené

databáze - Eudiplozoon_Nipponicum_trinity_k25.fasta, která zahrnuje 198 771 kontigů, byly prostřednictvím algoritmu tblastn opět vybrány sekvence kódující geny annexinů serpinů a Kunitz proteinů, obdobně jako v předchozím transkriptomovém projektu. V tomto případě bylo však identifikováno 24 annexinů, 21 Kunitz proteinů a 5 serpinů.

Po vyřazení totožných sekvencí (redundancí) z obou transkriptomů a v případě Kunitz proteinů i vyřazení sekvencí řadících se k neinhbibujícím Kunitz proteinům (spondin a papilin), jsme získali úplné nebo částečné sekvence transkriptů kódujících proteiny, které by se teoreticky mohly podílet na antikoagulační aktivitě. V tabulce č. 22.-24. jsou uvedeny veškeré kontigy (spolu s jejich izoformami) sekvencí z vybraných proteinových skupin. V rámci sekvencí jsou označeny start a stop kodóny, signální sekvence či transmembránové domény, délky kódujících nukleotidových sekvencí, počet aminokyselin v řetězci a nejvyšší identita (%) v rámci ostatních organismů dle NCBI, algoritmus blastp. V případě Kunitz proteinů je zde uvedena i predikovaná bližší proteinová skupina, do které patří. Kompletní sekvence všech zástupců jednotlivých proteinových skupin s vyznačenými konzervovanými motivy jsou znázorněny v příloze 1, 2 a 3.

Tab. 22. Sekvence kódující Kunitz type proteiny.

číslo	kontig (izoforma)	predikovaný protein	organismus (accession no.)	start/stop kodon	SP/TM	délka pb/AA
1.	559*	Kunitz/Bovine PTI	<i>Ancylostoma ceylanicum</i> (EPB68128.1)	ano/ne	ne/ne	126/42
2.	558*	Kunitz SPI	<i>Pimpla hypochondriaca</i> (Q8T0W4.1)	ano/ano	ne/ne	375/125
3.	585*	Kunitz/Bovine PTI	<i>Ancylostoma ceylanicum</i> (EPB68128.1)	ano/ne	ne/ne	156/52
4.	2959*	Kunitz/Bovine PTI	<i>Necator americanus</i> (ETN72717.1)	ano/ano	ne/ano (1)	765/255
5.	5641*	Kunitz SPI	<i>Ixodes scapularis</i> (XP_002434145.1)	ano/ano	ano/ano (1)	366/122
6.	5995*	Kunitz SPI	<i>Ixodes scapularis</i> (XP_002434145.1)	ano/ano	ano/ano (1)	297/99
7.	6019*	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris suis</i> (KHJ42565.1)	ano/ano	ano/ano (1)	303/101
8.	37079*	Kunitz/Bovine PTI	<i>Stegodyphus mimosarum</i> (KFM81288.1)	ano/ne	ano/ano (1)	390/130
9.	60883	TFP inhibitor	<i>Crassostrea gigas</i>	ano/ano	ne/ano (1)	570/190

			(EKC35170.1)			
10.	60782 (g1-i1)	TFP inhibitor	<i>Meleagris gallopavo</i> (XP_010710984.1)	ano/ano	ne/ano (1)	300/100
11.	60782 (g1-i2)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris suis</i> (KHJ42565.1)	ano/ano	ne/ano (1)	480/160
12.	60782 (g1-i3)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris suis</i> (KHJ42565.1)	ano/ano	ne/ano (1)	456/152
13.	62677 (g1-i2)	Kunitz SPI	<i>Ixodes scapularis</i> (XP_002434145.1)	ano/ano	ano/ne	918/306
14.	62677 (g1-i3)	Kunitz/Bovine PTI	(<i>Trichuris trichiura</i>) (CDW57127.1)82	ano/ano	ano/ne	918/306
15.	62677 (g1-i4)	Kunitz SPI	<i>Ixodes scapularis</i> (XP_002434145.1)	ano/ne	ano/ne	567/189
16.	62677 (g1-i5)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris trichiura</i> (CDW57127.1)87	ano/ano	ano/ne	693/231
17.	62677 (g1-i7)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris trichiura</i> (CDW57127.1)	ano/ano	ano/ne	669/223
18.	62677 (g1-i8)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris trichiura</i> CDW57127.1)	ano/ano	ano/ne	645/215
19.	62677 (g1-i9)	Kunitz/Bovine PTI	<i>Trichuris trichiura</i> (CDW57127.1)	ano/ano	ano/ne	870/290
20.	68750 (g2-i2)	Kunitz SPI	<i>Pimpla hypochondriaca</i> (Q8T0W4.1)92	Ano/ano	ano/ano (1)	249/83
21.	68750 (g2-i3)	Kunitz SPI	<i>Pimpla hypochondriaca</i> (Q8T0W4.1)96	Ano/ano	ano/ano (1)	249/83

SP – signální peptid, TD – transmembránová doména, *kontigy z projektu Roche
Kunitz/Bovine PTI - Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain protein
Kunitz SPI - Kunitz-type serine protease inhibitor, TFP inhibitor - Tissue factor pathway inhibitor

Tab.23. Veškeré sekvence z transkriptomových analýz kódující annexiny.

číslo	kontig (izoforma)	shodný organismus (accession no.)	start/stop kodon	SP/TD	délka pb/AK
1.	7533	<i>Echinococcus granulosus</i> (EUB59004.1)	ano/ne	ne/ne	312/104
2.	9474	<i>Schistosoma japonicum</i> (CAX70813.1)	ano/ne	ne/ne	717/239
3.	37863	<i>Danio rerio</i> (NP_861423.1)	ano/ne	ne/ne	138/46
4.	39626	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1053/351
5.	51242	<i>Schistosoma mansoni</i> (CCD80863.1)	ano/ano	ne/ne	1002/334
6.	56172	<i>Crassostrea gigas</i> (EKC40619.1)	ano/ano	ne/ne	1032/344
7.	58980	<i>Crassostrea gigas</i>	ano/ano	ne/ne	1002/334

		(EKC21740.1)			
8.	60438	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA48684.1)	ano/ano	ne/ne	1062/354
9.	62895 (g2-i1)	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA48684.1)	ano/ne	ne/ne	756/252
10.	62895 (g2-i2)	<i>Acyrtosiphon pisum</i> - <i>isoform</i> (XP_008182513.1)	ano/ano	ne/ne	909/303
11.	63027	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1065/355
12.	64072	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA36105.2)	ano/ano	ne/ne	1065/355
13.	65416	<i>Schistosoma japonicum</i> (CAX70812.1)	ano/ano	ne/ne	1086/362
14.	67135 (g1-i1)	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1062/354
15.	67135 (g1-i2)	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1095/365
16.	67135 (g1-i3)	<i>Clonorchis sinensis</i> GAA36105.2	ano/ano	ne/ne	879/293
17.	67135 (g1-i4)	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1062/354
18.	67135 (g1-i5)	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA36105.2)	ano/ne	ne/ne	675/225
19.	67628	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1056/352
20.	67961	<i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001.1)	ano/ano	ne/ne	1056/352
21.	77725	<i>Danio rerio</i> (NP_861423.1)	ano/ne	ne/ne	291/97
22.	98026	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA33818.2)	ano/ne	ne/ne	336/112
23.	111098	<i>Danio rerio</i> (NP_861423.1)	ano/ne	ne/ne	231/77
24.	180912	<i>Schistosoma japonicum</i> (CAX70811.1)	ano/ne	ne/ne	171/57

SP – signální peptid, TD – transmembránová doména

Tab. 24. Veškeré sekvence z transkriptomových analýz kódující serpiny.

číslo	kontig (izoforma)	shodný organismus (accession no.)	start/sto p kodon	SP/TD	délka DNA/AK
1.	3567	<i>Crassostrea gigas</i> (EKC27864.1)	ano/ano	ne/ne	948/316
2.	51568 (g1-i1)	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA28469.2)	ano/ano	ne ne	1197/399
3.	68567 (g1-i1)	<i>Lutzomyia longipalpis</i> (ABV60345.1)	ano/ne	ne ne	948/316

4.	68567 (g1-i2)	<i>Clonorchis sinensis</i> (ADI60059.1)	ano/ano	ne/ne	1206/402
5.	67910 (g1-i1)	<i>Schistosoma mansoni</i> (CCD60071.1)	ano/ano	ne/ne	1284/428

SP – signální peptid, TD – transmembránová doména

5.3.1. Analýzy získaných sekvencí kódující proteiny Kunitz typu

K následujícím bioinformatickým charakterizacím (anotacím) Kunitz sekvencí došlo pouze u jejich konzervovaných domén, které fungují jako autonomní proteinová oblast vykazující inhibiční aktivitu vůči proteázám. Na základě alignmentů Kunitz domén *E. nipponicum* byla nejprve ověřena přítomnosti všech důležitých konzervovaných aminokyselin, kterými se motiv vyznačuje. Dále bylo možné jednotlivá konzervovaná místa reaktivní smyčky porovnat s doménami Kunitz proteinů vybraných, především krevsajících organismů (tab.25.).

Je známo, že v P1 pozici trypsin-like inhibitorů se vyskytuje arginin (R) či lysin (K). Naopak pro chymotrypsin-like inhibitory je v této pozici charakteristický leucin (L) nebo methionin (M). Tendenci alaninu (A) v P'1 místě vykazují pak BPTI-like inhibitory. Je tedy možné konstatovat (viz tab.26.), že většina proteinů Kunitz typu *E. nipponicum* patří do první zmiňované skupiny trypsin-like inhibitorů. Domény obsahující arginin či lysin je 27, přičemž u některých sekvencí kódující Kunitz proteiny byla zaznamenána i více než jedna doména. Pozicně specifické AA pro chymotrypsin like inhibitory se vyskytují u třech domén, které jsou navíc součástí domén–trypsin like proteinů. Inhibiční aktivita těchto proteinů může působit na větší spektrum proteáz.

Tab.25. Aminokyselinové srovnání inhibujících Kunitz domén z různých organismů.

ornithodorin	CLGD-PPTS	CAEGTDITYYDS	SKTCKVLA-AS	CPSGENTF	ESEVE	CQVAC
rhipilin	CLFKPEQGN	CAGFLPRWY	NPETES	CEPFTYPV	CNKKNEAF	VSCTLCMNM
monobin	CSGDPPRGD	CGVEERY	YFDSTTRT	CQTFEYRG	CSSPDNSY	ETEIECEIAC
Conk-S1	CDLPADSGS	GTKAEKRI	YNSARKQ	CLRFDYTG	QGGNENN	FRRTYDCQRTC
ancylostoma	CNAPLDGPQ	CMAFFKRY	TYNKEKKQ	CEEFVYGG	CRPSPNN	FETMEECKKTC
amblin1	CKKKPAVGP	CRALIEKW	YFDYSTQS	CKTFYYGG	CGNGNKF	SSRKKCREAC
ixolaris	CSLEVDYGV	GRANIPRW	YDTNNTAT	CEMFTYGG	ITGNKNN	FESEEECKETC
simukunin	CNLPVDEGV	CRALFKRF	YYPATDS	CKEFYVGG	CEGNGNR	FKSKKECILKC
schisto2	CLLDYDEGI	CRALLRKF	YDSVNQTC	CEIFYVGG	CLGNGNN	FLSKDECKERC
60883 g1 i1	CEMLDNGL	CHASIPRY	YFNGT--	QCLOFDYNG	CGGNANN	FISISECNSTC
6019	CQLPQIVGM	CRA SFPRF	YFDGK--	KCTEFYVGG	CGEMQNAS	QFPVQCKEKC
5995	CQLPKAVGM	CLASFPRY	YFDGK--	KCTQEFYVGG	CGGNANN	FQTKAECESC
558	CQLPKMVMG	CKASFPRF	YFDGK--	KCTEFYVGG	CGGNANN	FQTKAECESC
5641	CQLPQVMGM	CRA SFPRF	YFDGK--	KCTEFYVGG	CGGNANN	FQTKAECESC
68750g2-i3	CQLPKMVMG	CRA SFPRF	YFDGK--	KCTEFYVGG	CGGNANN	FQTKAECESAC
62677g1-i5.1	CTLPAEVGS	CRAHVDR	RFYFDGK--	ECKSFVYGG	CDGNTNN	FENLEDCQKTC
62677g1-i7.1	CTLPAEVGS	CRAHVNR	RFYFDGK--	ECKSFVYGG	CDGNGNN	FKTIKECRKTC
62677g1-i2.1	CTLPAEVGS	CRAHVNR	RFYFDGK--	ECKSFVYGG	CDGNANN	FEDIEDCRKTC
62677g1-i2.4	CSLPAETGP	CRAHVRS	YFNGE--	DCENFVYGG	CMGNANN	RFETIDECRKTC
62677g1-i7.3	CNMPADIGP	CRAHVNR	FFNGE--	DCEHFVYGG	CLGNANN	FKTIEDCQNTC
62677g1-i2.2	CNLPQESGP	CLAYFVR	FFNGE--	DCENFVYGG	CMGNANN	FKTIEDCRKTC
62677g1-i8.2	CNLPADIGP	CRA YTKRF	YFNGN--	HCENFVYGG	CMGNANN	FKTIEDCRKIC
62677g1-i2.3	CNMPAEIGP	CKASFTRF	YFNGE--	DCENFVYGG	CMGNANN	FKTIEDCRKIC
62677g1-i7.2	CNMPAEIGP	CKASFTRF	YFNGE--	DCENFVYGG	CMGNANN	FETIEECRTTC
TFPI2	CLLPDYGP	CRA LLLRY	YDRTYQS	CRQFLYGG	CEGNANN	FYTWEACDDAC
boophilin1	CRLPADEGI	CKALIPRF	YFNTETGK	CTMFSYGG	CGGNENN	FETIEECQKAC
haemalin1	CRLPAEPGI	CRAFMPRY	YFDVEKQ	CEQFIYGG	CKGNENN	FETLKECQDAC
BPTI	CLEPPYTGP	CKARIIRY	FYNAKAGL	CQTFVYGG	CRAKRNN	FKSAEDCMRTC
F.hepatica	CLLVEPGP	CLGGIRSW	AWDSRRGE	CVPEFVYGG	CEGNDNR	FDKSSCEYNC
E.granulosus	CKLPLDPGF	CRA YFPR	WGFHQESGE	CVRFIYGG	CGGNKNQ	FHSKEQCESMC
schisto1	CLLPRLTGK	CRA SLSRW	GNPQTTT	CEEFYVGG	CANENN	FLTKEECETVC
boophilin2	CEPAADSGS	CAGQLER	WFYNVQSGE	CETEFVYGG	CGNDNNY	ESEEECELVC
haemalin2	CKAAPETGL	CKASFER	WFFNAASGE	CEEFYVGG	CGNDNNY	ENKEECEFAC

Ornithodorin (Accession no: P56409), rhipilin (ADJ56344.1), monobin (ABI52647), Conk-S1 (P0C1X2.1), ancylostoma (AAN10061.1), amblin (AAR97367), ixolaris (AAK83022.1), Simukunin (ACH56928.1), schisto2 (CCD75776.1), TFPI2 (AAA20094.1), boophilin1 (CAC82583.1), haemalin (BAH02683.1), BPTI (1510193A), F.hepatica (P81162), E.granulosus (ACM79010.1), schisto1 (CCD75776.1), boophilin2 ((CAC82582.1), haemalin2 (BAH02683.1)

Žlutě –konzervované cysteiny; zeleně konzervovaná P18 pozice; trypsin like inhibitory s fialově vyznačenou P1 pozice R, K a chymotrypsin like inhibitory s L, M v P1 pozici; P'1 pozice červeně

podtržené zvýrazněné sekvence z E. nipponicum

Tab. 26. Konzervované AA v pozice P1 a P'1 reaktivní smyčky a počet domén každého Kunitz proteinu *E. nipponicum*.

číslo kontigu	počet domén	P1 pozice	P'1 pozice
558	1	R	A
5641	1	R	A
5995	1	R	A
6019	1	K	A
60883	1	H	A
60782 (g1-i1)	1	K	A
60782 (g1-i2)	2	E, R	A
60782 (g1-i3)	2	E, K	A
62677 (g1-i2)	4	R, L, K, R	A
62677 (g1-i3)	4	R, K, L, R	A
62677 (g1-i5)	3	R, K, R	A
62677 (g1-i7)	3	R, K, R	A
62677 (g1-i8)	3	R, R, R	A
62677 (g1-i9)	4	R, L, K, R	A
68750 (g2-i2)	1	R	A
68750 (g2-i3)	1	R	A

Leucin (L) charakterizuje chymotrypsin-like inhibitory, Arginin (R) a lysin (K) trypsin like inhibitory.

5.3.2 Analýzy získaných sekvencí kódující serpiny

Serpiny získané z transkriptomu *E. nipponicum* byly porovnány se serpiny dalších vybraných parazitů, u nichž byla prokázána inhibiční aktivita. Zahrnuty byly však i serpiny účastníci se inhibice trávicích enzymů (př. trypsin, chymotrypsin). Na alignmentech (obr.11.) jsou vyznačené konzervované motivy vč. reaktivní centrální smyčky (RCL), která se podílí na inhibici. Ve srovnání s vysoce konzervovanou doménou Kunitz proteinů, kde přítomnost pozičně specifických AA vypovídá o funkci proteinu, se reaktivní smyčka serpinů přítomností takovýchto AA nevyznačuje.

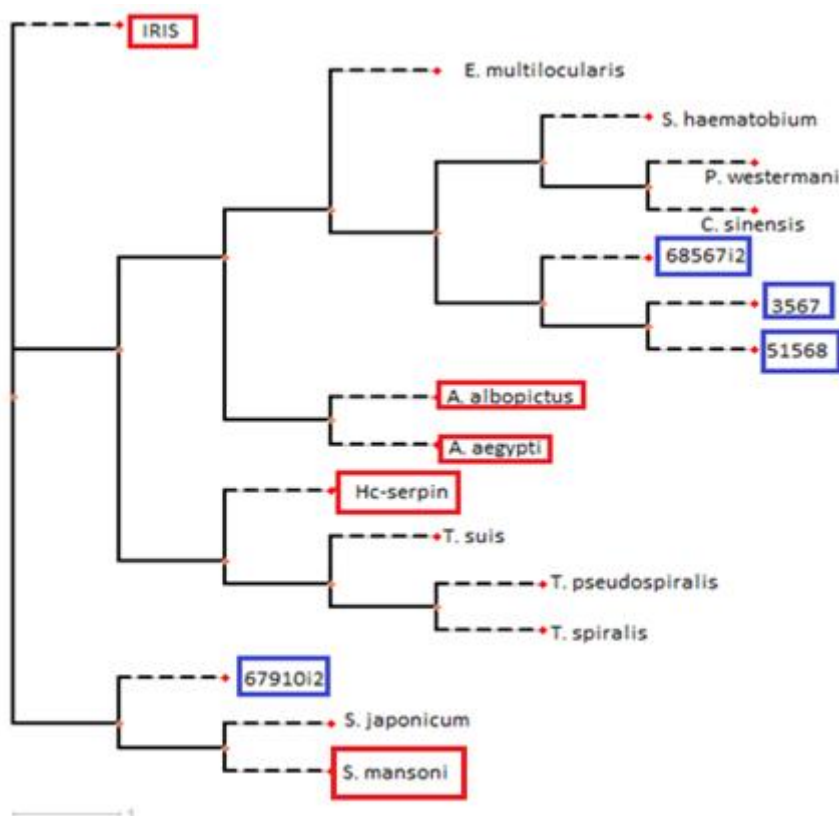
Obr.11. AA Alignment serpinů *E. nipponicum* s ostatními parazity vč. serpinů s prokázanou antikoagulační aktivitou

A.aegypti	QDVALGELIVQKMEMSIAADG GEKQA QSFV-----DKQDK Q FTAH OPFLFVV YDRNLVPIILVGFYLKTPP
A.albopictus	QDVALGELIVQKMEINMSG DGEIQGQKFP -----DKQDK L FTAN OPPF FVFIYFDRSVVPLVGHYLKAPP
67910i2	ARLFVQ TMMQ KAALRVNEDGIEAAAA TYALINLAS LETIQFHV N OPF YLSVHDS QHLPVF VARIDRPSV
6791i1	ARLFVQ TMMQ KAALRVNEDGIEAAAA TYALINLAS LETIQFHV N OPF YLSVHDS QHLPVF VARIDRPSV
S.mansoni	-KVHVQVLQHSVALKVN EDGVEAAAA VMGICLRSAPSI RF DN ES FCYVYDKIKTSLFAGRIIKPVE
S.japonicum	NNLYVRSFIQTNVMKVN ESGIEAA SVTSPITVPI SAPDVNFHV TH PF ICFYDQQNMPLLAAKVINPM-
Hc-serpin	-RLLVAGA AHKAI IKV EDGTTAA GATVFSKFESMSERVK FEANHP FL FI ILTKD-NDP LF MGQ FV ----
T.suis	QNLVYSSGIHKTVVEVD EKGT EAAAA T AITCVTDSGKVY Q FTAD RPF L F AI V DISGFLFLGRFESGQ--
T.spiralis	KDIFVSDILHKAFLEVN EGTE EAAAA T AVTMTDKAA Q LF F VAD H PF L FI C NP K CI P LP L GRY T GLN V
An.simplex	DSLIVSDVVKANVEVN EGSE EAAAA T GLFMVFRS PP IR FI AD H PF FI FTI V SQ-NRIL FI GR H ----
IRIS	NDLVVSAVVHKAVLEVN EGSE EAAAVSSV VAV TRIG Q AF E FN V D H PF L FI IR NTVNDILFAGQVNSL--
S.haematobium	SNFCIGDILHKAILEVD EGAV AAAA T SVEFINLSL PE VE FR V D HP FF IS I IWNNTVPV LF GHV V AP T E
P.westermani	TNLFVSDV F HKAILEVD EE GAT AAA ATAVMMN M RCAMR P TV R VD R PF F VALIC AS TVPV FI GHV TH PG S
C.sinensis	ERLHVSDV F HKAILE I DE G AT AAA ST G MMV-SRMM G PP PF RV D HP FF L AI ISDT M VPV FG HIT NP ES
E.multilocularis	RS L AVSDVY HQ AVIDVD EE GA E AAAA T AMP M VR C MPP V D F V D HP FF FI FI VTK T GI P V FG HV V HP S
68567i2	EALFV STV KHMA ILEVN EEGA AAAA T AV R I Q L R CM I VR D F H V D HP FF V AIL S ANN V PL FG H C V D P Q P
51568	PGLF ASSAK HMA VLEVN EEGA AAAA T A I E I A F FC V VER N F V D H PF F V AIL S ANN V PL FG H C V D P Q P
3567	RGLF ASSAK HMA VLEVN EEGA AAAA T A I E V E Y AS F I E AN F LL I I H F-----GY PL RL Q RAS V PR P

alignment cca 360 aminokyselinového zbytku (kompletní alignment v příloze 5). **žlutě** vyznačené motivy s konzervovanými AA; **červeně** a **zeleně** zvýraznění serpin motivů, vč. reaktivní smyčky (**modré** zvýraznění), tučně a podtržené - sekvence z *E. nipponicum*

Organismy s accession no. proteinů: A.aegypti (AAL76022.1), A. albopictus (AAV90672.1), S. mansoni (AAA29938.1) S. japonicum (AAV90672.1), Hc-serpin (ACP43576.1), T.suis (KHJ49058.1), T.spiralis (CBX25723.1), A. simplex (CBX25525.1), IRIS (EEC19903.1), S.haematobium (Accession no. KGB37771.1), P. westermani (ABV57466.1), C.sinensis (ADI60059.1), E. multilocularis (CAD12372.2)

Ve snaze podhalení funkce serpin- sekvencí z *E. nipponicum* byl vytvořen fylogenetický strom, který znázorňuje postavení jednotlivých serpinů z *E. nipponicum* se serpiny ostatních parazitů. Hlavním záměrem fylogenetického stromu bylo zjištění možné příbuznosti serpinů *E. nipponicum* s již známými antikoagulačními serpiny.



Obr.12. Nezakořeněný fylogenetický strom znázorňující postavení serpinů *E.nipponicum* (modře) mezi serpiny ostatních parazitů, serpiny s prokázanou antikoagulační aktivitou- červeně (metoda maximum likelihood).

Organismy a jejich accession number proteinů použitých ve fylogenetickém stromu: A. aegypti (AAL76022.1), A. albopictus (AAV90672.1), S. mansoni (AAA29938.1) S. japonicum (AAV90672.1), Hc-serpin (ACP43576.1), T.suis (KHJ49058.1), T.spiralis (CBX25723.1), IRIS (EEC19903.1), S.haematobium (Accession no. KGB37771.1), P.westermani (ABV57466.1), C.sinensis (ADI60059.1), E. multilocularis (CAD12372.2).

5.3.3. Analýzy získaných sekvencí kódující annexiny

Se sekvencemi kódující annexiny byly provedeny stejné analýzy jako u předchozích serpinů. Strukturálně je pro annexiny charakteristická doména, jejíž součástí je opakující (každých 70-80 AA) homologních motiv, který je složen z 3 AA zbytků (**K-G-X-G**; viz obr.13). U většiny annexinů v následujícím alignementu byla prokázána antikoagulační aktivita. Jelikož annexinů s prokázanou inhibiční aktivitou proti koagulačním faktorům není u parazitických organismů mnoho, jsou zde začleněny i lidské annexiny, kde byla aktivita potvrzena. Na základě těchto alignmentů (ovšem s kompletními sekvencemi) byl vytvořen fylogenetický strom (metoda maximum likelihood), kde z hlediska postavení patří kontigy č. 65416g1i1 a č. 630279g1i1 mezi teoretické kandidáty s antikoagulační aktivitou. Vyskytují se v blízkosti annexinu z *S. bovis* (de la Torre-Escudero *et al.* 2012), u kterého byla antikoagulační aktivita prokázána byla a annexinu *M. sebastis*, u něhož se této aktivitě zatím jen spekuluje, základě jiných fylogenetických studií (Choi *et al.* 2009)

Obr. 13. Alignment 1-60 AA sekvencí annexinů *E. nipponicum* s ostatními organismy vč. s annexiny s prokázanou antikoagulační aktivitou

```

ANXB2.T.solium      MNT----RSSQYDCNGPFRPTLKPNNPFDVNADVEALCKSMRCWGTDEEETITKILGKRTS
65416g1i1         -----MSHRINESGLYKATIEMTVGFSASADSETIHRALQGIGTDEKAIHVLGRRTN
ANXS.bovis          MVSEFGITRHAFFDPHGHTPTIKPTTGFSASADAERLHRAMKGPGTDETAINILARRTN
67135g1i2         MKNFSDFSQHKLGYESKYTGTMKSPGNSLPSVDAERLYNALSGP-VNEDEIDVLGKRKM
64072g1i1         MKNAVQIGLHQLGYEHSYSGTLKTVVGSASGDAERLFKAMKGLGTDEAELCDVLGRRTF
67961g1i3         -MALKLFTEQOMHLTGLHKPTIFTSINFNPSVDAERLCRALMSPEVHENELISVLASRTS
63027g1i1         -MSFPVFSFQIGYRGLTPTVFVDSRCQYENEATRLFKAMKGLGTNEKELIDVLGTRPS
ANX.M.sebastis     MPGFSVFHMQQVGLNCFYEPSITAVQNFASADAQKLDAMKGFGTDEKTLIEVLGKRVS
67628g12i1       -MPVKLFTEQOLHMTGIYTPTVQSSVFNAVTEAERLYKAMKGLGTNEKELIAVLGNHVT
39626g1i1       -MQRNITSLHQLAADGFYEATIPSLGFSATVDIERLYKAMKGLGTNEKELIAVLGNRTL
51242g1i1       -----MQSIKPLDAFVPTVVAKNFNPEYEADRLKKAFKGLGTDEMVNRVLGEITL
ANXB2.S.mansoni    -----MHQTGPSITFPDRISAENDAEQLHNACKGLSTDEETITKILGHRNL
58980g1i2         -----MSALSSLVARFRGTVRPVENFNPEEDAMTLRSAFKGIGYNAKPIEIFGRRNY
H.microstoma       -----MTLQLQTNVWGPNRPSILPWSSFNYEQDAKDLHEAILGLESCDNKIVNILAKRTV
60438g1i1         -----MLTLKQVYASGHANPTLRPRADFNAEEAAKGLKAAMDGVGTDEYTLINILGTCSS
ANX13.S.japonicum -----MSKIQIGPNGIYQPTLKIQRNNDPNKDAEVLYEAMKGWGTNEDRIIGILGYRSS
62895g2i2         -----MKGLGTDEKAIDVLASKTS
56172g1i1         -----MDEITLADVIYTPTVRPVVDFNPENDAECLRRAMKGLGTDEKAISILANRSA
ANXB3.T.solium     -----MATVKPFRCFNANEDAQELEKAMKGIGTDEATIDVLANRTS
A.aegypti          -----MSQYTPTVPADPFDANEDAATLRKAMKGFGTDEKAIEVLARRGI
A6.C.sinensis      MGDLSAWNFAQLGYPGGYNPTLRYPNPNPDQCEKLRKAMKGVGTDEKAIDVLAHRTA
ANX2.H.sapiens     MVHEILCKLSL---EGSTYGSVKAYTNFDAERDALNIETAIKTKGVDEVTIVNILTNRSN
ANXA1.H.sapiens    MVSEFLKQAQTV---SSKGSASVSPYPTFNPSDDVAALHKAIMVKGVDEATIDILTKRNN
ANX5.H.sapiens     -----MVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLTSRSN
A3.H.sapiens       -----MIWVRGTVRDYPDFSPSVDAEAIQKAIRGIGTDEKMLISILTERSN
:  ::

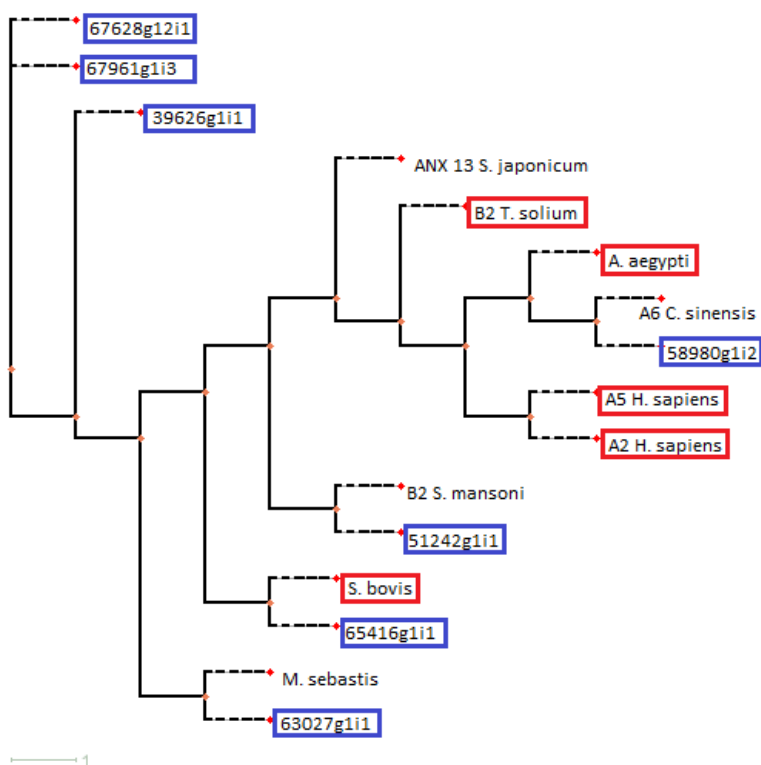
```

žlutě - opakující se doména, modře - konzervované AA, tučně a podtržené - sekvence z *E. nipponi, cum*

Organismy s accession no. proteinů: ANXB2 *T.solium* (Accession no:AAF64166.1), ANX *S.bovis* (ACC78610.1), *M.sebastis* (ACD93001.1), ANXB2 *S.mansoni* (AAC79802.3), *H.microstoma* (CDS26513.1), ANXB3 *T.solium* (AAF64166.1), *A.aegypti* (ABF18321.1), A6 *C.sinensis* (GAA48217.1), ANX2 *H. sapiens* (NP_004030.1), ANXA1.*H.sapiens* (CAG28612.1), ANX5 *H. sapien* (NP_001145.1), A3 *H.sapiens* (NP_005130.1)

- kompletní alignment v příloze 4

Obr.14. Nezakořeněný fylogenetický strom znázorňující postavení annexinů *E.nipponicum* (modře) mezi annexiny ostatních parazitů; annexiny s prokázanou antikoagulační aktivitou - červeně (metoda maximum likelihood).



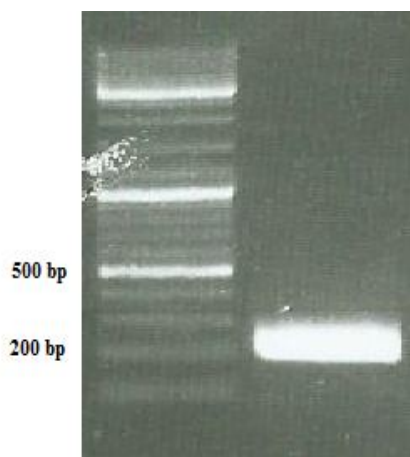
Organismy a jejich accession number proteinů použitých ve fylogenetickém stromu: ANXB2 *T.solium* (AAF64166.1), ANX *S.bovis* (ACC78610.1), M.sebastis (ACD93001.1), ANXB2 *S.mansoni* (AAC79802.3), *A.aegypti* (ABF18321.1), A6 *C.sinensis* (GAA48217.1), ANX2 *H. sapiens* (NP_004030.1), ANX5 *H. sapien* (NP_001145.1).

5.3. 5' a 3' RACE PCR

Pomocí metody 5' a 3' RACE PCR se nepodařilo získat 3' konce sekvencí č. 559 a 585 s absencí stop kodoňu, ani 5' konec u sekvence č. 558, která jako jediná mezi Kunitz proteiny *E. nipponicum* se start/stop kodónem nemá signální sekvenci ani transmembránovou doménu.

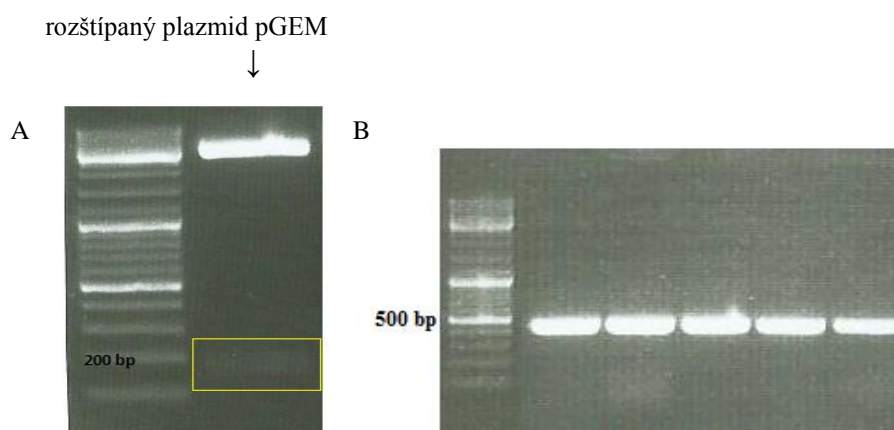
5.4. Exprese proteinu v bakteriálním systému *E. Coli*

Pro expresi rekombinantní Kunitz domény 5641 byl nejprve využit bakteriální systém *E. coli* s expresním vektorem pET28a+ (Novagen). Z cDNA (koncentrace = 933ng/μl) připravené z RNA dospělých červů byl prostřednictvím PCR reakce se specifickými primery (5641rekdomF a 5641rekdomR) amplifikován fragment DNA o velikosti 202 bp (obr.15.).



Obr.15. PCR amplifikace za použití primerů 5641rekdomF a 5641rekdomR, očekávaná velikost PCRproduktu 202 bp.

Produkt byl nejprve zaklonován do neexpresního vektoru pGEM®-T Easy a po kontrolní sekvenaci byl štěpen restrikcí endonukleázami NdeI a SacI (obr.16A.). Rozštěpený konstrukt s Kunitz doménou byl zaklonován do expresního vektoru pET28a+ a transformován do BL21 kompetentních buněk *E. coli*.

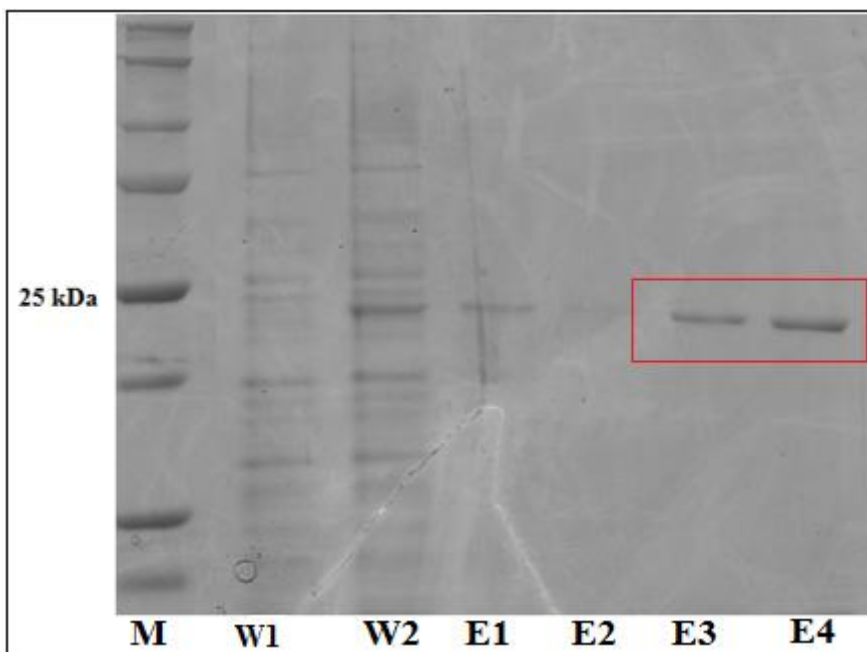


Obr.16.A. Ověření štěpení RE NdeI a SacI inzertu Kunitz domény (žlutý rámeček) v pGEM®-T Easy.

Obr.16B. Kontrolní elektroforéza potvrzující úspěšnost Kunitz inzertu v jednotlivých koloniích v *E.coli* s T7 primery. Velikost fragmentu odpovídá Kunitz doméně (202bp) spolu s exp.vektorem (260 bp).

Od bakteriální kultury narostlé v LB médiu jsme centrifugací oddělily buněčný pelet, ve kterém jsme purifikovaly rekombinantní protein v nativních i denaturačních podmínkách. Pro purifikaci Kunitz domény byla použita chromatografie na Ni-NTA koloně. V případě denaturačních podmínek probíhala purifikace v pufru: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 8 M urea, pH, zatímco v nativních podmínkách ve vzrůstající koncentraci imidazolu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10-205mM imidazole).

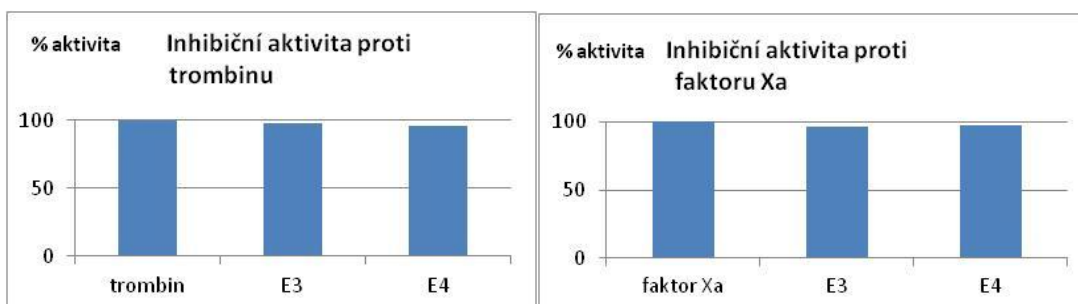
Očekávaná velikost rekombinantní Kunitz domény (8 kDa) detekována nebyla. Velikost proteinu v denaturačních i nativních podmínkách se pohyboval v rozmezí 20-25 kDa (obr.17, 18..) Přestože se tato oblast vždy shodovala s profilem na nitrocelulóзовé membráně po detekci his-tag protilátkou (obr.19), potvrzení z hmotnostní spektrofotometrie izolovaných oblastí bylo vždy bakteriálního charakteru.



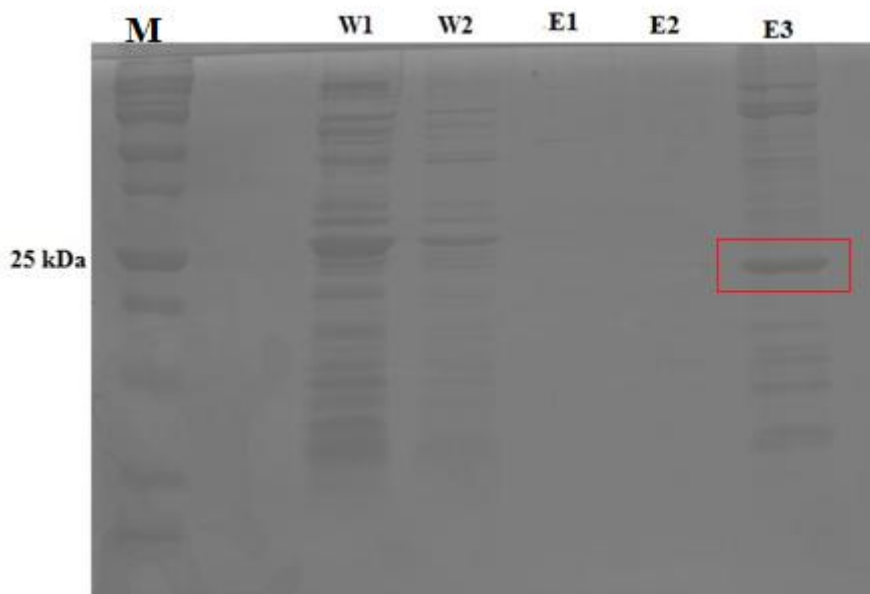
Obr.17. SDS-PAGE analýza jednotlivých izolačních frakcí v denaturačních podmínkách. Produkt o velikosti 20-25kDa (červeně) odeslán na hmotnostní spektrofotometrii.

M – marker, **W1**– 1. frakce po promývacím pufru (pH 6,3), **W2**- 2. frakce po promývacím pufru (pH 6,3) **E1**- frakce po eluačním pufru 1 (5,9), **E2**-frakce po eluačním pufru 2 (pH 5,0), **E3**-frakce po eluačním pufru 3 (pH 4,5), **E4**-2.frakce po eluačním pufru 3 (pH 4,5)

Se vzorky E3 a E4 byla měřena inhibiční aktivita vůči trombinu i faktor Xa, v pH 8. Inhibiční schopnost těchto vzorků prokázána nebyla.



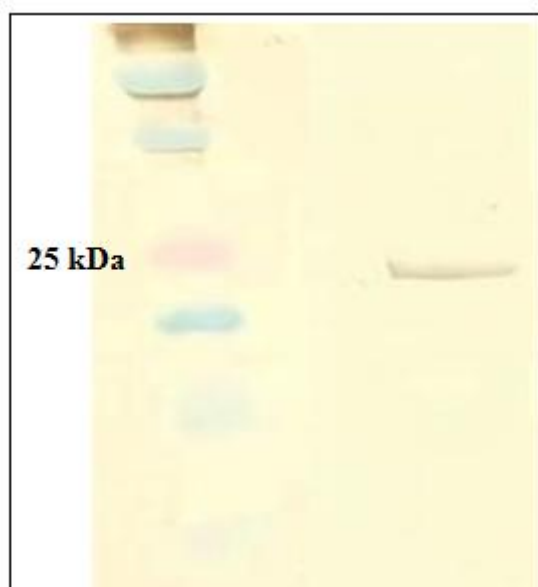
Graf .3. Měření inhibiční aktivity proti trombinu a faktor Xa u vzorků E3 a E4.



Obr.18. SDS-PAGE analýza jednotlivých izolačních frakcí v nativních podmínkách. Velikost bandu je i v těchto podmínkách mezi 20-25 kDa. Produkt (červeně) odeslán na hmotnostní spektrofotometrii.

M – marker, **W1**– 1. frakce po promývacím pufru (pH 6,3), **W2**- 2. frakce po promývacím pufru (pH 6,3), **E1**- frakce po eluačním pufru 1 (pH5,9), **E2**-frakce po eluačním pufru 2 (pH 5,0), **E3**-frakce po eluačním pufru 3 (pH 4,5)

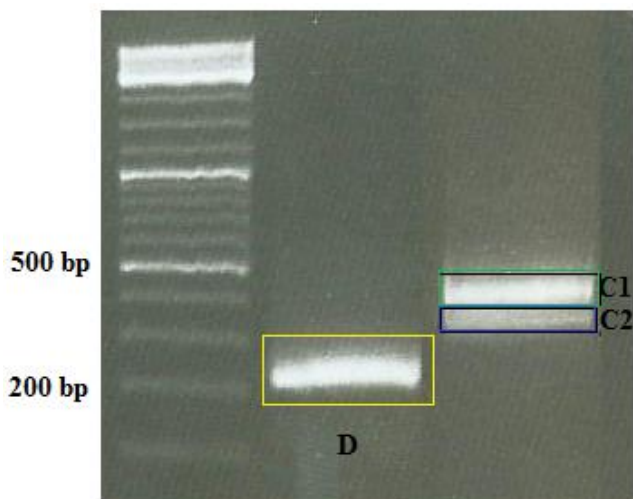
Se vzorkem E3 byla měřena inhibiční aktivita vůči trombinu i faktor Xa, v pH 8. Inhibiční schopnost těchto vzorků prokázána nebyla.



Obr.19. Detekce Kunitz domény na nitrocelulókové membráně korespondující s velikostí proteinu na SDS-PAGE elektroforéze. V očekávané velikosti cca 8 kDa nebyl žádný protein protilátkami detekován.

5.5. Expresse rekombinantního proteinu v *Pichia pastoris*

Pro expresi proteinu v kvasinkách *Pichia pastoris* byly navrženy specifické primery pro celý Kunitz protein (5641FCpichia, 5641RCpichia) i samotnou doménu (5641FDpichia, 5641RCpichia). Zvoleným expresním vektorem byl pPicz α B (Invitrogen). Na amplifikování DNA fragmentů PCR reakcí byla použita stejná cDNA (koncentrace = 933ng/ μ l) jako v případě exprese proteinu v bakteriální systému *E. coli*. Vzniklé produkty (obr.20) byly stejným způsobem nejdříve klonovány do neexpresního vektoru pGEM® -T-Easy za účelem kontrolní sekvence.



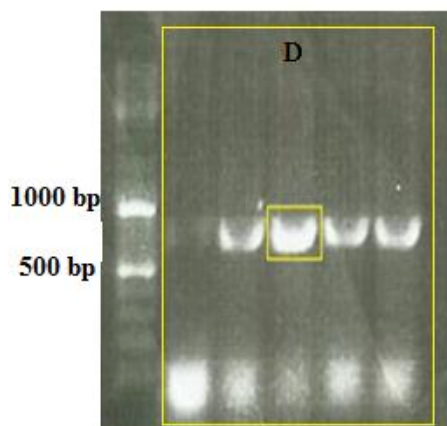
Obr.20. PCR amplifikace

Kunitz doména (D) za použití primeru 5641FDpichia, 5641RCpichia – žlutý rámeček; očekávaná velikost cca 210 bp.

Celý protein (primery 5641reksomF a 5641reksomR), vzniklé produkty: C1 (zelený rámeček) a C2 modrý rámeček; očekávaná velikost fragmentu 310 bp.

U amplifikovaných fragmentů celých proteinů C1 a C2 nebyla sekvenací prokázána 100 % účinnost primeru 5641FCpichia, tudíž byly další kroky s touto sekvencí pozastaveny.

Kunitz doména byla z pGEM® -T-Easy vektoru po kontrole štěpena RE Not1 a Xho1, ligována do pPicz α B a transformována do BL21 kompetentních buněk *E. coli*. Ověřený plazmid (obr.21) byl před elektroporací do *P. pastoris* linearizován restriktivním enzymem Sac1.

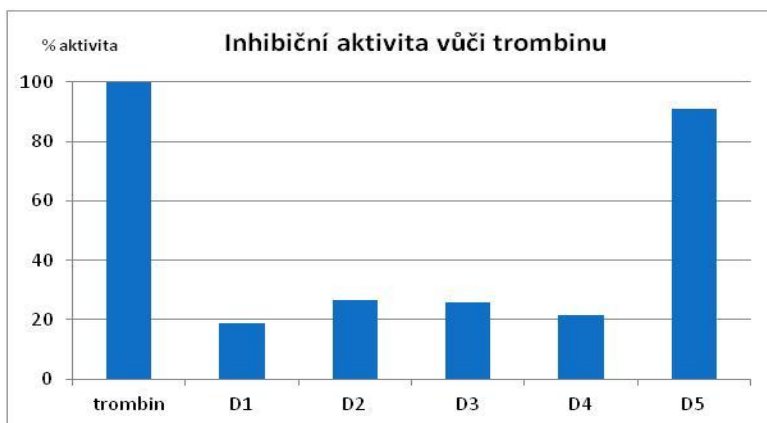


Obr. 21. Ověření přítomnosti inzertů Kunitz domény v expresním vektoru pPiczaB. Kunitz doména (D) žluté ohraničení; předpokládaná velikost spolu vektorem cca 620bp. Ohraničený fragment byl izolován a použit na elektroporaci.

Po elektroporaci pPiczaB s Kunitz inzertem do kvasinek *P. pastoris* byly buňky vysety na YPD agarové plotny s antibiotikem (zeocin) a jednotlivé narostlé kolonie použity k měření inhibiční aktivity vůči koagulačním faktorům IIa a Xa.

5.5.1. Inhibiční aktivita vybraných klonů s rekombinantní doménou z *P. pastoris* proti trombinu

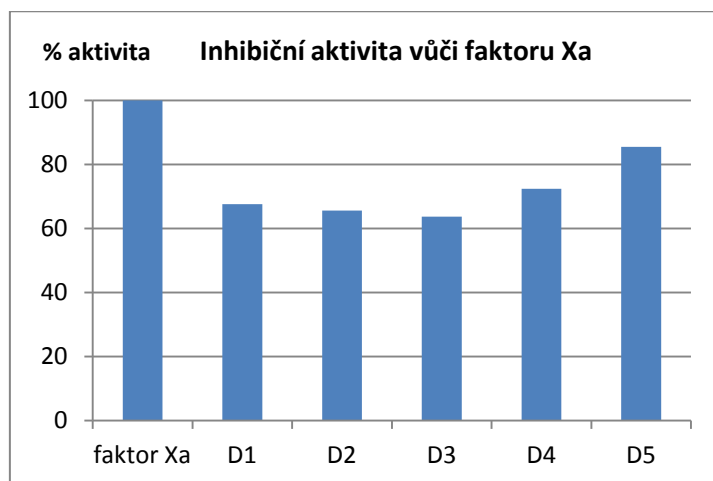
Testování inhibiční aktivity jednotlivých rekombinantních klonů Kunitz domény v expresním vektoru pPiczaB vůči trombinu probíhala za stejných podmínek jako s homogenátem/ES-P *E. nipponicum*. Testovaným vzorkem bylo nezkoncentrované BMMH médium, v němž se 2 dny inkubovaly elektroporované buňky *P. pastoris* ve 30 °C na třepačce (250rpm). Buněčný pelet byl následně oddělen centrifugací. Částečná inhibiční aktivita proti trombinu byla prokázána u klonů D1 –D4 rekombinantní Kunitz domény.



Obr. 22. – Měření inhibiční aktivity jednotlivých klonů rekombinantní Kunitz domény v *P. pastoris* (v BMMH médiu) proti FIIa s fluorogenním substrátem VPR (Val-Pro-Arg AMC). V klonech D1 – D4 byla zaznamenána částečná inhibiční aktivita, v klonu D5 nikoliv.

5.1.4. Inhibiční aktivita vybraných klonů s rekombinantní doménou z *P. pastoris* proti faktoru Xa

Testování inhibiční aktivity vůči faktoru Xa bylo měřeno se stejnými klony Kunitz domény. Testovaným vzorkem bylo stejné BMMH médium, v němž se 2 dny inkubovaly elektroporované buňky *P. pastoris* ve 30 °C. V tomto případě však v žádném testovaném vzorku nebyla prokázána významná inhibiční aktivita.



Obr.23. – Měření inhibiční aktivity jednotlivých klonů rekombinantního Kunitz domény v *P. pastoris* (v BMMH médiu) proti FXa s fluorogenním substrátem IEGR (Ile-Glu-Gly-Arg-AMC).

K dalším charakterizacím těchto klonů bohužel kvůli degradaci materiálu nedošlo.

6. DISKUZE

Biochemické analýzy s homogenátem a ES-P *E. niponicum*

U hematofágních monogeneí čeledi Diplozoidae nebyl dosud objasněn žádný mechanismus inhibice hostitelské hemostázy, který je nezbytný pro všechny krevsající organismy. Cílem této práce proto byla charakterizace funkčních molekul, které by se mohly aktivně zapojovat do inhibičních procesů vůči hostitelské koagulační kaskádě.

Tato práce byla vůbec první projekt, který se měřením inhibiční aktivity u č. Diplozoidae zabýval. S výběrem testovaných faktorů nám pomohl obecný fakt, že většina hematofágních organismů inhibuje právě trombin a fXa. Především kvůli své významné pozici v koagulační kaskádě patří mezi dva nejčastěji inhibované koagulační faktory (Ciprandi, Horn, and Termignoni 2003). Faktor Xa stojí v místě vyústění počátečních koagulačních fází, odkud generuje produkci trombinu, který aktivací fibrinogenu spouští formování sraženiny. Zdá se být velmi pravděpodobné, že zástupci č. Diplozoidae exprimují inhibitory serinových proteáz, působící alespoň proti jednomu z faktorů. Vyloučená však není ani inhibice faktorů obou (Stark et James 1996). Na základě těchto skutečností jsme otestovali homogenát a ESP červů u vybraných zástupců č. Diplozoidae proti trombinu a FXa. V konečném výsledku však nemůže s naprostou jistotou potvrdit, vůči kterým koagulačním faktorům je inhibiční aktivita namířena. Výsledek byly 4 negativních měření a 1 pozitivní, kde ovšem aktivita homogenátu *E. niponicum* vykazovala až 100% inhibici trombinu a částečnou inhibici FXa. V případě ES-P *E. niponicum* byla detekována částečná inhibice trombinu i FXa. Otázkou vysvětlení může být použité množství proteinu testovaného vzorku. Na základě dostupných informací o již popsanych antikoagulantech u krevsajících organismů můžeme sice srovnat metodiku pokusů a používané množství proteinů v testech, ovšem ne vždy je to skloubitelné s naším modelovým organismem. Většina charakterizovaných inhibitorů koagulačních faktorů hematofágů pochází z organismů, kde k detekci sloužily slinné žlázy. Téměř u všech zástupců kmenů Eurythropoda (Diptera, Ixodida, Heteroptera) nebo Annelida (Hirudinea), došlo k detekci antikoagulantů prostřednictvím izolace a homogenizace slinných žláz (Pereira *et al.* 1996, Ibrahim *et al.* 2001, Salzet 2001, Chagas *et al.* 2011). Ve vzniklé homogenizované směsi žláz není proteinové zastoupení tak široké jako

v případě homogenátu celých červů. Podobnou situaci nacházíme u střevních antikoagulantů izolovaných např. z pijavky *Theromyzon tessulatum* nebo z ploštice (Heteroptera) (Pereira *et al.* 1996, Salzet a kol. 2000), kde podobně jako u slinných žláz, může dojít k poměrně snadné manipulaci a následné detekci inhibiční aktivity. V případě krevsajících helmintů, nelze tento postup aplikovat, už jen z toho důvodu, že slinné žlázy většinou nemají. V případě č. Diplozoidae je předpokládána přítomnost antikoagulačních faktorů ve speciálních žlázách v blízkosti esofágu. Metodou vypitvání žláz, která se běžně aplikovala u zmíněných členovců, je z důvodu odlišné morfologie neproveditelná. Studie, s kterými č. Diplozoidae můžeme metodicky porovnávat je u č. Ancylostomatidae, u nichž byla charakterizována celá řada inhibitorů koagulačních faktorů produkována ezofageálními či cefalickými žlázami (Cappello *et al.* 1996; Jiang *et al.* 2011). Žádné dostupné zdroje však nemluví o izolaci samotných esofageálních žláz (Jiang *et al.* 2011). Jedna z pilotních studií identifikace inhibiční aktivity proti koagulačním faktorům u *A. caninum* také z homogenátu červů (Cappello *et al.* 1993). Nicméně k průkazu bylo použito 100 červů, s následným vstupním testovaným množstvím 50-100ul proteinové směsi. V našem případě je homogenizace takového množství červů neuskutečnitelná. Především na počátku experimentů jsme se potýkali s nedostatkem materiálu, který nestačil pokrývat potřebné množství vzorků na probíhající experimenty. Navíc dle teorie o sezónním výskytu zástupců č. Diplozoidae na žábrách ryb, nedocházelo k častému sběru např. v zimních měsících, kde se ovšem přítomnost červů později potvrdila. Průměrný výtěžek z každého sběru se pak pohyboval zhruba v rozmezí 10-80 červů.

V případě detekce inhibiční aktivity z ESP *E. nipponicum* může hrát roli nízká koncentrace přítomných inhibitorů. Červi pro účely našich pokusů byli sice inkubováni ihned po jejich odebrání z žaber, nicméně produkce antikoagulačních faktorů, se v momentě přerušení kontaktu s hostitelskou krví může rapidně snížit, ne-li úplně přerušit. Další možný problém je, že ne byli červi po odebrání z žaber v takové kondici, aby byli schopni plivat dostatečné množství proteinů po celou dobu inkubace.

Transkriptomové analýzy

Další metoda k charakterizaci inhibitorů serinových proteáz vycházela z dat transkriptomových projektů u *E. nipponicum*. Obecně lze o skupině Monogenei říci, že z hlediska funkčních molekul patří poměrně k neprobádaným parazitům. Zvláště pokud srovnáme dostupné informace s ostatními ploštěnci. U řady zástupců kmene Platyhelminthes jsou k dispozici údaje celých genomů. Projekty tohoto typu jsou směřovány převážně na

významné lidské parazity, jako jsou *Schistosoma mansoni* nebo *S. japonicum*. Nalezneme ovšem i další analýzy, které se zabývaly identifikací funkčních molekul např. u motolice *Clonorchis sinensis* (Wang *et al.* 2011) či tasemnice *Taenia solium* (Tsai *et al.* 2013). Až v relativně nedávné době se rozběhly projekty na zástupcích tř. Monogenea. V roce 2014 to byl např. osekvenovaný genom *Gyrodactylus salaris*, jehož velikost se srovnatelná s genomickými informacemi některých tasemnic (Hahn *et al.* 2014). Transkriptomový projekt *E.nipponicum*, z kterého jsme v této práci vycházeli byl vůbec první funkční analýzou této čeledi. Kvalita dat bohužel nebyla taková, jaká se očekávala. Ze slibovaného 1 milionu čtení bylo získáno pouze 324 941 čtení, poskládaných do 6910 kontigů (Jedličková, 2013). V současné době už jsou k dispozici data z re-sekvenace, ze kterých bylo získáno podstatně více, necelých 200 000 kontigů. Pro charakterizace možných inhibitorů serinových proteáz byly z transkriptomových dat vyčleněny kódující sekvence 3 proteinových typů: annexiny, serpiny a Kunitz proteiny. Získané data z obou transkriptomových projektu byla mezi sebou porovnána a následně byly vyřazeny identické, opakující se sekvence. S konečným počtem zhruba 50 sekvencí byly provedeny nejprve základní analýzy, detekující kompletnost kontigů, přítomnost signálního peptidu či transmembránové domény. Následovaly strukturní studie pro každou skupinu potencionálních inhibitorů koagulačních faktorů zvlášť.

Po prodělaných analýzách sekvencí kódující annexiny *E. nipponicum* s databází NCBI, byla predikována nejvyšší identita (%) annexinů tří organismů - *Microcotyle sebastis*, *Schistosoma japonicum* a *Clonorchis. sinensis*. Zatímco annexiny obecně u schistosom patří mezi hojně se vyskytující proteiny v tegmentu, kde chrání červa proti působení imunitního systému hostitele (Hofmann *et al.* 2010), u *M. sebastis* a *C. clonorchis* se o funkci stále jen spekuluje (He *et al.* 2014; Choi *et al.* 2009). Identifikovaný annexin z *M. sebastis* však prezentuje dosud jediný popsáný protein tohoto typu v rámci celé tř. Monogenea. Fylogenetickými analýzami byla prokázána shoda s annexiny schistosom a tasemnice *T. solium* (Choi *et al.* 2009), kde pouze v případě *T. solium* byly charakterizovány annexiny několik typů annexinů (B1, B2 a B3) zapojující se do antikoagulačních mechanismů. Tento vztah může vypovídat o potencionální antikoagulační aktivitě annexinu u *M. sebastis*, který mimo jiné vykazuje vysokou % identitu i s annexinem *E. nipponicum* (č. 63027).

K nejméně zastoupeným skupinám inhibitorů serinových proteáz z transkriptomových projektů patří serpiny. Bylo získáno pouze 5 sekvencí kódující serpiny. Ačkoliv se tato proteinová skupina řadí mezi významné inhibitory serinových proteáz, u většiny helmintů je jejich tendence inhibovat koagulačních faktorů nízká. Spíše než působení na koagulační

kaskádu se zapojují procesů do inhibice trávicích enzymů (Molehin, Gobert, *et* McManus, 2012). Antikoagulační serpiny nacházíme např. v rámci Diptera u komárů *Aedes sp.* (Stark *et* James 1998). Významnou skupinu inhibitorů serinových proteáz, která je od serpinů odvozená tvoří smalpiny. Patří ke skupině s vysokým zastoupením antikoagulačních faktorů u krevsajících helmintů. Jsou to malé proteiny okolo 100 AA, které charakterizují hlavní skupinu antikoagulantů u ancylostom a pijavek (Zang *et* Maizels 2001). Z transkriptomových dat *E. nipponicum* jsme nezískaly žádné proteiny řadící se k této proteinové skupině.

Další studovanou skupinou byly proteiny Kunitz typu. Prostřednictvím specifické Kunitz domény, která je tvořena třemi disulfidickými můstky a vysoce konzervovanými aminokyselinami ve specifických místech reaktivní smyčky, můžeme začlenění jednotlivé proteiny do bližších skupin inhibitorů. Je známo, že v P1 pozici trypsin-like inhibitorů je přítomen arginin (R) či lysin (K), u chymotrypsin-like inhibitorů je pro tuto pozici charakteristický leucin (L) nebo methionin (M). Přestože většina popsaných antikoagulantů Kunitz typu z krevsajících organismů obsahuje v P1 pozici Arg, existuje i řada výjimek, kde je AA v P1 pozici zcela netypická a přesto k inhibici koagulačních faktorů dochází. Příkladem může být antikoagulant ornithodorin z klíšťáka druhu *Ornithodoros moubata*, který má ve své P1 pozici aminokyselinu alanin (van de Locht *et al.* 1996). Vysoká variabilita aminokyselin v P1 se vyskytuje u tzv. toxinů Kunitz typu, fungující jako blokátory iontových kanálů. Pokud bychom měli shrnout situaci u Kunitz proteinů *E. nipponicum*, většina inhibitorů spadá mezi trypsin-like inhibitory, což může naznačovat zapojení funkce do antihemostatických dějů. Pouze u třech sekvencí z 15 jsme identifikovaly jiné AA, než jsou pro trypsin-like inhibitory typické. Největší zastoupení Kunitz - antikoagulačních faktorů nalezneme u klíšťat a klíšťáků (Ranasinghe *et* McManus 2013), kde k nejčastěji inhibovaným faktorům patří trombin. Popsané jsou nicméně i faktory inhibující FXa a komplex VII/TF (Francischetti *et al.* 2002).

Expresí rekombinantní Kunitz domény v bakteriálním systému *E. coli*

Na základě transkriptomových analýz jsme si k expresi rekombinantního proteinu vybraly Kunitz inhibitory. Mimo to, že Kunitz inhibitory patří mezi významné antikoagulanty u klíšťat a klíšťáků přispívá k tomu i skutečnost podobného mechanismu trávení krve klíšťat a třídy Monogenea. Expresí rekombinantního proteinu byla prováděna pouze na Kunitz doměně, která odpovídá za mechanismus inhibice tím, že svou reaktivní smyčku s vysoce konzervovanými AA váže do aktivních míst proteáz (Ranasinghe *et* McManus 2013). Zcela

běžně se dnes exprimuje v rekombinantní podobě pouze samotná doména (Clauss *et al.* 2011; Ranasinghe *et al.* 2015). Celková velikost domény se pohybuje v rozmezí 50-60 AA tedy s velmi nízkou molekulovou hmotností – 6 kDa.

Bakteriální expresní systému *E. coli* byl zvolen pro jednoduchost a vysoký výtěžek. Celá příprava rekombinantní domény probíhala dle tradičního postupu bez větších problémů. Nejasnosti se vyskytly až v momentě purifikace rekombinantní domény z inkluzních tělísek. Námí očekávaný produkt o velikosti cca 8 kDa (spolu s his-tagem) jsme nedetekovali. Velikost rekombinantního proteinu se vždy pohybovala v rozmezí 20-25 kDa. Exprese rekombinantí domény proběhla dohromady s třemi různými primery. První pokusy probíhaly s primery, jejichž součástí nebyla histidinová kotva. Na základě nespolehlivosti histag značení na nitrocelulózoové membráně, byly navrženy primery nové, jejichž součástí již histidinová kotva byla. Poslední námí navržené primery se lišily od předchozích přítomností rezervních nukleotidů z každé strany domény, pro případné nepřesnosti translace, které by mohla ovlivnit výslednou strukturu i aktivitu produktu, jelikož ysoce konzervované cysteiny zajišťují stabilizace celé domény (Macedo *et al.* 2007). Další možností bylo purifikovat protein v odlišném prostředí (redukujícím i nativním) či v přítomnosti zvyšující se koncentrace redukčního činidla (DTT-dithiothreitol), ovšem zcela bez efektu.

Jedno z vysvětlení vysoké hmotnosti produktu odkazuje na přítomnost tří disulfidických můstků v Kunitz doméně. Redukující pufr, který slouží k rozvolnění můstků, nemusí tuto na cysteiny bohatou doménu 100% rozvolnit. Částečné rozvolněná struktura spolu může tvořit oligomery obtížněji prostupující polyakrylamidovým gelem. Ovlivnit velikost výsledného produktu mohla ve výsledku i histidinová kotva, která je v poměru s Kunitz doménou (6 kDa) relativně velká (2 kDa).

Existuje však i případy, kdy námí navržený stop kodón je translačním aparátem *E. coli* nerozpoznán a translace proteinu tak pokračuje dále. Při translaci může docházet k nahrazení stop kodónu TGA za TAA či TAG (Sorensen *et al.* 1989, González *et al.* 2003). Námí navržené primery pro tvorbu rekombinací domény v *E. coli* stop kodón TGA obsahovaly.

Další použitý expresní systém byl eukaryotický kvasinkový systém *Pichia pastoris*. Výhody oproti *E. coli* jsou především ve způsobu sekrece rekombinačního proteinu. Kvasinky jsou schopny produkovat protein do růstového média, ve kterém dochází k následné purifikaci proteinu snazší cestou než v případě purifikace z inkluzních tělísek *E.*

coli. Ač se zdála exprese Kunitz domény v tomto expresním systému (viz kap.5.5) z důvodu degradace a kontaminace materiálu nebylo možné v rámci této práce expresi dokončit.

Závěr

Inhibiční aktivita u zástupců č. Diplozoidae byla potvrzena jednou z pěti měření. Nelze proto s jistotou tvrdit, který koagulační faktor č. Diplozoidae inhibuje. Výsledky pozitivního měření však naznačují, že by se mohlo jednat o inhibici trombinu i FXa. Při zvýšeném použitím množství proteinu v homogenátu jsme detekovali inhibiční aktivitu proti trombinu a částečnou inhibici FXa, v případě ESP částečnou inhibici obou faktorů.

Z transkriptomových projektů *E. nipponicum* jsme analyzovaly tři proteinové rodiny serinových proteáz - annexiny, serpiny a Kunitz proteiny, které by mohly být teoretickými kandidáty Na inhibitory serinových proteáz zapojeny do mechanismů. Příprava rekombinantních proteinů vybrané Kunitz proteinové rodiny se však nezdařila.

Použitá literatura

- Ascenzi, P. *et al.* 1995. "Proteinase Inhibitors from the European Medicinal Leech *Hirudo Medicinalis*: Structural, Functional and Biomedical Aspects." *Molecular aspects of medicine* 16(3):215–313
- Azar, Dany and André Nel. 2012. "Evolution of Hematophagy in 'non-Biting Midges' (Diptera: Chironomidae)." *Terrestrial Arthropod Reviews* 5(1):15–34.
- Blankenship D.T., Brankamp R.G., Manley G.D., Cardin A.D. 1990. Amino acid sequence of ghillanten: Anticoagulant-antimetastatic principle of the south American leech, *Haemaphysalis ghillanii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 166, Issue 3.
- Biomedicine, Tropical. 2014. "Morphological and Protein Analyses of Adult Female Salivary Glands of *Anopheles Barbirostris* Species A1 (Diptera : Culicidae)." 31(4):813–27.
- Bode, Wolfram and Robert Huber. 2000. "Structural Basis of the Endoproteinase-Protein Inhibitor Interaction." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477(1-2):241–52.
- Boeger, W. A., Kritsky, D. C.(2001): Phylogenetic relationships of the Monogeneoidea. In: Littlewood, D. T. J., Bray, R. A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 92–102.
- Braschi, Simon and R. Alan Wilson. 2006. "Proteins Exposed at the Adult Schistosome Surface Revealed by Biotinylation." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5(2):347–56.
- Buchmann, K. and Bresciani, J. (2006): Monogenea. In: WOO, P. T. K. (ed.): *Fish Diseases and Disorders*. Second Edition. Volume 1. Protozoan and Metazoan Infections. *CABI*, Wallingford, 297–344.
- Calvo, Eric *et al.* 2011. "Alboserpin, a Factor Xa Inhibitor from the Mosquito Vector of Yellow Fever, Binds Heparin and Membrane Phospholipids and Exhibits Antithrombotic Activity." *Journal of Biological Chemistry* 286(32):27998–10.
- Cappello, Michael, John M. Hawdon, Brian F. Jones, W. Poindexter Kennedy, and Peter J. Hotez. 1996. "Ancylostoma Caninum Anticoagulant Peptide: Cloning by PCR and Expression of Soluble, Active Protein in *E. Coli*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(1):113–17.
- Cappello, Michael *et al.* 1996. "Ancylostoma Caninum Anticoagulant Peptide: Cloning by PCR and Expression of Soluble, Active Protein in *E. Coli*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(1): 113–17.
- Clarke, E.P., Cates, G.A., Ball, E.H., and Sanwal, B.D. 1991. A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 266: 17230–17235.

Corral-Rodríguez, María Ángeles, Sandra Macedo-Ribeiro, Pedro José Barbosa Pereira, and Pablo Fuentes-Prior. 2009. "Tick-Derived Kunitz-Type Inhibitors as Antihemostatic Factors." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(9):579–95.

Davie, E. W., K. Fujikawa, and W. Kisiel. 1991. "The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation." *Biochemistry* 30(43):10363–70.

De la Torre-Escudero, Eduardo *et al.* 2012. "Molecular and Functional Characterization of a Schistosoma Bovis Annexin: Fibrinolytic and Anticoagulant Activity." *Veterinary Parasitology* 184(1):25–36. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.013>).

Del Valle, Antonio, Brian F. Jones, Lisa M. Harrison, Robert C. Chadderdon, and Michael Cappello. 2003. "Isolation and Molecular Cloning of a Secreted Hookworm Platelet Inhibitor from Adult Ancylostoma Caninum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 129(2):167–77.

Ghendler, Y., Arnon, R. and Fishelson, Z. (1994). Schistosoma mansoni: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. *Experimental Parasitology* 78, 121–131. doi: S0014-4894(84)71013-7.

Gils, A. and Declerck, P. J. (1998). Structure-function relationships in

González, Beatriz, Fabrizio Ceciliani, and Alessandro Galizzi. 2003. "Growth at Low Temperature Suppresses Readthrough of the UGA Stop Codon during the Expression of Bacillus Subtilis flgM Gene in Escherichia Coli." *Journal of Biotechnology* 101(2):173–80.

Halton, D. W. (1997): Nutritional Adaptations to Parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* 27, 693–704.

Hodová, Iveta, Iveta Matejusova, and Milan Gelnar. 2010. "The Surface Topography of Eudiplozoon Nipponicum (Monogenea) Developmental Stages Parasitizing Carp (Cyprinus Carpio L.)." *Central European Journal of Biology* 5(5):702–9.

Chand, Hitendra S., Amy E. Schmidt, S. Paul Bajaj, and Walter Kisiel. 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): 17500–507.

Choi, Seung Hyuk, Se Ryun Kwon, Eun Hye Lee, and Ki Hong Kim. 2009. "Molecular Cloning, Functional Characterization and Localization of an Annexin from a Fish Gill Fluke Microcotyle Sebasitis (Platyhelminthes: Monogenea)." *Molecular and Biochemical Parasitology* 163(1):48–53.

Chmelar, Jindrich, Eric Calvo, Joao H. F. Pedra, Ivo M. B. Francischetti, and Michail Kotsyfakis. 2012. "Tick Salivary Secretion as a Source of Antihemostatics." *Journal of Proteomics* 75(13):3842–54. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026>).

Falco, Alberto, Jamie R. Cartwright, Geert F. Wiegertjes, and David Hoole. 2012. "Molecular Characterization and Expression Analysis of Two New C-Reactive Protein Genes from

Common Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Developmental and Comparative Immunology* 37(1):127–38. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.10.005>).

Biomedicine, Tropical. 2014. “Morphological and Protein Analyses of Adult Female Salivary Glands of *Anopheles Barbirostris* Species A1 (Diptera : Culicidae).” 31(4):813–27.

Cappello, Michael, John M. Hawdon, Brian F. Jones, W. Poindexter Kennedy, and Peter J. Hotez. 1996. “*Ancylostoma Caninum* Anticoagulant Peptide: Cloning by PCR and Expression of Soluble, Active Protein in *E. Coli*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(1):113–17.

Ciprandi, Alessandra, Fabiana Horn, and Carlos Termignoni. 2003. “Saliva de Animais Hematófagos: Fonte de Novos Anticoagulantes.” *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 25(4):250–62.

Clauss, Adam, Margareta Persson, Hans Lilja, and Åke Lundwall. 2011. “Three Genes Expressing Kunitz Domains in the Epididymis Are Related to Genes of WFDC-Type Protease Inhibitors and Semen Coagulum Proteins in Spite of Lacking Similarity between Their Protein Products.” *BMC Biochemistry* 12(1):55. Retrieved (<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/55>).

Collin, Nicolas *et al.* 2012. “NIH Public Access.” 32(9):2185–98.

Fessler, John H., Irina Kramerova, Andrei Kramerov, Yali Chen, and Liselotte I. Fessler. 2004. “Papilin, a Novel Component of Basement Membranes, in Relation to ADAMTS Metalloproteases and ECM Development.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(6):1079–84.

González, Beatriz, Fabrizio Cecilian, and Alessandro Galizzi. 2003. “Growth at Low Temperature Suppresses Readthrough of the UGA Stop Codon during the Expression of *Bacillus Subtilis* flgM Gene in *Escherichia Coli*.” *Journal of Biotechnology* 101(2):173–80.

He, Lei *et al.* 2014. “Biochemical and Immunological Characterization of Annexin B30 from *Clonorchis Sinensis* Excretory/secretory Products.” *Parasitology Research* 113(7):2743–55. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3935-4>).

Hofmann, Andreas *et al.* 2010. “Parasite Annexins - New Molecules with Potential for Drug and Vaccine Development.” *BioEssays* 32(11):967–76.

Choi, Seung Hyuk, Se Ryun Kwon, Eun Hye Lee, and Ki Hong Kim. 2009. “Molecular Cloning, Functional Characterization and Localization of an Annexin from a Fish Gill Fluke *Microcotyle Sebastis* (Platyhelminthes: Monogenea).” *Molecular and Biochemical Parasitology* 163(1):48–53.

Ibrahim, Mahmoud a, Abdel-hady M. Ghazy, Tahany M. Maharem, and Mohamed I. Khalil. 2001. “Factor Xa Ž FXa / Inhibitor from the Nymphs of the Camel Tick *Hyalomma Dromedarii*.”

Jiang, Desheng *et al.* 2011. “Ac-AP-12, a Novel Factor Xa Anticoagulant Peptide from the Esophageal Glands of Adult *Ancylostoma Caninum*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 177(1):42–48. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.01.008>).

De la Torre-Escudero, Eduardo *et al.* 2012. “Molecular and Functional Characterization of a *Schistosoma Bovis* Annexin: Fibrinolytic and Anticoagulant Activity.” *Veterinary Parasitology* 184(1):25–36. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.013>).

Macedo, Maria Lígia Rodrigues, Viviane Alves Garcia, Maria das Graças M. Freire, and Michael Richardson. 2007. “Characterization of a Kunitz Trypsin Inhibitor with a Single Disulfide Bridge from Seeds of *Inga Laurina* (SW.) Willd.” *Phytochemistry* 68(8):1104–11

Sorensen, Michael A. C. G. Kurland² and Steen Pedersen’ Codon Usage Determines Translation Rate in *Escherichia coli*’ Institute of Microbiology, University of Copenhagen Oster Farimagsgade 2A, DK-1353 Copenhagen, Denmark Department of Molecular Biology University of Uppsala, Biomedical Center Box 590, S-75124,

Molehin, Adebayo J., Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McMANUS. 2012. “Serine Protease Inhibitors of Parasitic Helminths.” *Parasitology* 139(06):681–95.

Pereira, M. H. *et al.* 1996. “Anticoagulant Activity of *Triatoma Infestans* and *Panstrongylus Megistus* Saliva (hemiptera/triatominae).” *Acta Tropica* 61(3):255–61.

Ranasinghe, Shiwanthi L., Katja Fischer, Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McManus. 2015. “Functional Expression of a Novel Kunitz Type Protease Inhibitor from the Human Blood Fluke *Schistosoma Mansoni*.” *Parasites & Vectors* 8(1):408. Retrieved (<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/408>).

Ranasinghe, Shiwanthi and Donald P. McManus. 2013. “Structure and Function of Invertebrate Kunitz Serine Protease Inhibitors.” *Developmental and Comparative Immunology* 39(3):219–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.005>).

Salzet, Michel. 2001. “Anticoagulants and Inhibitors of Platelet Aggregation Derived from Leeches.” *FEBS Letters* 492(3):187–92.

Stark, K. R. and a James. 1998. “Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes Aegypti*.” *The Journal of biological chemistry* 273(33):20802–9.

Stark, Kenneth and Anthony a. James. 1996. “Anticoagulants in Vector Arthropods.” *Parasitology Today* 12(11):430–37.

Watanabe, Renata M. O., Anita M. Tanaka-Azevedo, Mariana S. Araujo, Maria a. Juliano, and Aparecida S. Tanaka. 2011. “Characterization of Thrombin Inhibitory Mechanism of rAaTI, a Kazal-Type Inhibitor from *Aedes Aegypti* with Anticoagulant Activity.” *Biochimie* 93(3):618–23. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.006>).

Zang, X. and R. M. Maizels. 2001. “Serine Proteinase Inhibitors from Nematodes and the Arms Race between Host and Pathogen.” *Trends in biochemical sciences* 26(3):191–97.

Figueiredo, Ana C. *et al.* 2012. “Unique Thrombin Inhibition Mechanism by Anophelin, an Anticoagulant from the Malaria Vector.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(52):E3649–58. Retrieved

Francischetti I.M., Valenzuela J.G., Andersen J.F., Mather T.N., Ribeiro J.M., 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): 3602-12.

Electricwala A., Sawyer R.T., Jones C.P., Atkinson T., 1991. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, Volume 2, Issue 1, pp. 83–89.

Gao, Y.J., Yan, H.L., Ding, F.X., Lu, Y.M., Sun, S.H., 2007. Annexin B1 at the host–parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: secreted and associated with inflammatory reaction. *Acta Trop.* 101, 192–199.

Castro-Borges, W., Dowle, A., Curwen, R.S., Thomas-Oates, J., Wilson, R.A., 2011. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e993.

Ciprandi, Horn, and Termignoni 2003) *Biomedicine, Tropical*. 2014. “Morphological and Protein Analyses of Adult Female Salivary Glands of *Anopheles Barbirostris* Species A1 (Diptera : Culicidae).” 31(4):813–27.

Cappello, Michael, John M. Hawdon, Brian F. Jones, W. Poindexter Kennedy, and Peter J. Hotez. 1996. “*Ancylostoma Caninum* Anticoagulant Peptide: Cloning by PCR and Expression of Soluble, Active Protein in *E. Coli*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(1):113–17.

Ciprandi, Alessandra, Fabiana Horn, and Carlos Termignoni. 2003. “Saliva de Animais Hematófagos: Fonte de Novos Anticoagulantes.” *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 25(4):250–62.

Clauss, Adam, Margareta Persson, Hans Lilja, and Åke Lundwall. 2011. “Three Genes Expressing Kunitz Domains in the Epididymis Are Related to Genes of WFDC-Type Protease Inhibitors and Semen Coagulum Proteins in Spite of Lacking Similarity between Their Protein Products.” *BMC Biochemistry* 12(1):55. Retrieved (<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/55>).

Collin, Nicolas *et al.* 2012. “NIH Public Access.” 32(9):2185–98.

Fessler, John H., Irina Kramerova, Andrei Kramerov, Yali Chen, and Liselotte I. Fessler. 2004. “Papilin, a Novel Component of Basement Membranes, in Relation to ADAMTS Metalloproteases and ECM Development.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(6):1079–84.

González, Beatriz, Fabrizio Ceciliani, and Alessandro Galizzi. 2003. "Growth at Low Temperature Suppresses Readthrough of the UGA Stop Codon during the Expression of Bacillus Subtilis flgM Gene in Escherichia Coli." *Journal of Biotechnology* 101(2):173–80.

He, Lei *et al.* 2014. "Biochemical and Immunological Characterization of Annexin B30 from Clonorchis Sinensis Excretory/secretory Products." *Parasitology Research* 113(7):2743–55. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3935-4>).

Hofmann, Andreas *et al.* 2010. "Parasite Annexins - New Molecules with Potential for Drug and Vaccine Development." *BioEssays* 32(11):967–76.

Choi, Seung Hyuk, Se Ryun Kwon, Eun Hye Lee, and Ki Hong Kim. 2009. "Molecular Cloning, Functional Characterization and Localization of an Annexin from a Fish Gill Fluke Microcotyle Sebastis (Platyhelminthes: Monogenea)." *Molecular and Biochemical Parasitology* 163(1):48–53.

Ibrahim, Mahmoud a, Abdel-hady M. Ghazy, Tahany M. Maharem, and Mohamed I. Khalil. 2001. "Factor Xa Ž FXa / Inhibitor from the Nymphs of the Camel Tick Hyalomma Dromedarii."

Jiang, Desheng *et al.* 2011. "Ac-AP-12, a Novel Factor Xa Anticoagulant Peptide from the Esophageal Glands of Adult Ancylostoma Caninum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 177(1):42–48. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.01.008>).

De la Torre-Escudero, Eduardo *et al.* 2012. "Molecular and Functional Characterization of a Schistosoma Bovis Annexin: Fibrinolytic and Anticoagulant Activity." *Veterinary Parasitology* 184(1):25–36. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.013>).

Macedo, Maria Lígia Rodrigues, Viviane Alves Garcia, Maria das Graças M. Freire, and Michael Richardson. 2007. "Characterization of a Kunitz Trypsin Inhibitor with a Single Disulfide Bridge from Seeds of Inga Laurina (SW.) Willd." *Phytochemistry* 68(8):1104–11.

Molehin, Adebayo J., Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McMANUS. 2012. "Serine Protease Inhibitors of Parasitic Helminths." *Parasitology* 139(06):681–95.

Pereira, M. H. *et al.* 1996. "Anticoagulant Activity of Triatoma Infestans and Panstrongylus Megistus Saliva (hemiptera/triatominae)." *Acta Tropica* 61(3):255–61.

Ranasinghe, Shiwanthi L., Katja Fischer, Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McManus. 2015. "Functional Expression of a Novel Kunitz Type Protease Inhibitor from the Human Blood Fluke Schistosoma Mansoni." *Parasites & Vectors* 8(1):408. Retrieved (<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/408>).

Ranasinghe, Shiwanthi and Donald P. McManus. 2013. "Structure and Function of Invertebrate Kunitz Serine Protease Inhibitors." *Developmental and Comparative Immunology* 39(3):219–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.005>).

Salzet, Michel. 2001. "Anticoagulants and Inhibitors of Platelet Aggregation Derived from Leeches." *FEBS Letters* 492(3):187–92.

- Stark, K. R. and a a James. 1998. "Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes Aegypti*." *The Journal of biological chemistry* 273(33):20802–9.
- Stark, Kenneth and Anthony a. James. 1996. "Anticoagulants in Vector Arthropods." *Parasitology Today* 12(11):430–37.
- Watanabe, Renata M. O., Anita M. Tanaka-Azevedo, Mariana S. Araujo, Maria a. Juliano, and Aparecida S. Tanaka. 2011. "Characterization of Thrombin Inhibitory Mechanism of rAaTI, a Kazal-Type Inhibitor from *Aedes Aegypti* with Anticoagulant Activity." *Biochimie* 93(3):618–23. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.006>).
- Zang, X. and R. M. Maizels. 2001. "Serine Proteinase Inhibitors from Nematodes and the Arms Race between Host and Pathogen." *Trends in biochemical sciences* 26(3):191–97.
- Gettins, Peter G. W. and Viral Serpins. 2002. "Serpins Structure , Mechanism , and Function."
- González, Silvia *et al.* 2009. "A Family of Diverse Kunitz Inhibitors from *Echinococcus Granulosus* Potentially Involved in Host-Parasite Cross-Talk." *PLoS ONE* 4(9).
- Greinacher, a and N. Lubenow. 2001. "Recombinant Hirudin in Clinical Practice: Focus on Lepirudin." *Circulation* 103(10):1479–84.
- Grzesiak, a *et al.* 2000. "Substitutions at the P(1) Position in BPTI Strongly Affect the Association Energy with Serine Proteinases." *Journal of molecular biology* 301(1):205–17.
- Hawdon, John M., Bennett Datu, and Melissa Crowell. 2003. "Molecular Cloning of a Novel Multidomain Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Hookworm *Ancylostoma Caninum*." *The Journal of parasitology* 89(2):402–7.
- Hellmann K., Hawkins R.I. 1964. Anticoagulant and fibrinolytic activites from *Rhodnius prolixus*. *Nature*, 201:1008-9.EL
- Dalton, J. P., Neil, S. O., Stack, C., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maoule, A. G., Donnelly, S. M. (2003): *Fasciola hepatica* cathepsin L-like: biology, function and potencial in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal of Parasitology* 33, 1173-1181.
- Dzik, Jolanta M. 2006. "Molecules Released by Helminth Parasites Involved in Host Colonization." *Acta Biochimica Polonica* 53(1):33–64.
- 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*. Volume 57, Issue 2.

Gan, Weiqiong *et al.* 2009. "An Anticoagulant Peptide from the Human Hookworm, *Ancylostoma Duodenale* That Inhibits Coagulation Factors Xa and XIa." *FEBS Letters* 583(12):1976–80. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.009>).

Gerke *et Mosserke*, Volker and Stephen E. Moss. 2002. "Annexins : From Structure to Function." 331–71.

Hammond, G.L., Smith, C.L., Goping, I.S., Underhill, D.A., Harley, M.J., Reventos, J., Musto, N.A., Gunsalus, G.L., and Bardin, C.W. 1987. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5153–5157

Heemskerk, Johan W. M., Edouard M. Bevers, and Theo Lindhout. 2002. "Platelet Activation and Blood Coagulation." *Thrombosis and haemostasis* 88(2):186–93.

Irving, James a., Robert N. Pike, Arthur M. Lesk, and James C. Whisstock. 2000. "Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function." *Genome Research* 10(12):1845–64.

Jedličková, Lucie, "UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Přírodovědecká Fakulta Katedra Parazitologie Studijní Program : Biologie Studijní Obor : Parazitologie Bc . Lucie Jedličková Peptidázy Monogeneí Čeledi Diplozoidae Peptidases of Monogeneans of the Family Diplozoidae DIPLOMOVÁ PR."

Jiang, Desheng *et al.* 2011. "Ac-AP-12, a Novel Factor Xa Anticoagulant Peptide from the Esophageal Glands of Adult *Ancylostoma Caninum*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 177(1):42–48.

Kang, J. M., Sohn, W. M., Ju, J.W., Kim, T. S. and Na, B. K. (2010). Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis*. *Acta Tropica* 116, 134–140. doi: S0001-706X(10)00180-4 [pii]

Kramerova, I. a *et al.* 2000. "Papilin in Development; a Pericellular Protein with a Homology to the ADAMTS Metalloproteinases." *Development (Cambridge, England)* 127(24):5475–85.

Kooyman, Frans N. J., Bas W. M. van Balkom, Erik de Vries, and Jos P. M. van Putten. 2009. "Identification of a Thrombospondin-like Immunodominant and Phosphorylcholine-Containing Glycoprotein (GP300) in *Dictyocaulus Viviparus* and Related Nematodes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 163(2):85–94.

Knox, D. P. 2007. "Proteinase Inhibitors and Helminth Parasite Infection." *Parasite Immunology* 29(2):57–71.

Lai R., Takeuchia H., Jonczyk J., Reesa H.H., Turner P.C. 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene*. Volume 342, Issue 2.

Laskowski Jr., M., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49,593–626.

Lee, Joon Ha *et al.* 2010. "Characterization of Kunitz-Type Protease Inhibitor Purified from Hemolymph of *Galleria Mellonella* Larvae." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(12):873–82.

Liaoa M., Zhou J., Gong H., Boldbaatar D., Shirafujia R., Battura B., Nishikawa Y., Fujisaki K. 2009. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 55, Issue 2.

Oktarianti, Rike, Kartika Senjarini, Toshiya Hayano, Fatchiyah Fatchiyah, and Aulanni'am. 2015. "Proteomic Analysis of Immunogenic Proteins from Salivary Glands of *Aedes Aegypti*." *Journal of Infection and Public Health*. Retrieved.

Osterud, B. and S. I. Rapaport. 1977. "Activation of Factor IX by the Reaction Product of Tissue Factor and Factor VII: Additional Pathway for Initiating Blood Coagulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5260–64.

Paesen, Guido C. *et al.* 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):734–47.

Page, Antony P., Gillian McCormack, and Andrew J. Birnie. 2006. "Biosynthesis and Enzymology of the *Caenorhabditis Elegans* Cuticle: Identification and Characterization of a Novel Serine Protease Inhibitor." *International Journal for Parasitology* 36(6): 681–89.

Pecka M. *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-00-5.

Pecka, Miroslav. 2004. *Laboratorní Hematologie v*.

Peigneur, Steve *et al.* 2011. "A Bifunctional Sea Anemone Peptide with Kunitz Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties." *Biochemical Pharmacology* 82(1):81–90.

Prevot PP, Beschin A, Lins L, *et al.* Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick, *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 2009;276(12):3235–3246.

Macedo-Ribeiro S., Almeida C., Calisto B.M., Friedrich T., Mentele R., Stürzebecher J., Fuentes-Prior P.,

Pereira P.J. 2008. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type

proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One*, 3(2): e1624.

Malý, J. and Klíèová Slova. 2003. "WARFARINEM VE VYŠŠÍM VĚKU." 8–11.

Mann, Kenneth G., Kathleen Brummel-Ziedins, Thomas Orfeo, and Saulius Butenas. 2006. "Models of Blood Coagulation." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36(2):108–17.

- Mann, Kenneth G., Saulius Butenas, and Kathleen Brummel. 2003. "The Dynamics of Thrombin Formation." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(1):17–25.
- Mans J. Ben, Andersena J.F., Schwan Tom, Ribeiro J.M.C. 2007. 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: 22–41.
- Markwardt, B. Kaiser, M. Richter. 1992. Haemostyptic effects of batroxobin with regard to hirudin treatment. *Thrombosis Research* Volume 68, Issue 6, 475–482
- Matejusová, I., B. Koubkova, S. D'Amelio, and C. O. Cunningham. 2001. "Genetic Characterization of Six Species of Diplozoids (Monogenea; Diplozoidae)." *Parasitology* 123(Pt 5):465–74.
- Merckelbach, A. and Ruppel, A. (2007). Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156, 84–88. doi: S0166-6851(07)00216-2 [pii]
- Mieszczanek, Juliusz, Lisa M. Harrison, and Michael Cappello. 2004. "Ancylostoma Ceylanicum Anticoagulant Peptide-1: Role of the Predicted Reactive Site Amino Acid in Mediating Inhibition of Coagulation Factors Xa and VIIa." *Molecular and Biochemical Parasitology* 137(1):151–59.
- Millers, E. K. I. *et al.* 2009. "Crystal Structure of Textilinin-1, a Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor from the Venom of the Australian Common Brown Snake (*Pseudonaja Textilis*)." *FEBS Journal* 276(11):3163–75.
- Milstone, Aaron M. *et al.* 2000. "A Broad Spectrum Kunitz Type Serine Protease Inhibitor Secreted by the Hookworm *Ancylostoma Ceylanicum*." *Journal of Biological Chemistry* 275(38): 29391–99.
- Moss, Stephen E. and Reg O. Morgan. 2004. "The Annexins." *Genome biology* 5(4):219.
- Molehin, Adebayo J., Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McMANUS. 2012. "Serine Protease Inhibitors of Parasitic Helminths." *Parasitology* 139(06):681–95.
- Mulvenna, J., Sripa, B., Brindley, P.J., Gorman, J., Jones, M.K., Colgrave, M.L., Jones, A., Nawaratna, S., Laha, T., Suttiprapa, S., Smout, M.J., Loukas, A., 2010b. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics* 10,1063–1078.
- Nagano, I., Wu, Z., Nakada, T., Matsuo, A. and Takahashi, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase inhibitor from *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 123, 77–83.

Nutt M.E., Jain D., Lenny B.A., Schaffer L., Siegl P.K., Dunwiddie Ch., T. 1991. Purification and characterization of recombinant antistasin: A leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 285, Issue 1.

Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2007. Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp. Parasitol.* 115, 83–91. *Biomedicine, Tropical.* 2014. “Morphological and Protein Analyses of Adult Female Salivary Glands of Anopheles Barbirostris Species A1 (Diptera : Culicidae).” 31(4):813–27.

Cappello, Michael, John M. Hawdon, Brian F. Jones, W. Poindexter Kennedy, and Peter J. Hotez. 1996. “Ancylostoma Caninum Anticoagulant Peptide: Cloning by PCR and Expression of Soluble, Active Protein in E. Coli.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(1):113–17.

Ciprandi, Alessandra, Fabiana Horn, and Carlos Termignoni. 2003. “Saliva de Animais Hematófagos: Fonte de Novos Anticoagulantes.” *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 25(4):250–62.

Clauss, Adam, Margareta Persson, Hans Lilja, and Åke Lundwall. 2011. “Three Genes Expressing Kunitz Domains in the Epididymis Are Related to Genes of WFDC-Type Protease Inhibitors and Semen Coagulum Proteins in Spite of Lacking Similarity between Their Protein Products.” *BMC Biochemistry* 12(1):55. Retrieved (<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/55>).

Collin, Nicolas *et al.* 2012. “NIH Public Access.” 32(9):2185–98.

Fessler, John H., Irina Kramerova, Andrei Kramerov, Yali Chen, and Liselotte I. Fessler. 2004. “Papilin, a Novel Component of Basement Membranes, in Relation to ADAMTS Metalloproteases and ECM Development.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(6):1079–84.

González, Beatriz, Fabrizio Ceciliani, and Alessandro Galizzi. 2003. “Growth at Low Temperature Suppresses Readthrough of the UGA Stop Codon during the Expression of Bacillus Subtilis flgM Gene in Escherichia Coli.” *Journal of Biotechnology* 101(2):173–80.

He, Lei *et al.* 2014. “Biochemical and Immunological Characterization of Annexin B30 from Clonorchis Sinensis Excretory/secretory Products.” *Parasitology Research* 113(7):2743–55. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3935-4>).

Hofmann, Andreas *et al.* 2010. “Parasite Annexins - New Molecules with Potential for Drug and Vaccine Development.” *BioEssays* 32(11):967–76.

Choi, Seung Hyuk, Se Ryun Kwon, Eun Hye Lee, and Ki Hong Kim. 2009. “Molecular Cloning, Functional Characterization and Localization of an Annexin from a Fish Gill Fluke Microcotyle Sebastis (Platyhelminthes: Monogenea).” *Molecular and Biochemical Parasitology* 163(1):48–53.

- Ibrahim, Mahmoud a, Abdel-hady M. Ghazy, Tahany M. Maharem, and Mohamed I. Khalil. 2001. "Factor Xa Ž FXa / Inhibitor from the Nymphs of the Camel Tick Hyalomma Dromedarii."
- Jiang, Desheng *et al.* 2011. "Ac-AP-12, a Novel Factor Xa Anticoagulant Peptide from the Esophageal Glands of Adult Ancylostoma Caninum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 177(1):42–48. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.01.008>).
- De la Torre-Escudero, Eduardo *et al.* 2012. "Molecular and Functional Characterization of a Schistosoma Bovis Annexin: Fibrinolytic and Anticoagulant Activity." *Veterinary Parasitology* 184(1):25–36. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.013>).
- Macedo, Maria Lígia Rodrigues, Viviane Alves Garcia, Maria das Graças M. Freire, and Michael Richardson. 2007. "Characterization of a Kunitz Trypsin Inhibitor with a Single Disulfide Bridge from Seeds of Inga Laurina (SW.) Willd." *Phytochemistry* 68(8):1104–11.
- Molehin, Adebayo J., Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McMANUS. 2012. "Serine Protease Inhibitors of Parasitic Helminths." *Parasitology* 139(06):681–95.
- Pereira, M. H. *et al.* 1996. "Anticoagulant Activity of Triatoma Infestans and Panstrongylus Megistus Saliva (hemiptera/triatominae)." *Acta Tropica* 61(3):255–61.
- Ranasinghe, Shiwanthi L., Katja Fischer, Geoffrey N. Gobert, and Donald P. McManus. 2015. "Functional Expression of a Novel Kunitz Type Protease Inhibitor from the Human Blood Fluke Schistosoma Mansoni." *Parasites & Vectors* 8(1):408. Retrieved (<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/408>).
- Ranasinghe, Shiwanthi and Donald P. McManus. 2013. "Structure and Function of Invertebrate Kunitz Serine Protease Inhibitors." *Developmental and Comparative Immunology* 39(3):219–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.005>).
- Salzet, Michel. 2001. "Anticoagulants and Inhibitors of Platelet Aggregation Derived from Leeches." *FEBS Letters* 492(3):187–92.
- Stark, K. R. and a a James. 1998. "Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, Aedes Aegypti." *The Journal of biological chemistry* 273(33):20802–9.
- Stark, Kenneth and Anthony a. James. 1996. "Anticoagulants in Vector Arthropods." *Parasitology Today* 12(11):430–37.
- Watanabe, Renata M. O., Anita M. Tanaka-Azevedo, Mariana S. Araujo, Maria a. Juliano, and Aparecida S. Tanaka. 2011. "Characterization of Thrombin Inhibitory Mechanism of rAaTI, a Kazal-Type Inhibitor from Aedes Aegypti with Anticoagulant Activity." *Biochimie* 93(3):618–23. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.006>).
- Zang, X. and R. M. Maizels. 2001. "Serine Proteinase Inhibitors from Nematodes and the Arms Race between Host and Pathogen." *Trends in biochemical sciences* 26(3):191–97.

Stark, Kenneth and Anthony a. James. 1996. "Anticoagulants in Vector Arthropods." *Parasitology Today* 12(11):430–37.

Stanley, P. and Stein, P. E. (2003). BmSPN2, a serpin secreted by the filarial nematode *Brugia malayi*, does not inhibit human neutrophil proteinases but plays a noninhibitory role. *Biochemistry* 42, 6241–6248. doi: 10.1021/bi0271650

Stassens P., Bergum P.W., Gansemans Y., Jespers L., Laroche Y., Huang S., Maki S., Messens J., Lauwereys,

M., Cappello M., Hotez P.J., Lasters I., Vlasuk G.P. 1996. Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(5): 2149–2154.

Stein PE, Carrell RW. *Nat Struct Biol*. 1995 Feb;2(2):96-113. Review.

Stubbs, M. T. and W. Bode. 1995. "Structure and Specificity in Coagulation and Its Inhibition." *Trends in Cardiovascular Medicine* 5(4):157–66.

Subhasish, Sahoo, Dash Kiran Kaushik, Sahu Amita, Sahu Debasish, and Sahoo Sabita. 2010. "Haemostasis : An Overview." 2(1):437–51.

Šlechtová J. Hemostáza – jak ji možná neznáme. 2007. *Klin. Biochem. Metab.*, 15 (36), p. 97–101.

Tavares-Dias, Marcos. 2009. "A Review of the Blood Coagulation System of Fish." *R. bras. Bioci. / Brazilian Journal of Biosciences* 7(2):205–24. Retrieved (<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewArticle/1144>).

Tsujimoto, Hitoshi *et al.* 2012. "Simukunin from the Salivary Glands of the Black Fly *Simulium vittatum* Inhibits Enzymes That Regulate Clotting and Inflammatory Responses." *PLoS ONE* 7(2).

Valigurová, Andrea, Iveta Hodová, Radim Sonnek, Božena Koubková, and Milan Gelnar. 2011. "Eudiplozoon nipponicum in Focus: Monogenean Exhibiting a Highly Specialized Adaptation for Ectoparasitic Lifestyle." *Parasitology Research* 108(2):383–94.

Van de Locht, 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? *The Embo Journal*. 15(22): 6011–6017.

Van Gent, Diana, Paul Sharp, Kevin Morgan, and Noor Kalsheker. 2003. "Serpins: Structure, Function and Molecular Evolution." *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(11):1536–47.

VODRÁŽKA, Zdeněk; RAUSCH, Pavel; KÁŠ, Jan. *Enzymologie*. [s.l.] : VŠCHT v Praze, 1998.

Wang, KaiHui *et al.* 2006. "Molecular Characterization and Anticoagulant Activity of a Novel Annexin Derived from the *Taenia solium*." *Acta Tropica* 99(2-3):165–72.

Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP. Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Is a Novel Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *Biological Chemistry Department, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, West Point, PA 19486. Science* Vol. 248 no. 4955 pp. 593-596

Xu X., Yang H., Ma D., Wu J., Wang Y., Song Y., Wang X., Lu Y., Yang J., Lai R. 2008. Toward an Understanding of the Molecular Mechanism for Successful Blood Feeding by Coupling Proteomics Analysis with Pharmacological Testing of Horsefly Salivary Glands. *Molecular & Cellular Proteomics* 7.3.

Yan, H.L., Sun, S.H., Chen, R.W., Guo, Y.J., 2002. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*. *Mol. Biochem. Parasit.* 119, 1–5.

Yi, Daosheng, Lixin Xu, Ruofeng Yan, and Xiangrui Li. 2010. “Haemonchus Contortus: Cloning and Characterization of Serpin.” *Experimental Parasitology* 125(4):363–70. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.002>).

Yuan, Chun Hua *et al.* 2008. “Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas.” *PLoS ONE* 3(10).

Zhao, Ruiming *et al.* 2011. “SdPI, the First Functionally Characterized Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from Scorpion Venom.” *PLoS ONE* 6(11).

Zurawski, T. H., Mousley, A., Mair, G. R., Brennan, G. P., Maule, A. G., Gelnar, M. and Halton, D. W. (2001): Immunomicroscopical observations on the nervous system of adult *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae). *International Journal for Parasitology* 31,783–792.

Zurawski, T. H., Mousley, A., Maule, A. G., Gelnar, M. and Halton, D. W. (2003): Cytochemical studies of the neuromuscular system of the diporpa and juvenile stages of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae). *Parasitology* 126, 349–357.

Příloha 1. - Kompletní sekvence Kunitz-type proteinů *E. nipponicum*

- tučným písmem je vyznačen **START** a **STOP** kodon,
- žlutě jsou označené Kunitz domény s konzervovanými AA (**P1**, **P1'** a **P18**)

1) kontig 6019

1	ATG gtcaataattttaattttatttacggcattgattgtccttggttagctgcgctttggatt M V N N F N L F T A L I V L V V A A L W I
63	tccaaggcaactgcaagtccactatcatcttgtcaactgccccaaattgtcggatgtgcaga S K A T A S P L S S C Q L P Q I V G M C R
126	gcgagttttcctcgattctattttgatgggaaaaatgcacagaattcatttatggaggctgt A S F P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C
189	ggggaaatgcaaacaattttcagacgaaagcggaatgcgagtcaacctgtccagtgtctttaa G E M Q T I F R R K R N A S Q P V Q C F K
252	gagaaatgtaaatacaatatcataccggaaatgctcgtcaactttatattTAG E K C K S N I I P E I C R Q L Y I * 303

2) kontig 558

1	ATG agtgggtggagtaccgaaatttccttctggtgggtcaaatgagtgggtgatgaacccaaaatg M S G G V P K F P S G G Q M S G D E P K M
63	cgcttgggtgagccaatgagtgggtgatgaacctaaaatgcttcttggtcagccaatgatgggt R L G E P M S G D E P K M R L G Q P M S G
126	ggagcacataaaatttcttcttgagatcaaatgagtgggtgaagtacctaatttcttcttgat G A H K F L L G D Q M S G E V P K F L L D
189	ggtcaaaacaactgcaagtccactatcaacttgtcaactgccccaaatggcggatgtgcaaa G Q T T A S P L S T C Q L P K M V G M C K
252	gcgagttttcctcgattctattttgatgggaaaaatgcacagaattcatttatggaggctgt A S F P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C
315	gggggaaatgcaaacaattttcagacgaaagcggaatgcgagtcaacctgtccagtgtt TAA G G N A N N F Q T K A E C E S T C P V L *
	375

3) kontig 60883

1	<u>ATG</u> gcgggtaatttgatattatctgcagcattgattttctttatcgttactgtgatttgatt M A G N L Y L S A A L I F F I V T V I W I
63	gccgaagctcgcattgtgtttaggagaaggcaagaatctcagaccgatagttctttactccca A E A R I V F R R R Q E S Q T D S S L L P
126	ctgcctgaacaacatgaaccttcaagacgtccagtaccactatcagaacaggagacaaattac L P E Q H E P S R R P V P L S E Q E T N Y
189	aataatgacggcaggtttacaacaccaatgatgattcgaattcagcacgtatacaaagtaat N N D G R F T T P N M I R I Q H A I Q S N
252	atatcatgggattcaatcatggatggaggcaaaccaggggaaatttttcggtaaaagaagtg I S W D S I M D G G K P R G N F S V K E V
315	gctgattggctcaatttacttctcaaaatgccgacaacaccatcagcagtgacgactgtatcc A D W L N L L L K M P T T P S A V T T V S
378	ccgaataattggacaagtacaagtccaataactatatgtgaaatgcccttgataatggtcctt P N N W T S T S P I T I C E M P L D N G L
441	tgccatgagtgatataccacgatattattttaatggaacacaatgtctacaattcgattataat C H A S I P R Y Y F N G T Q C L Q F D Y N
504	ggctgtggtggaatgcaaacaatttcatttcaatatacagaatgcaattcaacctgtttaaca G C G G N A N N F I S I S E C N S T C L T
	aat <u>TAA</u> N * 570

4) kontig 60782(g1-il)

1	<u>ATG</u> tttagttgccctttccttggtgctgtaattggtgctgcaatagtggttattggtggatta M F S C P F L V L L I V A A I C V I G G L
63	attgctggatttggtctaaatcaacaacaatttcgacgtcgacgtacgagtttgggctacgt I A G F G L N Q Q T I S T S T Y E F G L R
126	actaactgcagtttgctccagacactgggccgtgcaaagcgtatttataaaaggactacttc T N C S L P P D T G P C K A Y L K R Y Y F
189	aacggtaaagactgcaatcttttctggttacggcggttgctggggtaacgcaacaacttctta N G K D C N L F V Y G G C W G N A N N F L
252	gacattcaggattgtcagcaaactgcatggcactgaaagcaaatgat <u>TAG</u> D I Q D C Q Q T C M A L K A N D * 300

5) kontig 60782(g1-i2)

1	ATG tttagttgccctttccttgtgttgctaattgttgctgcaatatgtgttattggtggatta M F S C P F L V L L I V A A I C V I G G L
63	attgctggatttggctctaaatcaacaacaatttcgaggataccagtcagctgctttttgcct I A G F G L N Q Q T I S R I P V S C F L P
126	ccaaacagtgggatcatgcaagcaaatatcaatcgtttctattttaatggagtagactgcgaa P N S G S C E A N I N R F Y F N G V D C E
189	tcttttatttacggcgggttgctgggtaacgaaaacaactttaaaaccatcgaagagtgttg S F I Y G G C L G N E N N F K T I E E C W
252	aaaacttgcaaggcgacgaaagaagatgcgctcgacgtatgagtttgggctacgtactaactgc K T C K A T K E D A S T Y E F G L R T N C
315	agtttgcctccagacactgggcccgtgcaaagcgtatttaaaaagggtactacttcaacggtaaa S L P P D T G P C K A Y L K R Y Y F N G K
378	gactgcaatcttttcgtttacggcgggttgctgggtaacgcaacaacttcttagacattcag D C N L F V Y G G C W G N A N N F L D I Q
441	gattgtcagcaaactgcatggcactgaaagcaaatgat TAG D C Q Q T C M A L K A N D * 480

6) kontig 60782 (g1-i3)

1	ATG tttagttgccctttccttgtgttgctaattgttgctgcaatatgtgttattggtggatta M F S C P F L V L L I V A A I C V I G G L
63	attgctggatttgggataccagtcagctgctttttgcctccaaacagtgggatcatgcaagca I A G F G I P V S C F L P P N S G S C E A
126	aatatcaatcgtttctattttaatggagtagactgcaaatcttttatttacggcgggttgctg N I N R F Y F N G V D C E S F I Y G G C L
189	ggtaacgaaaacaactttaaaaccatcgaagagtgttgaaaacttgcaaggcgacgaaagaa G N E N N F K T I E E C W K T C K A T K E
252	gatgcgctcgacgtatgagtttgggctacgtactaactgcagtttgcctccagacactgggccc D A S T Y E F G L R T N C S L P P D T G P
315	tgcaaagcgtatttaaaaagggtactacttcaacggtaaaagactgcaatcttttcgtttacggc C K A Y L K R Y Y F N G K D C N L F V Y G
378	ggttgctggggtaacgcaacaacttcttagacattcaggattgtcagcaaactgcatggca G C W G N A N N F L D I Q D C Q Q T C M A

441	ctgaaagcaaatgat TAG L K A N D * 456
-----	---

7) kontig 62677 (g1-i2)

1	ATG ttctctgctttcactgcaatatgttttattggcggattaatttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaaaatgagcaccaatattatgggctaccagcattatgtaccttg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L C T L
126	cccgcggaagtgggtccttgacagacacatgtcaatcgtttctactttgacggaaaagaatgc P A E V G S C R A H V N R F Y F D G K E C
189	aaaagctttgttttacggcggttgcatgaaacgcaacaacttcgaagacatcgaagattgt K S E V Y G G C D G N A N N F E D I E D C
252	cgaaaaacttgccatgcaagaaaggaatgctcgggtccatcattcaaaaaagctcgggca R K T C H A K K G N A R V H H S K K A R A
315	catcattcaaaagaagctcgggaccatcattcaaaaaaggactacctgccagatgcaatttg H H S K E A R D H H S K K G L P A R C N L
378	cctcaagaatctggctccttgcttagcttatttcgtaggttcttctataatggagaagattgc P Q E S G P C L A Y F V R F F Y N G E D C
441	gaaaaactttgttttcggcggttgatgggtaacgcaacaactttaaacaatagaagattgc E N E V F G G C M G N A N N F K T I E D C
504	cgaaaaacttgcaaggtggtgaaaccagctcgagtcaggccttcaaattcaggactacctgtc R K T C K V V K P A R V R P S N S G L P V
567	agctgtaatatgcctgcagaaattggccttgcaagcaagtttctactcgtttctactttaac S C N M P A E I G P C K A S F T R F Y F N
630	ggggaagattgcgaaaaactttgtatacggcggttgcatgggtaacgcaacaacttcaaaacc G E D C E N F V Y G G C M G N A N N F K T
693	atcgaagattgtcggaaaatctgcaaggcggtgaaatcaaatggaatacctgccagatgctct I E D C R K I C K A V K S N G I P A R C S
756	ttgccggctgaaaactggaccttgacagacacatgtcagaagtactactttaacgggtaagac L P A E T G P C R A H V R S Y Y F N G E D
819	tgtgaaaactttgtttacggcggttgcatgggtaatgcaacagatttgagaccattgatgag C E N E V Y G G C M G N A N R F E T I D E
882	tgctgtaaacctgcaagctggtgaaaacagaaaat TAG C R K T C K L V K T E N * 918

8) kontig 62677 (g1-i3)

1	ATGttctctgctttcactgcaatatgttttattggcggattaatttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaatgagcaccaatattatgggctaccagcattatgtaccttg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L C T L
126	cccgcggaagtgggtccttgagagcacatgtcaatcgtttctactttgacggaaaagaatgc P A E V G S C R A H V N R F Y F D G K E C
189	aaaagctttgtttacggcggttgcatggaacgcaacaacttcgaagacatcgaagattgt K S E V Y G G C D G N A N N F E D I E D C
252	cgaaaaacttgccatgcgaagaaaggaaatgctcgggtccatcattcaaaaaagctcgggca R K T C H A K K G N A R V H H S K K A R A
315	catcattcaaaaagaagctcgggaccatcattcaaaaaaggactacctgacagatgcaatttg H H S K E A R D H H S K K G L P A R C N L
378	cctcaagaatctggtccttgcttagcttatttcgtaggttcttctataatggagaagattgc P Q E S G P C L A Y F V R F F Y N G E D C
441	gaaaactttgttttcggcggttgatgggtaacggaacaactttaaaacaatagaagattgc E N E V F G G C M G N A N N F K T I E D C
504	cgaaaaacctgcaaggtggtgaaaccagctcgagtcaggccttcaaattcaggactacctgtc R K T C K V V K P A R V R P S N S G L P V
567	agctgtaatatgcctgcagaaattgggccttgcaagcaagtttcaactcgtttctactttaac S C N M P A E I G P C K A S F T R F Y F N
630	ggggaagattgcgaaaaactttgtatacggcggttgcatgggtaacggaacaacttcgaaaca G E D C E N F V Y G G C M G N A N N F E T
693	atcgaagaatgtcgaacaacctgcaaggcgatgaaagcagacgggaaatctgtcaaatgtaat I E E C R T T C K A M K A D G K S V K C N
756	atgcctgcagacattgggccttgagagcacatgtcaatcgcttcttctttaacggagaagac M P A D I G P C R A H V N R F F F N G E D
819	tgcgaaactttgtttacggcggttgctgggtaatgcgaacaacttcaaaacctcgaagat C E H F V Y G G C L G N A N N F K T I E D
882	tgtcaaaacacctgcaaggcggtaaaagcagaggatTAG C Q N T C K A V K A E D * 918

9) kontig 68750 (g2-i3)

1	<u>ATG</u> ggcagtaagttaatccttatctacggcactccttgccatggctgtagctacgctttggata M G S K L I L S T A L L A M A V A T L W I
63	gccgaagcaactgcaagtcactatcaacttgtcaactgcccaaatggtcggtatgtgcaga A E A T A S P L S T <u>C Q L P K M V G M C R</u>
126	gcgagttttcctcgattctattttgatgggaaaaatgcacagaattcatttatggaggctgt <u>A S F P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C</u>
189	gggggaaatgcaaacaattttcagacgaaagcggaatgcgagtcagcctgtccagtgctt <u>TAA</u> <u>G G N A N N F Q T K A E C E S A C</u> P V L *
	249

10) kontig 62677 (g1-i7)

1	<u>ATG</u> ttctctgctttcactgcaatatgttttattggcggattaatttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaatgagcaccaatattatgggctaccagcattatgtaccttg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L <u>C T L</u>
126	cccgcggaagtgggtcttgagagcacatgtcaatcgtttctactttgacggaaaagaatgc <u>P A E V G S C R A H V N R F Y F D G K E C</u>
189	aaaagctttgtttacggcggttgcatggaacgggaacaacttcaaaccatcaaagaatgt <u>K S F V Y G G C D G N G N N F K T I K E C</u>
252	cgaaaaactgcaaggcgataaaagcagttgctcgagtcaggccttcaaattcaggactacct <u>R K T C</u> K A I K A V A R V R P S N S G L P
315	gtcagctgtaatatgcctgcagaaattgggccttgcaaagcaagtttcactcgtttctacttt V S <u>C N M P A E I G P C K A S F T R F Y F</u>
378	aacggggaagattgcgaaaactttgtatacggcggttgcatgggtaacgcaacaacttcgaa <u>N G E D C E N F V Y G G C M G N A N N F E</u>
441	acaatcgaagaatgtcgaacaactgcaaggcgatgaaagcagacgggaaatctgtcaaatgt <u>T I E E C R T T C</u> K A M K A D G K S V K <u>C</u>
504	aatatgcctgcagacattgggccttgagagcacatgtcaatcgcttcttcttaacggagaa <u>N M P A D I G P C R A H V N R F F F N G E</u>
567	gactgcgaacactttgtttacggcggttgcctgggtaatgcgaacaacttcaaaccatcgaa <u>D C E H F V Y G G C L G N A N N F K T I E</u>
630	gattgtcaaaaacactgcaaggcggtaaaagcagaggat <u>TAG</u> <u>D C Q N T C</u> K A V K A E D * 669

11) kontig 5995

1	<u>ATG</u> gccaataattttaatttattttacggcattggttatcttggttgtagctgtgctatggatt M A N N F N L F T A L V I L V V A V L W I
63	accgaggcctgcttgatgatgaacggaatgtagaaattgattccgtaacgaaagcagccaca T E A C L M M N G N V E I D S V T K A A T
126	agtccactatcaatttgtcaactacccaaagcagtcggtatgtgcctagctagttttcctcga S P L S I <u>C Q L P K A V G M C L A S F P R</u>
189	tactattttgatgggaaaaaatgcacacaattcatttatggaggctgtgggggaaatgcaaac <u>Y Y F D G K K C T Q F I Y G G C G G N A N</u>
252	aattttcagacgaaagcggaaatgcgagtcacactgtccagtgctt <u>TAA</u> <u>N F Q T K A E C E S T C</u> P V L * 297

12) kontig 62677 (g1-i5)

1	<u>ATG</u> ttctctgctttcactgcaatatgttttatttggcggattaatttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaaatgagcaccaatattatgggctaccagcattatgtacctg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L <u>C T L</u>
126	cccgcggaagtgggtcttgcagagcacatgtcgatcgtttttactttgacggaaaagaatgc <u>P A E V G S C R A H V D R F Y F D G K E C</u>
189	aagagctttgtttacggcggttgcgatggtaacacgaacaacttcgaaaacctcgaagattgt <u>K S F V Y G G C D G N T N N F E N L E D C</u>
252	caaaaaacttgccatgagcggaaaacagatgctcgggaccatcattcaaaaaagctcgagtc <u>Q K T C</u> H A R K T D A R D H H S K K A R V
315	aggccttcaaattcaggactacctgtcagctgtaatatgctgcagaaattgggcttgcaaa R P S N S G L P V S <u>C N M P A E I G P C K</u>
378	gcaagtttcactcgtttctactttaacggggaagattgcaaaaactttgtatagcggcgttgc <u>A S F T R F Y F N G E D C E N F V Y G G C</u>
441	atgggtaacgcgaacaacttcgaacaatcgaagaatgtcgaacaacctgcaaggcgtatgaa <u>M G N A N N F E T I E E C R T T C</u> K A M K
504	gcagacgggaaatctgtcaaatgtaatatgctgcagacattgggcttgcagagcacatgtc A D G K S V K <u>C N M P A D I G P C R A H V</u>

567	aatcgcttcttctttaacggagaagactgccaacactttgtttacggcggttgctgggtaat N R F F F N G E D C E H F V Y G G C L G N
630	gccaacaacttcaaaccatcgaagattgtcaaacacctgcaaggcggttaaagcagaggat A N N F K T I E D C Q N T C K A V K A E D
	TAG * 693

13) kontig 68750 (g2-i2)

1	ATG gtcaataatnttaattttacggcattgattgtcttggttagctgcgctttggatt M V N N F N L F T A L I V L V V A A L W I
63	tccgaggcaactgcaagtcactatcaacttgtcaactgccccaaatggcggatgtgcaga S E A T A S P L S T C Q L P Q M V G M C R
126	gcgagtttctcgcgattctatnttgatgggaaaaatgcacagaattcatttatggaggctgt A S F P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C
189	gggggaaatgcaacaatnttcagacgaaagcggaatgcgagtcagcctgtccagtgcct TAA G G N A N N F Q T K A E C E S A C P V L *
	249

14) kontig 62677 (g1-i9)

1	ATG ttctctgctttcactgcaatatgttttattggcggattaatnttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaaatgagcaccatattatgggctaccagcattatgtaccttg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L C T L
126	cccgcggaagttgggtcttgagagcacatgtcgatcggttttactttgacgaaaagaatgc P A E V G S C R A H V D R F Y F D G K E C
189	aagagctttgtttacggcggttgcgatggtaacacgaacaacttcgaaaacctcgaagattgt K S F V Y G G C D G N T N N F E N L E D C
252	caaaaaacttgccatgcgaggaaaacagatgctcgggaccatcattcaaaaaaggactacct Q K T C H A R K T D A R D H H S K K G L P
315	gccagatgcaatnttgctcaagaatctggccttgcttagcttatttcggttaggttcttctat A R C N L P Q E S G P C I A Y F V R F F Y
378	aatggagaagattgcaaaaactttgttttcggcggttgatgggtaacgcaacaactttaa

	N G E D C E N F V F G G C M G N A N N F K
441	acaatagaagattgccgaaaaaacctgcaaggtggtgaaaccagctcgagtcaggccttcaaat T I E D C R K T C K V V K P A R V R P S N
504	tcaggactacctgtcagctgtaatatgcctgcagaaattgggccttgcaaagcaagtttact S G L P V S C N M P A E I G P C K A S F T
567	cgtttctactttaacggggaagattgcgaaaactttgtatacggcggttgcattgggtaacgcg R F Y F N G E D C E N F V Y G G C M G N A
630	aacaacttcgaaacaatcgaagaatgtcgaacaacctgcaaggcgatgaaagcagacgggaaa N N F E T I E E C R T T C K A M K A D G K
693	tctgtcaaatgtaatatgcctgcagacattgggccttgcaagcagacatgtcaatcgcttcttc S V K C N M P A D I G P C R A H V N R F F
756	tttaacgggagaagactgcgaacactttgtttacggcggttgctgggtaatgcgaacaacttc F N G E D C E H F V Y G G C L G N A N N F
819	aaaaccatcgaagattgtcaaaacacctgcaaggcggtaaaagcagaggatTAG K T I E D C Q N T C K A V K A E D * 870

15) kontig 62677 (g1-i8)

1	ATG ttctctgctttcactgcaatatgttttattggcggattaatttcggaactcgtttcaaac M F S A F T A I C F I G G L I S E L V S N
63	atcccaccatttgaccagcaaatgagcaccaatattatgggctaccagcattatgtacctg I P P F D Q Q N E H Q Y Y G L P A L C T L
126	cccgcggaagtgggtcttgcagagcacatgtcaatcgtttctactttgacggaaaagaatgc P A E V G S C R A H V N R F Y F D G K E C
189	aaaagctttgtttacggcggttgcatggaacgggaacaacttcaaaccatcaaagaatgt K S F V Y G G C D G N G N N F K T I K E C
252	cgaaaaaacctgcaaggcggtgaaagcaaatggattacctggcagttgcaatttgctgcagat R K T C K A V K A N G L P G S C N L P A D
315	attgggccatgcagagcatatacgaaacgattctactttaacggaaccactgcgaaaacttt I G P C R A Y T K R F Y F N G N H C E N F
378	atatacggcggttgcattgggtaacgcgaacaacttcaaaccatcgaagattgtcgaaaatc I Y G G C M G N A N N F K T I E D C R K I
441	tgcaaggcggtgaaatcaaatacctgccagatgctctttgccggctgaaactggacct C K A V K S N G I P A R C S L P A E T G P
504	tgcaagcagacatgtcagaagtactactttaacgggtgaagactgtgaaaactttgtttacggc C R A H V R S Y Y F N G E D C E N F V Y G

567	ggttgcacatgggtaatgcgaaacagatttgagaccattgatgagtgctgtaaacctgcaagctg G C M G N A N R F E T I D E C R K T C K L
630	gtgaaaacagaaaat TAG V K T E N * 645

16/ kontig 5641

1	ATG ggcagtaagttaatccttatctatggcactccttgccatggctgtagctacgctttggata M G S K L I L S M A L L A M A V A T L W I
63	gccgaagtgagtggtggagtaccgaaatttcattctggtggtcaaatagagtggtggagcacat A E V S G G V P K F H S G G Q M S G G A H
126	aaatttcttcttgagggtcaaatagagtggtgaagtaccgaaatttcttcttgatggccaaca K F L L G G Q M S G E V P K F L L D G Q T
189	actgcaagtccactatcaacttgtcaactgccccaaatggtcggatgtgcagagcgagtttt T A S P L S T C Q L P Q M V G M C R A S F
252	cctcgattctattttgatgggaaaaaatgcacagaattcatttatggaggttggtggggaaat P R F Y F D G K K C T E F I Y G G C G G N
315	gcaacaattttcagacgaaagcggaaatgagtgcaacctgtccagtggtt TAA A N N F Q T K A E C E S T C P V V * 366
<u>5641</u>	

Příloha 2 - Kompletní sekvence annexinů z transkriptomů *E. nipponicum*

- tučným písmem je vyznačen **START** a **STOP** kodón,
- **žlutě** a **tučně** jsou označeny motivy typické pro annexiny

1) kontig 39626

1	ATG cagcgcaatataacatctcttcatcaattggcagcagatggtttttacgaggcgacgata M Q R N I T S L H Q L A A D G F Y E A T I
63	tatccgagtttaggattttctgcgacagttgatatcgagaggctctacaaggctatgaaagga Y P S L G F S A T V D I E R L Y K A M K G
126	ctcggaaacaaatgaaaaagagctcattgccgtactaggaaatcggacattaactgaacgtttc L G T N E K E L I A V L G N R T L T E R F
189	gagataaaggaactttatcacgtgaaatacggaaagacattgcgagacgcaatcagaagcgag E I K E L Y H V K Y G K T L R D A I R S E
252	acgagtggagattttcgtgatcttttagagatgctgctgttgagccagcacatgtggatgcc T S G D F R D L L E M L L L E P A H V D A
315	ataggattgcaacgcgctcttaagtggcgaagaacaaacagagagcatcaaccaactactt I G L Q R A L K W S K N K Q R G I N Q L L
378	ttgggaaaaaccaacatggagatgatgctcgttgaaaaatactatcatgaattacttcgaaa L G K T N M E M M S L E K Y Y H E L L R Q
441	aacaagaaagatgtaggaagaagtcttccgttgatttaatggctgtaagtgacggcttctat N K K D V G R S L P L D L M A V S D G F Y
504	

567	<p>gaaaagtcgcttatgttaattatggagaagcgcaaagatcaacttacggacgaggagtgtcgt E K S L M L I M E K R K D Q L T D E E C R</p>
630	<p>agagcaatgcacaatggagttcaaagtgtacttaatggtgaaaaagctcgaaaagatgtaaaa R A M H N G V Q S V L N V E K A R K D V K</p>
693	<p>gatctattcaaaaagtacagccgcaagtgggagcagatgaggcaacagtgatgcaaatttta D L F K S T A A Q V G A D E A T V M Q I L</p>
756	<p>tgccgacgacacgagtgggatattcaactgatctgtcggctatatcaggagatgaattctgtt C R R H E W D I Q L I C R L Y Q E M N S V</p>
819	<p>cagctgtacgacacactggatgctgagttgcatggaacatttagagacttctgtcttgatgca Q L Y D T L D A E L H G T F R D F C L D A</p>
882	<p>ctagagtatagcacggagagggccgttatattatgcgagattgctacgccaacaacaattgga L E Y S T E R P L Y Y A R L L R Q T T I G</p>
948	<p>ttgggcacaaaagatcatacattaatgCGTCTTCTTGtaaATCGGGCAGAGATTGATCTCGGC L G T K D H T L M R L L V N R A E I D L G</p>
1056	<p>agcataatgaaggcatatcaaacagagtatggtcaaacattgattgaggctattttccagtgac S I M K A Y Q T E Y G Q T L I E A I S S D</p>
	<p>acatctggtgattataagaagctcctactcactatctgCGGGGTA<u>TAA</u> T S G D Y K K L L L T I C G V *</p>

2) kontig 51242

1	<p>ATGtcaatgcaatctatcaaacccttggatgcgtttgttccaactgtcgtagcgaagaagaac M S M Q S I K P L D A F V P T V V A K K N</p>
	<p>ttcaatccagagtatgaggcggatcgtttgaagaaagctttcaaaggattaggtacggatgag F N P E Y E A D R L K K A F K G L G T D E</p>
63	<p>atggaagtgaatagagttctcggtgaaatcacactggaccaacgtcacgatattgcagattta M E V N R V L G E I T L D Q R H D I A D L</p>
	<p>tacttacagaagtataaaaagccattggatgaagaactgaaatccgagctgtccggggactac Y L Q K Y K K P L D E E L K S E L S G D Y</p>
126	<p>tacatgctagtggaaggacttctgttaaactctatagagttgtagccagagacctttttgtg Y M L V E G L L L N P I E L L A R D L F V</p>
	<p>gcgctgcaagtcaaaaccgaatcctgctataactgaacgaaataattggctgtgctaacaac A L R K S K P N P A I L N E I I G C A N N</p>
189	<p>cacgagattatgaaatacaaatggcatattccatgatcgacaggaagcgttctactggaagac H E I M E I Q M A Y S M I D R K R S L E D</p>
	<p>gcaatagcctccagttttaaaggtgattacaacacgctaatacgaggctctactcactcgggtg A I A S S F K G D Y N T L M Q A L L T R C</p>
252	<p>cgacaagatgatgatccagaaaaagtgaagcttgcgttcgagacaatggatctgaggatactg R Q D D D P E K V K L A F E T M D L R I L</p>
	<p>gtgaacatgaatcaactgcagaacgatgttgccaaactaacaaggcgttactggaacctta V N M N Q L Q N D V A K L T K A L T G T L</p>
315	<p>gatgcacaaacgttgatcaacattcttacaacgcgtagcaaacacaccgttctgtggcatttgt D A Q T L I N I L T T R S K H T V R G I C</p>
	<p>gaactcttcagaatgacaacaaaattcatttggctgactgtatcacagaaaatgtcccggaa E L F Q N D N K I H L V D C I T E N V P E</p>
378	<p>ccattgcaagtgccctaaataaccgtagtcatgggactgattgatctcaggctgcttcttgtc P L R S G L N T V V M G L I D L R L L L V</p>
	<p>tgccaattaatggaaagtttccaggggaaaggaactcgcgaggagacactgtcgcgaataatc C Q L M E S F Q G K G T R E E T L S R I I</p>
441	<p>atactgcaagtgagttggacttggaaaatctgaaggaacttttcaatgccaagtttgacaaa I L R S E L D L E N L K E L F N A K F D K</p>
504	<p>agtctaccagagtatatcaaagcggaaacgaaggcgaactgcaaaatttgccttctgacctta S L P E Y I K A E T K G E L Q N L L L T L</p> <p>actggagatttgaatcaaaagaaaTAG T G D L N Q K K *</p>

3) 56172

1	atggaagcagacgagataaccctagctgatgtaattttatgagcagtacaccactgtacga M E A D E I T L A D V I Y L S S T P T V R
63	ccagtagtagatttcaatccggaacgatgcagagtgctacgtcgggctatgaaaggttg P V V D F N P E N D A E C L R R A M K G L
126	ggaacagacgaaaaggcaataatttcaattttggcaaaccgcagtgcatcgcagcgtcaggaa G T D E K A I I S I L A N R S A S Q R Q E
189	attaagcagtactttcatggttgttttgtaaagatttgacgcagaattgtccagtgaatta I K Q Y F H G C F G K D L D A E L S S E L
252	tcgggaaatttcaagaagctggtgcaaaaattgatgatgggtcgggtacgaactgtagccagt S G N F K K L V Q K L M M G R Y E L L A S
315	attctgcatgaggcaatctctggtctgggcaccactgaaagtgacatcattatggtattgtgt I L H E A I S G L G T T E S D I I M V L C
378	cttatttgcagcgacgaaatgcaaaccgtcaaggagatttacaatgaaaagttcaagcgaagc L I S T D E M Q T V K E I Y N E K F K R S
441	ttgcaggatgattttaaaggatgatttaagcggtgactttgaaaaacttatgattgctgtgacc L Q D D L K G D L S G D F E K L M I A L T
	gtaggctgtcgagaggaaccatctcctgaacaattcagcattgctagatgcaaaagagactac V G C R E E P S P E Q F S I A R C K R D Y
504	agtcaattagttgacagcgaacaggtgaaaaagactgtctcgacatcctagaagctggagaa S Q L V D S E Q V K K D C L D I L E A G E
	agacgtttgggcacagatgaggacacctttatcgcaccttgcgagacgaagtctttggcat R R L G T D E D T F I R I L A R R S L W H
567	ttggaagcattaaatgatgcctacttgaagaaactgggcacgatctgtataccgcaataagt L E A L N D A Y L K E T G H D L Y T A I S
	aaggagacgtctggacaattcaaaaactgcaatgactacaattcttgatgcagcaacgtgtcga K E T S G Q F K T A M T T I L D A A T C R
630	gtacaatactttgcaatgtactaaaaaaaaacaatgaaaggtttgggaacagatgacagaaca V Q Y F A N V L K K T M K G L G T D D R T
	ctcatgaatgttattgtttggcgatcagagcttgatttgggtgatattcgtcaggcctttcaa L M N V I V W R S E L D L G D I R Q A F Q
693	gagttgaccggagaatctttggagaaatggattaagtctgacaccagtgagactacaaagca E L T G E S L E K W I K S D T S G D Y K A

756	cttcttctggagttgatttccggt TAA <u>L L L E L</u> I S G * 1032
-----	--

4) kontig 58980

1	ATG aatgcctcggctctatctccgtcactggttatagccagatttgctggactccgaggaaca M N A S A L S P S L V I A R F A G L R G T gtaagaccagtggaaaatttcaatccggaagaagatgctatgacgcttcgaagtgcttttaag V R P V E N F N P E E D A M T L R S A F K ggcataggttacaatgcaagcctataatcgaaatatttggccgcagaaattacgaacaacgt G I G Y N A K P I I E I F G R R N Y E Q R attcaaatccatgaagcatacagcgaatgtttgacaggaattttatcagcgatctaaaatcg I Q I H E A Y E R M F D R N F I S D L K S gaacttcgtggcagctttgagcgaacgtgcagatgcctcttactgagttatgtggaatttgac E L R G S F E R T C R C L L L S Y V E F D gaatataatthaatgaaagctacagaaggctatggatcaatttcggacatattaatggagatc E Y N L M K A T E G Y G S I S D I L M E I tacataacacgttcgcacagacatataaataaaactgatgctttcattacgaaaaaacgcccgt Y I T R S H R H I N K L M L S L R K N A G aaagaattatccgagtttggtgaactcgttgaagatcctaggataaaatcaatacttaaggc K E L S E F V E L V E D P R I K S I L K G attacatggactaagtttcacgatataactataaccattagacaacaacttgctgtgctagac I T W T K F H D I T I P L D K Q L A V L D gcaaagaagatattaaagcagctgaagataaaactagggttgcatgaggcagttataacccaa A K K I L K A A E D K L G C D E A V I T K atattgacgttgaatactgaggacagatagcgaacattcaaggaatataacaagatagcc I L T L N T E G Q I R Q T F K E Y N K I A gccatcccgttaatagaacaataaaaacgtgaagtcaaaggggaactaaggaagacactaatg A I P L I E T I K R E V K G E L R K T L M
63	
126	
189	
252	
315	

378	gacatcgtgctatgggtgtacaaatcatgcattatatttctcaagaaaaatcaacaaatcaatt D I V L W C T N H A L Y F S R K I N K S I
441	gtcgggtacgggacaaatgagagagatctcttacgggtatataacaggaagatgtgagattgat V G Y G T N E R D L L R Y I T G R C E I D
504	atgattgacataaaggataacttacatggagctttacaacaggtcactcggaacagacatcaag M I D I K D T Y M E L Y N R S L G T D I K aacgaagcaattaactctgaatttaagaagttgctttgtgtgctaatacgatgaagaa TAG N E A I N S E F K K L L C V L I D E E *
567	
630	
693	
756	
819	
882	
1062	

5) kontig 60438

1	<p>ATGcgtgatctaactttgaagcaggtttatgCGTctggtcaccacgccaatccaactttacgg M R D L T L K Q V Y A S G H H A N P T L R</p> <p>ccaagagcggacttcaatgCGGaggaagctgctaaagggctaaaggcagcgatggatggagtc P R A D F N A E E A A K G L K A A M D G V</p>
63	<p>ggcactgacgagtacacactcatcaatatcttgggcacctgcagctcggatcaacgtcaagtc G T D E Y T L I N I L G T C S S D Q R Q V</p> <p>cttaggcaaaccttcaaagctcattatggctcagaactaatagatgaactaaaatcggatta L R Q T F K A H Y G S E L I D E L K S E L</p>
126	<p>agtggtgatTTTgaacgtctggtcgtattacttctctactcatgggacgaaatgtacgcaaga S G D F E R L V V L L L Y S W D E M Y A R</p> <p>atcttgtttgaagccatggacggagcgggcaccgacgaggcggctattattatgTTgTTgTgt I L F E A M D G A G T D E A A I I M L L C</p>
189	<p>acgcttcaacctgccgaaatcgaggtcgtgaaggaaacttacaacgagTTTTggctgagaag T L Q P A E I E V V K E T Y K R V L A E K</p> <p>ggcaaatcctcatctcgcactcttgaagcgcacatcaagtcggaactgagcggatctggaa G K S S S R T L E S D I K S E L S G D L E</p>
252	<p>aaactgatggctcgtctgTTgcagtgccagcgcactggcgttgattctgaagacctgCGCGCC K L M V A L L Q C Q R P G V D S E D L R A</p> <p>tttgctaagggcgagaaacggctaagtgatcttattaatgcagatcaagctcgtcaagacgct F A K G E K R L S D L I N A D Q A R Q D A</p>
315	<p>gacgatttgtacaatgctggtgaaggtaaatggggaactgacgaaagtacattcatttcagtt D D L Y N A G E G K W G T D E S T F I S V</p> <p>cttgcaaacagaaagcaaatattcgctttgggcaactaatgaaatttacaagagaaatagggc L A N R S K Y S L W A T N E I Y K E K Y G</p>
378	<p>cattccatcgtggatgcagtgTgcagtgaaacatctggggactttaaaagggcattaaaactt H S I V D A V C S E T S G D F K R A L K L</p> <p>ctcttttcgtctcaacttgatccaaagggcacatatgCGGCGcttttcaaaaagtcgatggat L F S S Q L D P K G T Y A A L F K K S M D</p>
441	<p>ggacttggacatctgacaaacagttgatgtttcttgcgtcgcacagatgtgagattgacttg G L G T S D K Q L M F L V V D R C E I D L</p> <p>aaagatattatgcaacattacgaggagataaatgggcaatctctggttgaacgcatcgcgctcc K D I M Q H Y E E I N G Q S L V E R I A S</p>
504	<p>gagacaagcggtgattatagaaccctgcttcttttgcTctgtggcgagtcctgtTAA E T S G D Y R T L L L L L C G E S C *</p>
567	

630	
693	
756	
819	
882	
1062	
1125	

6) kontig 62895 (g2-i2)

1	<p>ATGaaaggccttagggactgatgaaaaggcaattatcgatgtgtagcatccaaaacttctgt M K G L G T D E K A I I D V L A S K T S C</p> <p>GaacggcaaaagatgCGTgtggcttttaagcaacctacggccgagatttagtgagaatcctt E R Q K M R V A F K A T Y G R D L V E N L</p>
63	<p>gagaaggagttatctggcaattttcggaaattggtgCGcatgatgatgatgccacgttcaatg E K E L S G N F R K L V R M M M M P R S M</p> <p>ctacttgccagcctactatatgacgCGactgatgggattggcaccCGagagagtctcattatt L L A S L L Y D A T D G I G T R E S L I I</p>
126	<p>ttgattttatgcaatctaacaaccaggaattaatgatgtgaagctagcctacaagaattg L I L C N L T N Q E I N D V K L A Y K E L</p> <p>catagccgaatccttgataaggacattcatgacgatccttagtgagatttcaaacgtatcatg H S R N L D K D I H D D L S G D F K R I M</p>
189	<p>gttgccataatgcaagggatgCGgaatgagccatctccggctctcgtCGccagcagacagctg V A I M Q G M R N E P S P A L V A S R Q L</p> <p>gaacagttattaaatgcacctgatattgagaacgatgtaaatgacctagttagagcaggCGag E Q L L N A P D I E N D V N D L V R A G E</p>
252	<p>ggccgtttggaaccgatgaggacactttcatccgTgtgcttacttcgCGcaactattggcat G R L G T D E D T F I R V L T S R N Y W H</p> <p>ttggctagactaaaccagcgttatcaagccaaatacggacgTgatctgatcaaagcagttgaa L A R L N Q R Y Q A K Y G R D L I K A V E</p>
315	<p>aatgaaacttcgggCGacttcaagaaagccctccttactatccttgaaagCGctgtaaactga N E T S G D F K K A L L T I L E S A V N R</p> <p>ccatattatttcgCGaaacaattaaacatgcaatggagggTgtgggaacaaatgaccaatat P Y Y F A K Q L K H A M E G V G T N D Q Y</p>
378	<p>ctgatggccattgttgtttggCGctccgagattgatatggttgacatcaagaaaactttagc L M A I V V W R S E I D M V D I K E N F S</p> <p>aaactatgCGggaaatctctggagTcgtggatcCGgatgacactagCGgagattacaaaaag K L C G K S L E S W I S D D T S G D Y K K</p>
441	<p>atgctactggcctttggttagaggtcaaTGA M L L A L V R G Q *</p>
504	

567	
630	
693	
756	
756	
819	

7) kontig 63027

1	<p>ATGagttttccggtattctcctttcaacaaatcggtaccgtggttgtacacaccaaccgtt M S F P V F S F Q Q I G Y R G L Y T P T V</p>
	<p>tttgtggacagtcgatgccaatatgaaaatgaggctacacgactattcaaggcaatgaaagga F V D S R C Q Y E N E A T R L F K A M K G</p>
63	<p>ctcggtagaaaatgagaaagagctaatcgatgtattgggcacacgaccgtcgtttcaacgtgcc L G T N E K E L I D V L G T R P S F Q R A</p>
	<p>gaaataagagaaaactttcgagagacaacacagaaagcaacttcttgagaaataaaaagcgag E I R E T F E R Q H R K Q L L A E I K S E</p>
126	<p>tgcagtggagacttcagagaactactagtcatgctcgttcaggacatttcctatggtgaggcc C S G D F R E L L V M L V Q D I S Y V E A</p>
	<p>agcggactcctccacgcgatgaaggggttggcacacgagagcgccgtctcaatcaaattttg S G L F H A M K G V G T R E R R L N Q I L</p>
189	<p>attgaaaagagtaatgacgaaatcttgggcatcactgaggcttaccattagttctgggtgac I G K S N D E I L G I T E A Y Q L V L G D</p>
	<p>cacaaacaggatgcaaatcgtgttctactggatgacatacgaactgaacaagtcgcagttat H K Q D A N R V L L D D I R T E T S R S Y</p>
252	<p>ggtaaattgcttgcaaatatggtaaaaggaaaacgacaagaattcggaccctctgaccttgac G K L L A N M V K G K R Q E F G P S D L D</p>
	<p>ctggcgattcataatggagctcattcagtactcgatcaacgtcaagtgtcgtggatgtggag L A I H N G A H S V L D Q R Q V S L D V E</p>
315	<p>accctgtacaatgtaacagctggtcaacaaggagcaaatgaagaagttatcgtggaaactatg T L Y N V T A G Q Q G A N E E V I V E T M</p>
	<p>agctaccggagctacttgcattctcaagctgtgtttgctcaatttgaacagagatatgacaca S Y R S Y L H L Q A V F A Q F E Q R Y D T</p>
378	<p>agtttctacgatgttctgagtgacgagctctctggagattttcgaaacgcttgcttgatatt S F Y D V L S D E L S G D F R N A C L D I</p>
	<p>tttgaattttgttgtgaacgggacctctactttgctcgtttgctgagatgtacgacgcgagga F E F C C E R D L Y F A R L L R C T T R G</p>
441	<p>cttggaaacaaagatcaagatttaatgcgactttagtaaacacgcagtgagattgatcttggc L G T K D Q D L M R L V V T R S E I D L G</p>

504	<p>agcatagaggatgCGTATcaagCGGAATatGGGCAAactcTTATgaaggCAATcgaaggagac S I E D A Y Q A E Y G Q T L M K A I E G D</p> <p>acgtctggggattacagaaagcttttactcacgttGTGTGGTcaaaaagctaccaagTAA T S G D Y R K L L L T L C G Q K A T K *</p>
-----	---

8) kontig 64072

1	<p>ATGgcagataaaaaatgCGgttCAAattgTttacatcagcttGGatATgaacatagttattca M A D K N A V Q I G L H Q L G Y E H S Y S</p> <p>ggaactttgaaaacggttGTtGGttcctCGGcatccGGCGatgCGgaacgacttttcaaagct G T L K T V V G S S A S G D A E R L F K A</p>
63	<p>atgaaaggactaggcaccgatgaggCGGAattGTGTgacgtacttGgaaggCGaacgttcaaa M K G L G T D E A E L C D V L G R R T F K</p> <p>gaacgagccgagatcaaagccGCatacacaacctcTTATgGaaatcacttGTagaagtGata E R A E I K A A Y T T S Y G K S L V E V I</p>
126	<p>cactcggagacgagtGGagatttCagagaacttttaaaaatgctGctATgCGatgCCgcttac H S E T S G D F R E L L K M L L C D A A Y</p> <p>ttgcaggctactggtcTTTTtATgCCatGGatGGacttGGcagCGgtGaaagactcataaac L Q A T G L F Y A M D G L G T R E R L I N</p>
189	<p>gaaatacttctaagttcaagcaatttCgaactcGTcaatattGagcaagcatacaagttggtt E I L L S S S N S E L V N I E Q A Y K L V</p> <p>ttagccgatCGaaaatGTgatGataaacgaggcctggttGGTgatctaATcGGCGacacGCac L A D R K C D D K R G L V G D L I G D T H</p>
252	<p>ggagaataccaaaaggCGttGaaatcCTTATgagcaaaactCGTgatGaggttactCGGat G E Y Q K A L K I L M S K T R D E V T A D</p> <p>gagctaagagagggattaaaaaatgTgGaaagaccattGTgaacaagaacagGCCagaatg E L R E G L K N G K G T I V N K E Q A R M</p>
315	<p>gattGTGCCacaatacATacGGctagttCaggaaggatAGgaacGGatGaggatacagTgatg D C A T I H T A S S G R I G T D E D T V M</p> <p>aaaacaatttCTGcaacGaaatGaaatGcaattgTgGCcttagttGctGGgtatCCagaggtg K T I L Q R N E M Q L V A L V A G Y P E V</p>
378	<p>gcatttaaagatttattcGactGcatGcaatCCgaactGtcaggagatttaaaaaatctcatc A F K D L F D C M Q S E L S G D L K N L I</p>

441	<p>cttgatgcgcttgaaatggcttgtgaacgcgcaagatactatgccagggtattccgctattgc L D A L E M A C E R A R Y Y A R L F R Y C</p> <p>gtaagaggccttggtagcaagatcatcttctaataatgagacttgtagtaactcgttgtgaaatc V R G L G T K D H L L M R L V V T R C E I</p>
504	<p>gacttggcagacatcaaagtcgcgtatgaaaaggagtatggacattcacttgcagacgatatc D L A D I K V A Y E K E Y G H S L A D D I</p> <p>aaaggggatacatctggagactactgtcgcactacttttgacacttattggggaagtgTAA K G D T S G D Y C R L L L T L I G E V *</p>
567	1065

9) kontig 67961

1	<p>ATGgctttaaagtgttcacggagcagcagatgcaccttacaggtcttcacaagccaacaatc M A L K L F T E Q Q M H L T G L H K P T I</p> <p>tttacaagcatcaactttaatccctccgtagacgctgagcggttatgacagacactcatgtct F T S I N F N P S V D A E R L C R A L M S</p>
63	<p>cctgaagttcatgaaaaatgaattgatttctgtgttggcatcgcgtacttccatggaacgcatg P E V H E N E L I S V L A S R T S M E R M</p> <p>gaaatttgtcgtgtctatgaggcaagataccacgagagcttgaaaatggactctcatcgcgc E I C R V Y E A R Y H E S L K M V L S S R</p>
126	<p>acaatcgggtgatttttaggaatctcctgaggcatctcgtttcaagtccggcctatatcaaggc T I G D F R N L L R H L V S S P A Y I K G</p> <p>tctggctgcttcagagttttaagacaaggttatcaaaggagacgcgaaatcaatgagattttg S G C F R V L R Q G Y Q R R R E I N E I L</p>
189	<p>ttgctaaaacctcttactgagatataatgctatggaagtggaatatagagaagtacttttgac L L K P L T E I Y A M E V E Y R E V L L D</p> <p>aacataaatatggtaacctttactctgattagtgacgtatcaagttttgcgttaggagatcat N I N M V T F T L I S D V S S F A L G D H</p>
252	<p>agagatgccttgtactatataatgcaaaaaccgatcaggaccttagtccgatagaatggaag R D A L Y Y I M Q K P I E D L S P I E W K</p> <p>actgcagccaataaaggagcaaaacatctaatacgatcgggtgaaagtcgattcggacgcatgt T A A N K G A K H L I D R L K V D S D A C</p>

315	gcctgcacggggcacttacagatcgggaaaatataaatattggcacagttgtggaactttg A L H G A L T D R E N I N I G T V V E T L
	tttggtaataacaagttccacctaagccatcaatgacgtgtataccactaaatattctatg F G N N K F H L K A I N D V Y T T K Y S M
378	tcactgcacaccgtcctgactgaggcgttgacggtgattttcgtgatttgtgccttgccgct S L H T V L T E A L D G D F R D L C L A A
	attgaagtggctaccaatcagccgctgttttacgctcgtctactccgaagcacaatcgaggac I E V A T N Q P L F Y A R L L R S T I E D
441	cacggatatgaagatgcatactttcaaggattactcgttctacgctcagaaatcgatatggaa H G Y E D A Y F Q G L L V L R S E I D M E
	gacatcaaaggttgctatctcactgaatatggtcgaaaattatccgatgatatatgggagaac D I K G C Y L T E Y G R K L S D D I W E N
504	acaaccggctcttacagaagacttttgctaacgctgattggcgaacc TGA T T G S Y R R L L L T L I G E T *

10) kontig 67628

1	ATG ccggttaaactgttcacagagcaacaactgcatatgacaggtatttatacaccgacagtg M P V K L F T E Q Q L H M T G I Y T P T V
	cagtcgctcggctcgtttaatgcagtaacggaggctgaacgtttgtacaaggccatgaagga Q S S V S F N A V T E A E R L Y K A M K G
63	ctcggtagcaacgaaaaggagttaattgctgtccttggaaccatgttacgagtgaaacgcttg L G T N E K E L I A V L G N H V T S E R L
	gaaattgccgatgcctacgctgaaaaatacgggaagagcttaaaagcgatgtaatatccgaa E I A D A Y A E K Y G K S L K A M L I S E
126	acaagcgggtgattttaaaagtctgttgaaattctggttgaacctctttcctacgtcgatgcg T S G D F K S L L E I L V E P L S Y V D A
	tatgggtgcttcagagcaatgaagggcgtggcactcgagaaagcagctcaatcaaattttg Y G C F R A M K G A G T R E R Q L N Q I L
189	ctgggcaaatccaatccggaaatgcatgaattagaagtcgagataggcaagttctcgctgat L G K S N P E M H E L E V E Y R Q V L A D
	aataaactgccttctacacggacactagccggtgatctaatagcagaaactgcaggtggatac N K L P S T R T L A G D L I A E T A G G Y
252	

315	<p>gagaacgcgттаатgtacttgatggagaaaaagaaggatgatctgactccaaagcaatgggaa E N A L M Y L M E K K K D D L T P K Q W E</p> <p>attgctgccactagtggtgctgaaaaagtagtagaatggccgcaagtgaaagctgatgctcat I A A T S G A E K V V E W P Q V K A D A H</p>
378	<p>gctttgtataatgcaactataggacaagtgggtgccgacgcaaatactatcatgagagttctg A L Y N A T I G Q V G A D A N T I M R V L</p> <p>ttgagaaacaacaaattcaacctccaagtggttaacgtcgtcttcacagaggaacaggttca L R N N K F N L Q G V N V V F T E E T G S</p>
441	<p>ggttcacctttgtatgacgttctaagtgatgaattgggcggtgattttagaaacctgtgtctt G S P L Y D V L S D E L G G D F R N L C L</p> <p>gatgctgttgaaatggcgactgaacaacctcttttctactgtagactggtgcaacacgatg D A V E M A T E Q P L F Y C R L L R N T M</p>
504	<p>catggtatgggaaccaatgatcatagcttgacgagattaattggttcccgatcagagatcgat H G M G T N D H T L Q R L I V S R S E I D</p> <p>ttgcaaagcataaaaagactgctatcagaaggagtacaaccgtccactggcgaaggacatcgca L Q S I K D C Y Q K E Y N R P L A K D I A</p>
567	<p>ggcgacacaagcggggactacaaaaagcttctgctagctctctgtggtgaaaaaTAA G D T S G D Y K K L L L A L C G E K *</p>
567	<p style="text-align: right;">1056</p>
630	
693	
756	
819	
882	

945	
1008	

11) kontig 67135(g1-i4)

1	<p>ATGgcgagtggtgaattatgtgatttcagtcaccaaagcttgggtatcattcgaataacaat M A S G E L C D F S H Q K L G Y H S K Y N</p> <p>ggaacattgaagtcacccgtaattccttgccatcagatgatgccgaacgactttacaatgcc G T L K S P G N S L P S D D A E R L Y N A</p>
63	<p>ctaagtgaaacagtcaatgaggacgaacttattgaagttctgggcaaacgaacaatgaaggaa L S E <u>T V N E D E L I E V L G K R T M K E</u></p> <p>cgtttgaaatcaagaaagagttttttgccaaatattcaaagcccctcgctgaaatgataagt <u>R L E I K K E F F A K Y S K P L A E M I S</u></p>
126	<p>gaaaaaacaacgggggattttcaaataattcttaaaattgctcttaaaaggattctgcataactta <u>E K T T G D F Q I F L K L L</u> L K D S A Y L</p> <p>aaagcaatcgaactttttcattgtgacatgggaatttgtagcgctgaatctgtgatcactgaa K A I E L F H C D M G I C T A E S V I T E</p>
189	<p>attctgttgagttgtagcaatgctgagatctctcaactcgagcaagcctacaagaagttttg I L L S C S N A E I S Q L E Q A Y K E V L</p> <p>gctgaaaataattgtgattcagagagaaatttaatcgccgacattgaaaatattgtcgaggct A E N N C D S E R N L I A D I E N I V E A</p>
252	<p>gacgtcttgaccatataaaattttcttctgatgggtactcgtgacgaatataaccgataaagag D V L D P Y K F L L M <u>G T</u> R D E Y T D K E</p> <p>ttggaatttggaatgagggctggggctgacgcaatcgatcatcaggataaagtcaaggctgat L E F G M R A G A D A I V H Q D K V K A D</p>

315	ataaaagcaatatacaggcactcattgaccataatcgggacatcccaactgtgatgaacata I K A I Y E A L I D H N R D I P T V M N I
378	atdddgcgatgtactgaaattcaactggtggcgacagcaaatgcattctttgaggaatataaa I L R C T E I Q L V A T A N A F F E E Y K
441	gaaactctgtataattacctacactttaacctttcggggcagttcaattcaatatttatgaca E T L Y N Y L H F N L S G Q F N S I F M T
504	gcagtttacatagctcttgagcgtaccacatactatgcacaccaaaccgacacgcaaagcaa A V Y I A L E R T T Y Y A H Q I R H A K Q
567	caacgcctaaagggaccaaactatcgtttaatgcgattaatagcaactcgatgtgagattgac Q R L K G P N Y R L M R L I A T R C E I D
630	atggccgaaattdtaatggactatcagaagtttagccgctcgcaactgtctaaagatcttgac M A E I L M D Y Q K F S R S Q L S K D L D
693	acatatgcagaaggacccgtgaaacgactttattdaacattattaggtgaaccagca TAG T Y A E G P V K R L Y L T L L G E P A *
756	
819	
882	
945	

1062

1008	
------	--

12) kontig 67135 (g1-i2)

1	atggcgagcaaaaatTTtagtgatttcagtcaacataagcttgggtatgagtcgaaatacact M A S K N F S D F S Q H K L G Y E S K Y T
	ggaacaatgaagtcacccggcaattcattgccatcagttgatgccgaacgactttacaatgcg G T M K S P G N S L P S V D A E R L Y N A
63	ctaagtggaccagtcaatgaggacgaaattattgatgtgcttggcaaacgaaaaatgaaggaa L S G P V N E D E I I D V L G K R K M K E
	cgtttggaaataacgaaagagTTTTtgcaaaatattcaaagccactcgatgaaatgataagt R L E I T K E F L A K Y S K P L D E M I S
126	gaaaaacaatgggggattttcaaatattctcaaaattgcttttaagggactctgtctactta E K T M G D F Q I F S K L L L R D S V Y L
	aaagctgtcggctctttttcattgtgagttgggactttgtacggctgattatgtgatcaatgaa K A V G L F H C E L G L C T A D Y V I N E
189	attctgctgagttgcagcaatgctgagatcgcgcaactcgagcaagcctacaagaagTTTTg I L L S C S N A E I A Q L E Q A Y K E V L

252	gctgaaaataattgtgatttaactagaaaatttaatggccgacttcgcaaacgtggttcaaagt A E N N C D L T R N L M A D F A N V V Q S
	gatgtattggagtcataataaattacttcttcgcggtactcgtgatgaatttaccgaggacgag D V L E S Y K L L L R G T R D E F T E D E
315	ttaaaaacttggattgacgtctggggttgacacaatcgtaaatacataaaaaggccaaggctgac L K L G L T S G V D T I V N H K K A K A D
	ataaaagcaattcatgacgccctcgctgaccataaacgagatttctcgactgtgatgaatata I K A I H D A L A D H K R D F S T V M N I
378	attttgcacgatctgaaattcaattggcggcaaccacaaaagcgttcttccagagaaaccgg I L Q R S E I Q L A A T T K A F F Q R N R
	cagatcgttgcgatgactgacaaggaatataacgaatctctgcttaatttcttagaattacac Q I V A M T D K E Y N E S L L N F L E L H
441	ctttcgggagatttctgctcaattattctgacagcagttgaaatagcatgtgagcgttccata L S G D F C S I I L T A V E I A C E R S I
	tactatgccaatcaaactcgtacatgcaaggcaatgtcgaacggaccgaactatcgtttaatg Y Y A N Q I V H A R Q C R N G P N Y R L M
504	cgactaatagcaactcgatgtgagattgacatggccgaaattctagtggagtatcaaaagggtg R L I A T R C E I D M A E I L V E Y Q K V
	tgcgaatcacaattgtctaaagacctcgacagatgacagaaggacctggaagcgactatat C E S Q L S K D L D R Y A E G P V K R L Y
567	ttaacattattaggtgaacaagcataa L T L L G E Q A * 1095
630	
693	
756	
819	
882	

945	
1008	
1071	

13) kontig 67135_g1_i1

1	<p>ATGgcgagcaaaaatTTtagtgatttcagtcaacataagcttgggtatgagtcgaaatacact M A S K N F S D F S Q H K L G Y E S K Y T</p> <p>ggaacaatgaagtcacccggcaattcattgccatcagttgatgccgaacgactttacaatgcg G T M K S P G N S L P S V D A E R L Y N A</p>
63	<p>ctaagtggaccagtcaatgaggacgaaattattgatgtgcttggcaaacgaaaaatgaaggaa L S G P V N E D E I I D V L G K R K M K E</p> <p>cgtttggaaataacgaaagagTTTTTggcaaaatattcaaagccactcgatgaaatgataagt R L E I T K E F L A K Y S K P L D E M I S</p>
126	<p>gaaaaacaatgggggattttcaaataattctcaaaattgcttttaagggactctgtctactta E K T M G D F Q I F S K L L L R D S V Y L</p> <p>aaagctgtcggtctTTTTcattgtgagttgggactttgtacggctgattatgtgatcaatgaa K A V G L F H C E L G L C T A D Y V I N E</p>
189	<p>attctgtgagttgcagcaatgctgagatcgcgcaactcgagcaagcctacaaagaagTTTTg I L L S C S N A E I A Q L E Q A Y K E V L</p>

252	gctgaaaataattgtgatttaactagaaaatttaatggccgacttcgcaaacgtggttcaaagt A E N N C D L T R N L M A D F A N V V Q S
	gatgtattggagtcataataaattacttcttcgcggtactcgtgatgaatttaccgaggacgag D V L E S Y K L L L R G T R D E F T E D E
315	ttaaaaacttggattgacgtctggagttgacacaatcgtaaatacaaaaaaggccaaggctgac L K L G L T S G V D T I V N H K K A K A D
	ataaaagcaattcatgacgccctcgctgaccataaacgagatttctcgactgtgatgaatc I K A I H D A L A D H K R D F S T V M N I
378	atthttgcaacgaactgaaattcaattggcggcaaccgcagaagcgttctccaaggaatataac I L Q R T E I Q L A A T A E A F S K E Y N
	gaatctctgcttaatttcttagaattacaccttccgggagatttctgctcaattattctgaca E S L L N F L E L H L S G D F C S I I L T
441	gcagttcaaattgcatgtgagcgttccatataactatgccaatcaaatcgtacatgcaaggcaa A V Q I A C E R S I Y Y A N Q I V H A R Q
	tgtcgaaacggaccgaactatcgtttaatgcgactaatagcaactcgatgtgagattgacatg C R N G P N Y R L M R L I A T R C E I D M
504	gccgaaattctagtggagtatcaaaagggtgtgcaatcacaattgtctaaagacctcgacaga A E I L V E Y Q K V C E S Q L S K D L D R
	tatgcagaaggaccctggaagcgactatatttaacattattaggtgaacaagcaTAA Y A E G P V K R L Y L T L L G E Q A *
567	

14) kontig 67135 g1-i3

1	ATGgcgagcaaaaatTTtagtgatttcagTcaacataagctTgggtatgagTcgaaatacact M A S K N F S D F S Q H K L G Y E S K Y T
63	ggaacaatgaagTcaccCGgaattcattgccatcagTtgatgccgaacgactTTacaatgCG G T M K S P G N S L P S V D A E R L Y N A
126	ctaagTggaccagTcaatgaggacgaaattattgatgtgctTggcaaacgaaaaatgaaggaa L S G P V N E D E I I D V L G K R K M K E
189	cgTTTggaaataacgaaagagTTTTggcaaaatattcaaagccactcgatgaaatgataagT R L E I T K E F L A K Y S K P L D E M I S
252	gaaaaacaatgggggattTTTcaaattctcaaaattgctTTTaaaggactctgtctactta E K T M G D F Q I F S K L L L R D S V Y L
315	aaagctgtcggTctTTTTcattgtgagTtgggactTTgtacggctgattatgtgatcaatgaa K A V G L F H C E L G L C T A D Y V I N E
378	attctgctgagTtgcagcaatgctgagatcgcgcaactcgagcaagcctacaagaagTTTTg I L L S C S N A E I A Q L E Q A Y K E V L
441	gctgaaaataattgtgatttaactagaaatttaatggccgactTcgaaacgtggTtcaaagT A E N N C D L T R N L M A D F A N V V Q S
504	gatgtattggagTcatataaattactTctTcgcggtactcgtgatgaattaccgaggacgag D V L E S Y K L L L R G T R D E F T E D E
567	ttaaaaactTggattgacgtctggagTtgacacaatcgtaaatacaaaaaaggccaaggctgac L K L G L T S G V D T I V N H K K A K A D
630	ataaaaagcaattcatgacgCCctcgctgaccataaacgagattTctcgactgtgatgaatcT I K A I H D A L A D H K R D F S T V M N I
693	atTTTgcaacgaaactgaaattcaattggcggcaaccgcagaagcgtTctccaagcttatttat I L Q R T E I Q L A A T A E A F S K L I Y
	caaatgagcgtccctattactatgcactTcaaactcgacacgcaaggccaactaggaacgcac Q M S V P I T M H F K S D T Q G Q L G T H
	caaaactatcgTTTTatgCGacttattgcatctcgatgtgaaattgacatggccgaaattT TTA Q T I V L C D L L H L D V K L T W P K F *

--	--

15) kontig 65416

1	atgcttcgatcacctcatcgtatcgctaataaagcgggctttacaaggccacaatcgaatg M L R S P H R I A N E S G L Y K A T I E M
63	actgtcggcttctcggcgtctgctgactcggaaactatacatcgagcgtacaaggaggtctc T V G F S A S A D S E T I H R A L Q <u>G G L</u>
126	gcttccggttatggcggcttaggaattggtacggatgagaaagcacttattcatgtgctgggt <u>A S G Y G G L G I G</u> T D E K A L I H V L G
189	cgacgaactaatcgtgaacgtcaacaaattgccgaatgctatcgaacttcatacaacagatta R R T N R E R Q Q I A E C Y R T S Y N R L
252	atgtacgaagacgtgatcagtgataccagccacgattttcaagatatgctgcgttacaccctg M Y E D V I S D T S H D F Q D M L R Y T L
315	aaggacaccagctacgtactggcceaagcgttggttaaggctatggacaaagttggcactcgc K D T S Y V L A K A L F K A M D K V G T R
378	gaacgtggttctcaacgaaattctattgggactaacaatcatgaattggagctagtgaagca E R V L N E I L L G L T N H E L E L V K A
441	gcctataaggaagttctcgtcgaagagggtgttcaggatgacacacgaactcttctcagtgat A Y K E V L V E E G V Q D D T R T L L S D
504	gacgaactgaccgtcctacaaatgaaagagttgctgaacggagagacaaacatgatacctgtc D E L T V L Q M K E L L N G E T N M I P V
567	aatagggagctagctctgagcgtgcaaaaatcatctacgattgcggcgaaggccgaatcggc N R E L A L S D A K I I Y D C <u>G E G R</u> I G
	accaacgaaaaacgtatctcgagatattgtacacagactgccatggcaaatgaaggcattg T N E K R I S Q I F V H R L P W Q I K A L
	gatgaagcataaccagaattgttatggaaaatcagtaattgatgccttgaagtcagaaacatcc D E A Y Q N C Y G K S V I D A L K S E T S

630	cttgactacaaacgattccttgaagatgcgtacgagtttgccgtggacaggccatcgtactac L D Y K R F L E D A Y E F A V D R P S Y Y
	gccaaaatggttcaactggtgcataaaaaggcttgggaacacgggattttacactgcaacgactt A K M F N W C I K G L G T R D F T L Q R L
693	gtaattaccggttcagagatcgatttgggttcgatttgtgaggcgtataaaaggctttacgaa V I T R S E I D L G S I C E A
	cgagagctggccgaggatattagtgatgacacgtcaggtgactaccgaaaactaatgctggcg R E L A E D I S D D T S G D Y R K L M L A
756	tttttcggaatattg <u>TAA</u> F F G I L * 1086
819	
882	
945	
1008	
1071	

Příloha 3. - Kompletní sekvence serpinů z transkriptomů *E. nipponicum*

- tučným písmem je vyznačen **START** a **STOP** kodón,
- žlutě jsou označené motivy typické pro serpiny

1) kontig 3567

1	ATG acaaaatttgctgggttcccatttgctttcgcacgaaaaagttacacttatttgtagaac M T N L L G S H L L S H E K V T L I C T N
63	tgcgttttctcagaagaacattttcgcctcggaagaatatttacatttaattaaacat C V F S E E T F S P R E E Y L H L I K N H
126	ttatgtgctcatcatgaaagcctaccgttttgcaaaactcaattgaagcagttaataaata L C A H H E S L P F C A N S I E A V N K I
189	aatgaatgtgtgttttaaaattctatggggatgatagaacaattattaaacctgaaagctta N E C V F K N S M G M I E Q L L K P E S L
252	aattttgctactcgattaatgcttatcaatgtgatgtacttcaaaggaatttgatgcagaaa N F A T R L M L I N V M Y F K G I W M Q K
315	tttgatgctactaaaactgttatgggccagtttaccgattagacaacagccaaaagacatg F D A T K T V M G Q F T R L D N S Q K D M
378	ccttttatgcagaataaggcaatgtttgctataggatactaccagaattgcagtcaccgca P F M Q N K A M F G Y R I L P E L Q S T A
441	gccgtattcccctttcatgatgattcgaatcgacgactacgaatgcttattattctgccgaac A V F P F H D D S N R R L R M L I I L P N
504	aaagttgacggactgcaacatcttttaaaacatctgtttgaaacaaatcctgaaactgataaa K V D G L Q H L L K H L F E T N P E T D K
567	ttatggttggcagaagtttttcagatggaattcaatgagactgaactgactgtaactatgccg L W L A E V F Q M E F N E T E L T V T M P
630	agatttaagtaggagcgaggataccgtggaattgagagaaatcctgaaacaaatgggtata R F K L G G E D T V E L R E I L K Q M G I

693	gtatcagcttttgatgaaagttttgccgatttgtctgtcatctgtgagtcgaggggttattt V S A F D E S F A D L S V I C E S R G L F
756	gcttcttcagcaaaacacatggctgtactggaggtgaatgaagaaggagctgaggcagctgcg A S S A K H M A V L E V N E E G A E A A A
819	gctactgcgatagaagtagaatatgcttctttccgatagaggcaaattttttattgatcatc A T A I E V E Y A S F P I E A N F L L I I
882	catttttgtggctatcctctccgcaaattgcaaattgcaacgtgcctctgttcctaggccattg H F C G Y P L R K W K L Q R A S V P R P L
945	tgt TGA C * 948

2) kontig 51568

1	ATG tgcgcttgtcctaataagtaacttagaactagtaaaaattttcagttgaattctattcacia M C A C P N S N L E L V K F S V E F Y S Q
63	tttctgcaattaccatcacagtggtgacagaaatgtcttcatttgcctttcagtgctatgct F L Q L P S Q C D R N V F I C P F S V Y A
126	gcacttggctctgttatttggtcgttccgaatggcacaacaaaggacgaaatattgacagcttta A L G L L L A G S N G Q T K D E I L T A L
189	ggattatctaaagattctataattaatcctgtagaatttatatacaagaattgctggagtcccat G L S K D S I I N P V E F I Q E L L E S H
252	ttgcttccgcacggaaaagctacacttctttgcacaaaattttgttttctcggaaagttaaattt L L P H G K A T L L C T N F V F S E V K F
315	tcgcctctagaaaattatthaaatgtgggttaaaccgcatttaggtgctcaccatgaaagtta S P L E N Y L N V V K T H L G A H H E S L
378	ccgtttgtctcaaaactcaaccgaagcgttaactcgaataaatgaatgtgtgtctaaaaaaact P F V S N S T E A L T R I N E C V S K K T
441	atgggaatgatagaacaattattaaaacctgaaagcgtacattctcttactcgattaatgcta M G M I E Q L L K P E S V H S L T R L M L
504	atcaacgtgatgtattttcaaaggaatgtggatgcaaaaatttgatgcagctgaaactgttgtc I N V M Y F K G M W M Q K F D A A E T V A
567	ggccaatttaccgattagacaacagcaaaaaggacataccttttatgcygaataaggcaata G Q F T R L D N S K K D I P F M R N K A I
630	tttggttacggattactgccagaattgcagtcaaccgcagctgtctttcattttcatgatgat F G Y G L L P E L Q S T A A V F H F H D D
693	tcgaatcgacgactaagaatgcttgttattctgccgaacaaagttgatggattgaagcatctt S N R R L R M L V I L P N K V D G L K H L

756	ttaaaacagctgtgtcaaaagaaacccggaacggataaattatggttgactgaagttttacag L K Q L C Q K K P G T D K L W L T E V L Q
819	aaggaattcaatgaggatgaagtgaatgtaataatgccgagatttaagttaggaggcgaggat K E F N E D E V N V I M P R F K L G G E D
882	acattggaattgaagaaattctgaaacaaatgggtatagtctcagtttttgacgaaaatact T L E L K E I L K Q M G I V S V F D E N T
945	gctgatttgtcagccatctgtgagattccaggtttgttgcttcttcagcaaaacacatggct A D L S A I C E I P G L F A S S A K H M A
1008	gtacttgaggatgaatgaagaaggagctgaggcggtgcatccactgcaatagaaatagccttt V L E V N E E G A E A A A S T A I E I A F
1071	ttctgtgtccggtagagagaaatTTTTTgttgatcatccattTTTTTgtggcaatcctctcg F C V P V E R N F F V D H P F F V A I L S
1134	gcaaatcaaaaactgcaacgtgcctctctttctagccattgtgtggatccagaaccttccaaa A N Q N C N V P L F L G H C V D P E P S K
1197	<u>TAA</u> *

3) kontig 68567

1	<u>ATG</u> tgtgcttctccgaatggtgatcaaagcttattgaatttctcggttgaaatttattgaaa M C A S P N V D Q S L L N F S V E I Y L K
63	tatctggaatcagcagcttcacttactgaaaatTTTTTcatcagtcgatgtagtgtttattcg Y L E S A A S L T E N F F I S P C S V Y S
126	gcactcggatggttatatgctggggctaattggacagacgaagcttgaaattctttctacatta A L G M L Y A G A N G Q T K L E I L S T L
189	ggattttcaacagatagcgatattggtaacgaccaattaaaaatataagaaaatgcattgat G F S T D S D I G N D Q L K N I R K C I D
252	ctgcacttctttgagcacaagaaatctaccttgaagagtgctaataatgctatttttgtggaaaaa L H F F E H K K S T L K S A N A I F V E K
315	cagttttgtataaggaaaacatttgaacaagttgtaaagaaacatttcaatgctcatacggag Q F C I R K T F E Q V V K K H F N A H T E
378	agtcataatttcgcttcaaatccgctcagaggcagttgataaaataaatgaatggatcaagggt S H N F A S N P S E A V D K I N E W I K G
441	gaatctaaagggatggtgcagaatTTTTTatgcaaggcagtatagatgctctcaccgggctc E S K G M L Q N F L C E G S I D A L T R L
504	atgctaataaatgtgatttattttaaagggaattggctgcagatggttgaccctaaaaataat M L I N V I Y F K G N W L Q M F D P K N N
567	actttggcaccggttcaagcttttagacaacagtcaaaagaatatacagttcatgcaacagact

	T L A P F K L L D N S Q K N I Q F M Q Q T
630	gccaaatttggttttgctgatttaccagatttgaagtcaactgcagttatattcccttttctg A K F G F A D L P D L K S T A V I F P F L
693	gacgatgataaacggcaactgccaatgctcgtcattcttctgaacaagtagatggtttgga D D D K R Q L R M L V I L P E Q V D G L V
756	ggcctattgaaacagctgtctacgaaagcccctgaaacagacaactattggctgacagaagtc G L L K Q L S T K A P E T D N Y W L T E V
819	ttgaaagaacccttctatcagactacagtagatgtaagaatgcctaaattcaagctttgcggc L K E P F Y Q T T V D V R M P K F K L C G
882	tcaaacgtggttgaaatgaaagaaattcttcaaaaaatgggaattggttcggctttcaatgaa S N V L E M K E I L Q K M G I V S A F N E
945	ggagccgctgatttttctggcatcagtgagtcggaagctctgtttgtcagcaccgtaagcac G A A D F S G I S E S E A L F V S T V K H
1008	atggccatacttgaggtgaacgaggaaggtgcaagcagccgaggcaactgcagtcagaata M A I L E V N E E G A K A A A A T A V R I
1071	caacttcgctgtatgccgattgtcagagatttccatggttgatcacccatttggttgtggctata Q L R C M P I V R D F H V D H P F V V A I
1134	ctctcagcaaccgatgacaagactgtgcctcttttctgtaggtcactgtgtggatccacaacct L S A T D D K T V P L F V G H C V D P Q P
1197	ctgtccaat TAA L S N * 1206

4) kontig 67910

1	ATG aatgtgaacgacttggaaatcgttcgacagttttctgctgatctcctcaccgtgaacgac M N V N D L E I V R Q F S A D L L T V N D
63	acacagctctctgcgggaaattttgtgatgagtcacttagtggtggccatgctcttgtacact T Q L S A G N F V M S P L S V A M L L Y T
126	ttgctgggttccgggtgcaattcgtggtgattcagctaagcaagtggcgaagacaatgcacctg L L G S G A I R G D S A K Q V A K T M H L
189	ccctcgtatagcgaagtagtgtagacacaaaactctacagttcccgttgggaactctacaaa P S Y S E S S V T Q N S T V P V V E L Y K
252	caggatgccaatacaatgaacgagcaaatggattaaatttgggtgggcccagtagcaagtccc Q D A N T M N E Q I W I K F G G P V A S P
315	gatcaactaaaccaagtggatctgtcgcagacaagaataaagcaattcaagcaagagctca D Q L N P S G S V D R T N K A I Q S K S S
378	agcgatgttcttgaaataacaatgcagtttctaaaaaacaggcttcgcagtgaggatcaca

	S D V L E I N N A V F L K T G F A V E S Q
441	tttctgacggccatagaaagaatgcacaagacgcactttgaacagttggatTTTgcaggagcg F L T A I E R M H K T H F E Q L D F A G A
504	aaagcagatgcagtagacaaaatgaacggatgggtaaataagagacaacacatggaaaaatctcc K A D A V D K M N G W V N E T T H G K I S
567	acactTTTTtaactcgccgtccgatctgccttccggtttggttcttggcctaataatgaatgTTGtc T L F N S P S D L P S G L V L A L M N V V
630	tacttcaaagatggctggaagaacgTTTTtgagaagcaggataccaaggagaacacagatTTT Y F K D G W K N V F E K Q D T K E N T D F
693	tttgTTTccgacatcgaaaccattaaagttccaatgatgcacaaatcttcaatcaagttgaac F V S D I E T I K V P M M H K S S I K L N
756	tatcatcgTTTTgaaaatcacaatttgcataatggTTgaaatacctTTaaaatccaaacgcttc Y H R F E N H N L H M V E I P L K S K R F
819	tacgTTgTTgtggcgTTaccaactaaggtgcacgagTTgccacctatcgagcattTTTctggcc Y V V V A L P T K V H E L P P I E H F L A
882	gctcaacaggagcgcgTccaatctgacgacttagctgtacgcattattgatctgaagctgccc A Q Q E R V Q S D D L A V R I I D L K L P
945	cgTTcaagTTggacagtgaaatcaatttggataagcctcatgcaatcaactcggttgcacagac R F K L D S E I N L I S L M Q S L G C T D
1008	atTTTcaacaccgCGgaaggcaaatttCACgggcattTctcacgaagctcgactgTTTgtacaa I F N T A K A N F T G I S H E A R L F V Q
1071	acaatgatgcagaaagcagcgcttcgtgtcaacgaggatggcattgaagccgctgcagctaca T M M Q K A A L R V N E D G I E A A A A T
1134	tacgcgctgatcaatttggccagtttatttatggcccacggtgagacaattcagttccacgta Y A L I N L A S L F M A H G E T I Q F H V
1197	aatcaaccgTTtctacttgtcggTgcacgacagtcagaccggacatctgccggtgTTTgtggct N Q P F Y L S V H D S Q T G H L P V F V A
1260	cgtattgacagaccaagtgtcttTAA R I D R P S V L * 1284

Příloha č.4. Kompletní alignmenty annexinů *E. nipponicum* s annexiny ostatních parazitů, vč. antikoagulačních

ANXB2.T.solium MNT----RSSQYDCNGPFRPTLKPNNFVDNADVEALCKSMRCWGTDEETITKILGKRTS
65416g1i1 -----MSHRINESGLYKATIEMTVGFSSASADSETHRALQGIGTDEKALIHVLGRRTN
ANXS.bovis MVSEFGITRHAFDPHGHYTPTIKPTTGFSSASADAERLHRAMKGGPDTETAIIINILARRTN
67135g1i2 MKNFSDFSQHKLGYESKYTGTMKSPGNSLPSVDAERLYNALSGP-VNEDEIIDVLGKRKM
64072g1i1 MKNVAVQIGLHQLGYEHSYSGTLTKTVVGSASGDAERLFKAMKGLGTDEAELCDVLGRRTF
67961g1i3 -MALKLFTEQQMHLTGLHKPTIFTSINFNPSVDAERLCRALMSPEVHENELISVLASRTS
63027g1i1 -MSFPVFSFQQIGYRGLYTPTVFVDSRCQYENEATRLEFKAMKGLGTNEKELIDVLGTRPS
ANX.M.sebastis MPGFSVFHMQQVGLNCFYEPSITAVQNFSSASADAQKLDAMKGGFTDEKTLIEVLGKRVS
67628g12i1 -MPVKLFTEQQLHMTGIYTPTVQSSVSNFNAVTEAERLYKAMKGLGTNEKELIAVLGNHVT
39626g1i1 -MQRNITSLHQLAADGFYEATIIYPSLGFSAITVDIERLYKAMKGLGTNEKELIAVLGNRTL
51242g1i1 -----MQSIKPLDAFVPTVVAKNFNPEYEADRLKKAFAKGLGTDEMEVNRVLGEITL
ANXB2.S.mansoni -----MHQTGPSITFPDRISAENDAEQLHNACKGLSTDEETITKILGHRNL
58980g1i2 -----MSALSSLVARFRGTVPVENFNPEEDAMTLRSFAKGGIGYNAKPIIEIFGRRNY
H.microstoma -----MTLQQLQTNVWGNRPSILPWSSFNQEYQDAKDLHEAILGLESNDKIVNILAKRTV
60438g1i1 -----MLTLKQVYASGHANPTLRPRADFNAEEAAKGLKAAMDGVGTDEYTLINILGTCSS
ANX13.S.japonicum -----MSKIQIIGPNGIYQPTLKIQRNNDPNKDAEVLYEAMKGGWGTNEDRIIGILGYRSS
62895g2i2 -----MKGLGTDEKAIIDVLASKTS
56172g1i1 -----MDEITLADVITYPTVRPVDVFNPENDAECLRRAMKGLGTDEKAIISILANRSA
ANXB3.T.solium -----MATVKPFRCFNANEDAQELKAMKGGIGTDEATIIDVLNRTS
A.aegypti -----MSQYYTPTVYPADPFANEDAAATLRKAMKGGFTDEKAIIEVLARRGI
A6.C.sinensis MGDLSAWNFAQLGYPGGYNPTLRYPNPNPDQDCEKLRKAMKGGVGTDEKAIIDVLAHRTA
ANX2.H.sapiens MVHEILCKLSL---EGSTYGSVKAYTNFDAERDALNIETAIKTKGVDEVTIVNILTNRSN
ANXA1.H.sapiens MVSEFLKQAQTV---SSKGGSAVSPYPTFNPSSDVAALHKAIMVKGVDIETIIDILTKRNN
ANX5.H.sapiens -----MVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLTTSRSN
A3.H.sapiens -----MIWVRGTVRDYPDFSPSVDAEAIQKAIKGGTDEKMLISILTERS
: ::

ANXB2.T.solium EERLQIVSLYKQKYGRELAHDLGDLDLKGHFRDCTILLTEDPIYLMAKSLYYAMKGGVTNE
65416g1i1 RERQQIAECYRTSYNRLMYEDVISDTSDFQDMLRYTLKDTSYVLAKALFKAMDKVGTRE
ANXS.bovis YERQELCRSYKSLYKHDLDKDDLKSETSGDFRQVLCQIVVDTPYMLAKSLYYAMKGLGTND
67135g1i2 KERLEIKKEFLAKYKPLDEMISEKTMGDFQIFSKLLLRDSVYLKAVGLFHCGLCTAD
64072g1i1 KERAIEKAAAYTTSYGKSLVEVIHSETSGDFRELLKMLLCAAYLQATGLFYAMDGLGTRE
67961g1i3 MERMEICRVYEARVHESLKMVLSRTIGDFRNLLRHLVSSPAYIKSGCFRVLROGYQRR
63027g1i1 FQRAEIRETFERQHRKQLLAEIKSECSGDFRELLVMLVQDISYVEASGLFHAMKGGVTRE
ANX.M.sebastis FQREEIADAYLRDRKPLLEDEVKSETSGDFRETLLVLRDRLLFVEAQGMHKAMKGGTSE
67628g12i1 SERLEIADAYAKEYGKSLKAMLISETSGDFKSLLEILVEPLSYVDAYGCFRAMKAGTRE
39626g1i1 TERFEIKELYHVKYKTLRDAIRSETSGDFRDLLEMLLELPEAHVDAIGLQRALKWSKNKQ
51242g1i1 DQRHDIADLYLQYKPLDEELKSELSGDYMLVEGLLNPTEIALLRDLFVALRKSKEPNP
ANXB2.S.mansoni QQRYQIRETFHRRYKDLVHVLCSSTKGDYESLIKTLFRGSIQILAHDLYKGLK----KP
58980g1i2 EQRIQIHEAYERMDFRNFISDLKSELRGSFERTCRCLLSYVEFDEYNLMKATEGYGSIS
H.microstoma SQRKEIAASYQTQFEKTLIEDLAQSLPDSLQNVALLSSLKSVPELKAYALHKAMKGGITIE
60438g1i1 DQRQVLRQTFKAHYGSELIDELKSELSGDFERLVVLLLYSWDEMYARIILFEAMDGAGTDE
ANX13.S.japonicum HQRIIRDQFKALYKDLITELSETSGHFKLLKMLLTDTKMNARALYKAMKGGGTDE
62895g2i2 CERQKMRVAFKATYGRDLVENLEKELSGNFRKLVRRMMMPRMLLASLLYDATDGIQTR
56172g1i1 SQRQEIQYFHCFCFKDLDAELSELSESGNFKLVQKLMGRYELLASILHEAISGLGTTE

ANXB3.T.solium SQRREIVKAYKAQYGKDLKERLHKELSGNFRQAVIEWSLYDRAHVNAALQKAMKGAGTNE
A.aegypti VQRLEIAQAFKTAAYGKDLISDLKSELGGKFEDVILALMTPLPQFYAKELHDAISGIGTDE
A6.C.sinensis DQRVQIVKKFKTAYGKDLIHELKSELGTFEDVIVAMCYSLEEFDARELRRAMEGAGTDE
ANX2.H.sapiens AQRQDIAFAYQRRTKELASALKSALSGHLETLLGLLKTTPAQYDASELKASMKGLGTDE
ANXA1.H.sapiens AQRQQIKAAYLQETGKPLDETLKKAALTGHLEEVVLALLKTPAQFDADDELRAAMKGLGTDE
ANX5.H.sapiens AQRQEISAFAFKTLFGRDLLDDLKSELGTFEKLIVALKMPSRLYDAYELKHALKGAGTNE
A3.H.sapiens AQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVTPPAVFDKQLKSSMKGAGTNE
:* : : : :

ANXB2.T.solium NTIIEIIVGCTNEEINKLKQFYIYVLKRTLETDIRTETGYFCMMLLQLLKGDIPDPDPE
65416g1i1 RVLNEIILLGLTNHELELVKAAAYKEVLTRTLLSDVRETSGDYREALEIMEGRDELTVL
ANXS.bovis RVLIEIFFTLWNETRAVADAYKQVLEERSLVTDMMKEISGDYFYALICLVQADRDEIPVL
67135g1i2 YVINEIILLSCSNAEIAQLEQAYKEVLTRNLMAFANVVQSDVLESYKLLLRGTRDEFTE
64072g1i1 RLNEIILLSSNSSELVNIQAYKLVLRKGLVGDLDGTHGEYQKALKILMSKTRDEVTAD
67961g1i3 REINEIILLKPLTEIYAMEVEYREVLFTLISDVSSFALGDHRDALYYIMQKPIEDLSP
63027g1i1 RRLNQILIGKSNDLIGITEAYQLVLRVLLDDIRTETSRSYKLLANMVKGRQEFGPS
ANX.M.sebastis RRLNQILMGKNNADLERLSEYYQLVLRNRTLIGDVNSETSGQYRHALCYMLDYKRDEYAGD
67628g12i1 RQLNQILLGKSNPEMHELEVEYRQVLTRTLAGDLIAETAGGYENALMYLMEKKKDDLT
39626g1i1 RGINQILLGKTNMEMMSLEKYYHELGRSLPLDLMAVSDGFYEKSLMLIMEKRKDLTDE
51242g1i1 AILNEIIGCANNHEIMEIQMAYSMI-KRSLLEDALASSFKGDYNTLMQALLTRCQDDPE
ANXB2.S.mansoni DIVNEIICCCNHEIMMLKAYQEVLQRTLESDIKETKPPYEQLLVALLQARRDEDPPE
58980g1i2 DIIMEIYITRSHRHINKLMLSLRKNAGKELSEFVELVEDPRIKSILKGITWTKFHDID
H.microstoma QVLIQILAVASNNEIQQIKEAYTRVFNRLDEADVSIKTNLEFQRLMLFLKAGRNED
60438g1i1 AAIIIMLLCTLPQAEIEVVKETKYRVLRSRTLESDIKSELSGDLEKLMVALLQCPQPGVDSE
ANX13.S.japonicum STIIEVLCTSSNCEIEDIKTAYQSVLRRTLESDEDDLSGPFKNLVIALLQAKREEIPFE
62895g2i2 SLIILILCNLTNQEINDVLEKYLKAYHELGRSLPLDLMAVSDGFYEKSLMLIMEKRKDLTDE
56172g1i1 SDIIMVLCLISTDEMOTVKEIYNEKFKRSLQDDDLKGDLSGDFEKLMIALTVGCREEPSPE
ANXB3.T.solium GMLIDVLCATNNEVKKIKEAYEDLTQKSLLEDDVESETSGNFKRVLVALLQARRETA
A.aegypti EAIIEILCTLSNYGIKTAIEAFYEQLYGVSLESDLKSGAFKRLCVSLVQGNRDN
A6.C.sinensis QTLIEILCSRNAQIRKIKEYVHTIFGRDLEKDLNETHGHFKRILLIIVQANRDN
ANX2.H.sapiens DSLIEICSRNTQELQENRVYKEMKYTDLEKDISDTSGDFRKLMLVALAKGRRADG
ANXA1.H.sapiens DTLIEILASRTNKEIRDINRVYREELKRDLAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSED
ANX5.H.sapiens KVLTEIASRTPPEELRAIKQVYEEYGSLEDDVVGDTSGYYQRMVVLQANRDPD
A3.H.sapiens DALIEILTRTSRQMKDISQAYTYVYKSLGDDISSETSGDFRALLTLADGRDES
: : : * . :

ANXB2.T.solium QLRTIQQKGGDLMVNQKEVTAAVKQIVEALAKPKNSTNSVLLNAFQHKNVWEIAAMDKEY
65416g1i1 QMKELLNGETNMIVNRELALSDAKIYDCGEGRICTNEKRISQIFVHRLPWQIKALDEAY
ANXS.bovis QLKAIPKGINSIINHELAEADAKDLYASGVGRVGTSEKRITRVICNRTPYQLYLTSIY
67135g1i2 ELKGLTSGVDITVNHKKAKADIKAIHDALADHK-RDFSTVMNIIQORSEIQLAATTKAF
64072g1i1 ELREGLKNGGKTIVNKEQARMDCAIHTASSGRICTDEDTVMKTIQORNEMLVALVAGY
67961g1i3 EWKTAANKGAKHLIDRLKVDSDACALHGALTDRENINIGTVVETLFGNNKFHLKAINVY
63027g1i1 DDLAIHNGAHSVLDQRQVSLDVETLYNVTAGQQGANEVIVETMSYRSYLHLQAVFAQF
ANX.M.sebastis SMRTAIDRGGASVIDERLVQDDARIVYECLTSRD-KNLDPVCQILFTRSYIHVEALCKEF
67628g12i1 QWEIAATSGAEKVVEWPQVKADAHALYNATIGOVGADANTIMRVLLRNKNFNLOGVNVVE
39626g1i1 ECRRAMHNGVQSVLNVKARKDKVDFKSTAAQVGADEATVMQILCRHEWDIQLICRLY
51242g1i1 KVLAFTMDLRILVNMNQLQNDVAKLTKALTGTL--DAQTLINILTRSKHTVIRGICELF
ANXB2.S.mansoni LVEEAITRSTSRVSRVQVDDKVEDLYYAGEKRAKDSDTFIKILTRSKYHVKEIWDLY
58980g1i2 -----TILDKQLAVLDAKKILKAAEDKLCDEAVITKILTLNTEGQIROTKEY
H.microstoma -----LIVDGARVNDAFMINKFGRRIYGNARIVGNILTRSGHIKILAYYY
60438g1i1 DLRAFAEKRLSDLINADQADADLYNAGEGKWTDESTFISVLNRSKYSYLWATNEIY
ANX13.S.japonicum IAEQIQSKGIKSVVDMNLVEQDVETLWDAGEARLGTDEAAIIKILVSRVWHIQAIAQH
62895g2i2 LV---ASROLEQLLNAPDIENDVNDLVRAGEGRGTDEDTFIRVLTSRNYWHLARLNQRY

56172g1i1 QFSIARKRDYSQVLVDSEQVKKDCLDILEAGERRLGTDEDTFIRILARRSLWHLEALNDAY
 ANXB3.T.solium -----CDKSQAREDALEIFKAGEDKLGTTDESTFTRILCTRSHDQIRVINEVY
 A.aegypti -----TGVDGAAAADAQALFEAGEGQWGTDESIFNQILVTRSYQQLRAVFDAY
 A6.C.sinensis -----PNVDMNAVNDVRLAYEAGEKQLTDESTFNRIIVSKSEAHVRAVINAY
 ANX2.H.sapiens -----SVIDYELIDQDARDLYDAGVKKRGTDPVPKWISIMTFERSVPHLQKVFDRY
 ANXA1.H.sapiens -----FGVNEDLADSDARALYEAGERRKGTDVNVFNTILTRSYPOLRRVFOKY
 ANX5.H.sapiens -----AGIDEAQVEQDAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFQKY
 A3.H.sapiens -----LKVDEHLAKQDAQILYKAGENRWGTDEDKFTEILCLRSFPOLKLTDFEY
 . : . : . :

ANXB2.T.solium KKASGKGLISAISEAVEGEFGTLLMAMVQHAVDRPKFYSEALYQSMVGGTTRDFLLMRVL
65416g1i1 QNCYKGSVIDALKSETSLDYKRFLEDAYEFVDRPSYAKMFWNCIKGLGTRDFTLQRLV
 ANXS.bovis FKMYGKTLLEHIESETSGDYRKLLVAILRYAIDRPLIAEWLHDSMAGLGTKDYALMRLI
67135g1i2 FQRYNESLLNFLEHLHSGDFCSIILTAVEIACERSIYYANQIVHARQCRNGPNYRLMRI
64072g1i1 PEVAFKDLFDCMQSELSGDLKNLILDALEMACEARARYARLFYRCVRLGTLKDHLLMRVL
67961g1i3 TTKYSMSLHTVLTALDGDGFRDCLAAIEVATNQPLFYARLLRSTIEDHGYEDAYFQGLL
63027g1i1 EQRYDTSFYDVLSDLSGDFRNACLDIFECCERDLYFARLLRCTTRGLGTDKQDLMRLV
 ANX.M.sebastis AMAYNLALYDVCDAELSSDFRNVLVDLLEYCEERSLYFARLIRSTMAGLGTKDDDLMRI
67628g12i1 TEETGSPLYDVLSDLSGDFRNCLDAVEMATEQPLFYCRLLRNTMHGMLGTNDHTLQRLI
39626g1i1 QEMNSVQLYDTLDAELHGTFRDFCLDALEYSTERPLYARLLRQTTIGLGTKDHTLMRLI
51242g1i1 QNDNKIHLVDCITENVPEPLRSGLNTVVMGLIDLRLLLVLCQLMESFOGKGTREETSRII
 ANXB2.S.mansoni LAKYHNTIVEVISKKSEPFRRSGLNTMIMALMDLRLLLVLCQLYDSMYGLGTREDTLIRIT
58980g1i2 NKIAAIPLIETIKREVKGELRKTMDIVLWCTNHALYFSRKINKSIVGYGTNERDLRYI
 H.microstoma KKTYGKMINKYIIDELSGNYCRTLLSTVMYAEHPTELYASWIYDAIKARGPNNDLIRLI
60438g1i1 KEKYGHSIVDAVCSGDFKRALKLLFSSQLDPKGTAAALFKKSMGLGTSKQMLMFLV
 ANX13.S.japonicum EKKYKSLIDSLASETSGDFESALLTLNLTCLNRPKAYADLLKAMGLGTDDCTLMRII
62895g2i2 QAKYGRDLIKAVENETSGDFKALLTILESAVNRPYFAKQLKHAMEGVGTNDQYLMIAIV
56172g1i1 LKETGHDLYTAISKETSGOFKTAAMTILDAATCRVOYFANVLKKTMLGTLDDRTLMNVI
 ANXB3.T.solium EDEAGHDLIKAIKETSVDYKVLRSIVLMSKDPITVADMLYRSMKAGTKDSDSLIRII
 A.aegypti EGMAGHTVEDAIKREFSGAIEEGFKAIVRCVRSKVQYFAKRLHSSMAGLGTNDKTLIRII
 A6.C.sinensis ASVSKKDFEDALKSEMGGDLKAFLSITRSIRNKPAYFAKQLKEAMEGAGTSDRQLIRIV
 ANX2.H.sapiens KSYSPYDMLSESIRKEVKGDLNFAFLNLVQCIQNKPLYFADRLYDSMKGKGTDRKVLIRIM
 ANXA1.H.sapiens TKYSKHDMNKVLDELKGDIEKCLTAIVKCATSKPAFFAEKHLQAMKGVGTRHKALIRIM
 ANX5.H.sapiens MTISGFQIEETIDRETSGNLEQLLLAVVKSIRSIPAYLAETLYYAMKAGTDDHTLIRVM
 A3.H.sapiens RNISQKDIVDSIKGELSGHFEDLLAIVNCVRNTPAFLAERLHRAIKGIGTDEFTLNRIM
 . : . :

ANXB2 T.solium ILRSEIDLLDIKETFDKDH-KSLAEWIKGETSGYEQLLLALLNE
65416g1i1 ITRSEIDLGSICEAYKRLYERELAEDISDDTSGDYRKMLLAFFGI
 ANX S.bovis ITRSEIDLQDIMNPYESIYGKSLNNAVIDDTSYRRTLCVLLGE
67135g1i2 ATRCEIDMAEILVEYQKVCESQLSKDLDRYAEGPVKRLYLTLLE
64072g1i1 VTRCEIDLADIKVAYEKEYGHSIADLADIKGDTSGDYCRLLLTLLIGE
67961g1i3 VLRSEIDMEDIKGCYLTEYGRKLSDDIWENTTGSYRRLTLTLLIGE
63027g1i1 VTRSEIDLGSIEDAYQAEYQTLMAIEGDTSGDYRKLLLTLLCGQ
 M.sebastis ITRSEIDLASIMAAESTYRKTMDIDIKGDTSGDYQRLLLALCGC
67628g12i1 VSRSEIDLQSIKDCYQKEYNRPLAKDIAGDTSGDYKLLLLALCGE
39626g1i1 VNRAEIDLGSIMKAYQTEYQTLIEAISSDTSGDYKLLLTLLCGV
51242g1i1 ILRSELDLENLKEFNKAKFDKSLPEYIKAETKGELOQLLLTLTGD
 ANXB2 S.mansoni CLRCEVGMNTLKSMYREYFGKPLIEAVREDTSGDFRKLIVLALLGE
58980g1i2 TGRCEIDMIDIKDTYMELYNRSGLTDIKNEAISEFKLLLCVLIDE
 H.microstoma LSRAEIDLQNIKEAYERMSEKTLIEDIEEATSSEYKNMLVALIKG
60438g1i1 VDRCEIDLKDIMQHYEEINGQSLVERIASETSGDYRTRLLLLCGE
 ANX13.S.ja VSRCELDLGSICHEFERSQSSLEEWIRSETSGDYRKLLLLALIGA
62895g2i2 VWRSEIDMVDIKENFSKLCGKSLESWISSDTSGDYKMLLLALVRG
56172g1i1 VWRSEIDLDIRQAFQELTGESLEKWIKSDTSGDYKALLLELISG
 ANXB3 T.solium LAHSEDNLRKIQNKFDITYEKSLVEMISGDTSGDYKFLLAILE-

A.aegypti	VSRSEIDLGDIKEAFQEMYGKSLESWIKDDLGS DLGNLLAELASY
A6 C.sinensis	VTRAEVDMADIKREFLQAYGKSLEAWISANSVGD--PVMCVMLPR
ANX2 H.sapiens	VSRSEVDMLKIRSEFKRKYGKSLYYYIQODTKGDYQKALLYLCGG
ANXA1 H.sapiens	VSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLQAILDETKGDYKILVALCGG
ANX5 H.sapiens	VSRSEIDLNFIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTSGDYKALLLLCGE
A3 H.sapiens	VSRSEIDLLDIRTEFKKHYGYSLSAIKSDTSGDYEITLLKICGG
	::* : : : : : . :

AA alignmenty annexinů *E. nipponicum* s ostatními organismy vč. annexiny s prokázanou antikoagulační aktivitou

žlutě vyznačený opakující se motiv (KGxGT), **modře** annexin doména

tučně a podtržené - sekvence z *E. nipponicum*

Organismy(accession no.): ANXB2 *T.solium* (Accession no:AAF64166.1), ANX *S.bovis* (ACC78610.1), M.sebastis (ACD93001.1), ANXB2 *S.mansoni* (AAC79802.3), *H.microstoma* (CDS26513.1), ANXB3 *T.solium* (AAF64166.1), A.aegypti (ABF18321.1), A6 *C.sinensis* (GAA48217.1), ANX2 *H. sapiens* (NP_004030.1), ANXA1.H.sapiens (CAG28612.1), ANX5 *H. sapien* (NP_001145.1), A3 *H.sapiens* (NP_005130.1).

Příloha č.5 - Kompletní alignmenty serpínů *E. nipponicum* se serpiny ostatních parazitů

A.aegypti	NEFSWNAFKKV-FTDYKENFVMSPYSLRRLFCFQASAGTNLQOELSNVLIKIVPNQQPSQ
A.albopictus	NEFTWIAFKKV-SADYKENFVMSPYSLRRLFCFQAGAGTNLQOELSNVLIIVPNQQPSQ
67910i2	RQFSADLLTVNDTQLSAGNFVMSPLSVAMLLYTLLGAI RGD SAKQVAKTMHLSVTQNSTL
6791i1	RQFSADLLTVNDTQLSAGNFVMSPLSVAMLLYTLLGAI RGD SAKQVAKTMHLSVTQNSTL
S.mansoni	NVFARDLLDIS--ATGTNDYLSSPISVFLLLTLLGGPKGNTKVVQIAEALDDTKEYQK
S.japonicum	KAFTRAFLSQSTVDFGEDNFLASPLGVLFITLIGILLGGAQKTSYQIAKTMRLWNISETQQ
Hc-serpin	TDFGLSMLRCV---PSNVSLVSPISVIFTLAMVHVSGKGTTRFEIERVLSKGADTEGFY
T.suis	AEFGWNL YNTQ----TDSSVFLSPISVYLALSMVYLGAVGNLKKEMHNVMSFGMTE-Q--
T.spiralis	TEFIWKLFQKISSKKVSECIFLSPMSVLLAIGMAYFGAAGKTKLEIQRAIFGDTAKEK--
An.simplex	ADFAWNLLEA--SGPQTFIVLSPFISISIALAMVYAGAE GNTKTQIGNTIAKGVNND S--
IRIS	NQFGLRLLNTL-PSPPEENVFFSPYSVSTALGMAYAGARGDTQEELSEQLGYTAAGLSQD
S.haematobium	-----MVLSGSALNTKAEIMKTMQLSECLEH-D
P.westermani	SQFTVDSYDKIKQGDLSLNVFVSPLSIYTAIVMTMAGADGKTRTEIESALRIPKQLLA-T
C.sinensis	CNFAVDLYRQIKQGVNLSNVFISPLSIYTAIVMTMAGADGQTKNEILTSLHLSKVA----
E.multilocularis	IPFTQALYAQLQPSSEGRSNFFMSPLSVYSALSLALAGSESETREELVSVLGLAPGKDI-D
68567i2	LNFSVEIYLKYSAAASLTENFFISPCSVYSALGMLYAGANGQTKLEILSLTGFSTDSIDGN
51568	VKFSVEFYSQLPSPQCDRNVFICPFSVY AALG LLLAGSNGQTKDEILTALGLSKDSI--I
3567	-----

A.aegypti DHRPYVEQWVRYSS-----AKYLNRTAMAVAIGSEKVESTVYESIINNYTGHL---QPSNA
A.albopictus DHRPYVDQWLRNAN-----AKQLNRTAMAVAIGSEKASSIFDSITNYTGYL---QPSDG
67910i2 NPSGSDVRTNKAIQSKSSSDVLEINNAVFLKTGFAVESQFLTAIERMHKTHFEQLDFAGA
6791i1 NPSGSDVRTNKAIQSKSSSDVLEINNAVFLKTGFAVESQFLTAIERMHKTHFEQLDFAGA
S.mansoni LASRTFALLYHNLNTEEGKQVISISINGMFLQNETKIKPHFLTRMKNI FHNDVFNVDFTKA
S.japonicum EMKSLYKELSDSLTMENTVKKVAISTGVFTETSVDERRLNESIADSSQGVVLKQVDFTNQ
Hc-serpin SVEGYARLNFNRIENRGHGASSRI FNRFFLNKRADVEMEYEAASMLSLYNAKIDRMDFGTA
T.suis QIESSWQLMMKSIQSTESSMTFNLANRLYASDNTKIQQTYKDALKTYLKANIKLVDFADV
T.spiralis DVRALFVEINKILTTESKVKLLVANCVYIQEGFKLLTPYVEDIKK-ISSDIIEVDFMDI
An.simplex ALIDYFSSAAEQMDKTTAGFQLNTANKVYIQDKFEILKSFENI IKQKFASEIQQVDFEAN
IRIS DVFNAYS DHTQWLKASRSNSTLSVANAAVLHDKVGLRYTFQRTIDHAFDADILKVDVNE
S.haematobium KVHSGISELLNNS--ERGVNII LSSGLFVERDVSIKQQFEIYLKTYNALIEHMTFQTD
P.westermani CPHGPIGTTLQTFKPSSEGVQLSLANRLFVVQPATIIVEQFKQILT KDYDASIEQICSLPS
C.sinensis NPNEAVGSIVQHLYLQSKTGVELALANRLFALRSVAVLPEYSQLIGKVVNAATEELSKLPS
E.multilocularis TIVKSLGENLQAVADGAKKTLVEANGVFIQAGSQIRETYTSAVSKHLKADMKQLDFGGD
68567i2 DQLKNIRKCIDLHFFEHKSTLKSANAFVVEKQFCIRKTFEQVVKHFNHAFESHNFASN
51568 NPVEFTQELLESHELLPHGKATLLCTNFVSEVKFSPLENYLNVVKTHLGAHESLPPFVSN
3567 -----TNLLGSHLLSHEKVTLICTNCFVSEETFSPREEYHLIKNHLCAHESLPPFCAN

A.aegypti -QRMGQVINDALKNI TNNAVQSYLTDTDINPNWKF FAIDSWQFEGLWFKFQEEFSATCY
A.albopictus -QRMGQVNDALKKI TNNSVLNVLADTDINPNWKF FAIDSWQFDGLWYKYSQEEFTATCS
67910i2 KADAVDKMNGWVNETTHGKISTLFNSPSLPSGLVLALMNVVYFKDGWKNVFEKQDTKEND
6791i1 KADAVDKMNGWVNETTHGKISTLFNSPSLPSGLVLALMNVVYFKDGWKNVFEKQDTKEND
S.mansoni -EDARKNINEWVSNKTSHLIPTVLKE-PLPPTLLGLINTLYFKGKWKPF SNHSTTEGE
S.japonicum -TNAAQDINKWVNEHNSGLVEEFITD-DIPKDAWMLINI FYFRDYWENPFVPPYTSLEN
Hc-serpin -NKTAWIIAGHICASTDGKICGMVKEENVKNMFSL-VVNTNHFTGEWKF KFDKSSNSKGT
T.suis -SETRKRINHYVAKKTNGKITSVSD--FDEYIRLLMINVIYFKAQWLTEFCYETKMAP
T.spiralis -KEARLVINQWICNKTERKIENLIPGGLLOPITTSVIANAIYFKAQWARRFEQNTVNSD
An.simplex -RETAELINAWVEKKTNSRIRNLVQPMQLSAQTAMALINAIYFKGDWKT KFNASTTKKM
IRIS RKGAVDRINYVVKDKTNGKIRSLFNKP-LESETRLVLLNAIYFKGSWNTFRNKSRTKSE
S.haematobium IECARKRINKWVSEQTNGKIQQLLSPGSLKEDTRVVVLLATTYFKGLWKSAPVRNSHVDK
P.westermani DEAKRQHINKWTSSENTGQKITELLPTGAVNADTVLALVNELYFKGMWKNQFDRKRTLHED
C.sinensis NDAKREHINKWVADNTANKITSLLPSGSI TNDTVLSVINALYFKGNWNSPFIKERTTMEI
E.multilocularis SEGSRISINRWIAEKTRKVKDLLAQGSI TPMTHVVLANAVYFKGVWCKCFEKSKTDRSV
68567i2 PSEAVDKINEWIKESKGLQNFLECEGSDALTRLMLINVIYFKGNWLMQFDPKNNTLAP
51568 STEALTRINECVSKKTMGIEQLLKPEVHSLTRLMLINVMYFKGMWQKFDAAEATVAGQ
3567 SIEAVNKINECVFKNSMGIEQLLKPEVINFATRLMLINVMYFKGIWMQKFDATKTVMGQ

: : : . * *

A.aegypti FYASREKKGLTKFLYLEEMLKYGNFPEWNVQAVELPYHDQPLSCLLMMPLD-GNYESLIH
A.albopictus FYASKDDKLTFLYFEEVFKYGYFPELNIQAVELPYHDKPLSCLLMMPLN-GGVDLSVN
67910i2 FVSDIETIKVPMHKS IKLNYHRFENHNLHMVEIPLKSKRFYVVVALPTKVHELPPIEH
6791i1 FVSDIETIKVPMHKS IKLNYHRFENHNLHMVEIPLKSKRFYVVVALPTKVHELPPIEH
S.mansoni FKPNNQPIIKIPMMHIMDSIEYGLFPKYKIHMISKSFMNPRFSFIVILPTEPGKLEYADN
S.japonicum FSVTNNHHLQVPMMSKDEILKYKFFPEDGFEIVSKPMKNTFRFSFIILPLEKWNLNGAIE
Hc-serpin FYSSEGKEREVEYMNGSQEILH--AEDDDVQVLSLPSYDTSYALNIFLPKNRSGLHEIRA
T.suis FYGPTGNPIMLPTMKAQPDFLY--FEKPKYQVLMGPYTVDNAMFIVLPRRLVPLEQVEN
T.spiralis FFCDEIRRIKVKMMRDQOEYFY--YENELCQLLGISYKENNFWMYIILPKQRFAL EEMEN
An.simplex FHAFENS DREVDMMAITSGFSY--AETEDVQVLELPYKDPETFMVYVFLPTEFGLRQFEK
IRIS FLNGGVTPTKVDMMGSMNIGHHFFRDLKIDVADFPYQGRDYSMTVILPWRNDGVEAIKQ
S.haematobium FFRLDRSKIDVRFMYINSSFGMVSLPHLSRAIKIPFKSPKFSLLVLPNTNDGLPDLK
P.westermani FTCFGGKMDIMMMHVAHEFPEELTDWSAQAVRLPFKGTDWQMLIILPWDASGLPSVLS
C.sinensis FHCLDGKRISVKMMFVKATFGFNWDACSARVLRPLPKDNTNWHMLIVLPKQNDGLKNVVD
E.multilocularis FHSLSGDVRSMMTQKASYPMADFVLEVRALKVPEETH--EMLIVLPEKNDGLPNLLK
68567i2 FKLLDNSQKNIQFMQQTAKFGFADLPDLKSTAVIFPFLDDQLRMLVILPEQVDGLVGLLK
51568 FTRLDNSKDI PFMRNKAI FGYGLLPELQSTAAVFFHDDRLRMLVILPNKVDGLKHLK
3567 FTRLDNSQKMPFMQNKAMFGYRILPELQSTAAVFFHDDRLRMLIILPNKVDGLQHLK

* : *

A.aegypti SMNQRSFKEVLSKLNIEIKTTVRI PQFGLQTTVPGRQLLESMSGKVPFNQ--GVFKVFEQG
A.albopictus SMNQRSFKEVLSKLVPSKTTVRLPQFGLKTTVPGRQLLESMSGKTPFNQ--GVFKVFEQG
67910i2 FLAAQQERVQSDDLAVRIIDLKLPFRKLDSEINLISLMSQLGCTDIFNTAKANFTGISHE
6791i1 FLAAQQERVQSDDLAVRIIDLKLPFRKLDSEINLISLMSQLGCTDIFNTAKANFTGISHE

S.mansoni VLRGEILPHLVSKLESKQVALSLPKFRLDFSIDLIEITLKNMYITDLFDSAKADLRGITDS
S.japonicum VLNGNKLSHYVDKLEETSVALSKMPKFTLTKKLQLVGTLKSIGIKNLFDPLKADLSGISSK
Hc-serpin RLGTGERVQSLLSKLLKTTIISITIPKMKIEAGLNLEKALKDMSVSKSFSTK-ADFTGIINR
T.suis SLSGKVLHSHHFQSATMKYVEVQMPKFEIERTTIELKEPFEMMGLSLSNRSAPSLSKIDRT
T.spiralis SLTSSQLAEMFQNGAMVDVTVKIPKFTFSALNMKDVITELGMGIIFDGENADFSKICKR
An.simplex SMNGEKIMQLMGCMRPNKIIVELPKFKLDGQLRLNKVLEELGIRDADFADAEKANFDGISKN
IRIS NLTLDLFOQLVSELRRRFFVFLPKFKIEAEYSLKEPLQNLGIKQIFSGG-SDLSGVTND
S.haematobium SLCKDKISSILSNFTDTSIHLYLPKFKLKEGISLVDYLQKMGMRFAFCPGSANFTNMSES
P.westermani HLRKPGLEELLRPFFHETELDLFLPKFKLSQCVNAKALLKQCGINTIFDAGAADLKKLCS
C.sinensis HLSKPGLEEMLDPPFDEIEVFLPKFKIAEGLDAKELIGCGVRELFNADKADLSKLCSS
E.multilocularis QLSANALEEMLDQYFDTEVVLKLPKFSLGGHMKLKEPLHKMGLSAFADAEADFSGITND
68567i2 QLSTKALTEVLEPFYQTTVDVVRMPKFKLCSLEMKEILQKMGIVSAFNEGAADFSGISES
51568 QLCQKLTVEVLKEFNEDEVNVMIPRFKLGGELELKEILKQMGIVSVFDENTADLSAICEI
3567 HLFETNLAEVFMFNETELTVMTPRFKLGGEVELREILKQMGIVSAFDESFADLSVICES

: : * : : :

A.aegypti QDVALGEIVQKMEMSIAADGEKQAQSFV-----DKQDKQFTAHQPFLFVYDRNLVPIL
A.albopictus QDVALGEIVQKMEINMSGDGEIQGQKFP-----DKQDKLFTANQPFMFVIFDRSVVPVL
67910i2 ARLFVQTMQKAALRVNEEDGIEAAAAATYALINLASLETTIQFHVNQPFYLSVHDSQHLPVF
6791i1 ARLFVQTMQKAALRVNEEDGIEAAAAATYALINLASLETTIQFHVNQPFYLSVHDSQHLPVF
S.mansoni -KVHVQVLQHSVALKVNEDGVEAAAAATVMGIGLRSAPSIRFDVNESFICYVYDKIKTSLF
S.japonicum NNLYVRSFIQTNVMKVNEDGIEAAASVTSPIIVPISAPDVNFHVTHPFICFIYDQONMPLL
Hc-serpin -RLLVAGAANKAIKVNEDGTTAAGATVFSKFSMSERVKFEANHPFLFILTGD-NDPLF
T.suis QNLYLSSGIHKTVEVDEKGTAAAAATAITCVTDSGKVYQFTADRPFLEFVVDISGFLLE
T.spiralis KDIFVSDILHKAFLEVNEEGTEAAAAATAVTMTDKAAKQLFFVADHPFLFFICNPKCIPLE
An.simplex DSLVSDVVKANVEVNEEGSEAAAAATGLFMVFRSSPPIRFIADHPFIFITIVSQ-NRILE
IRIS NDLVVSADVHKAVLEVNEEGSEAAAVSSVAVTRIGQAFEFNVDPHPFLFIRNTVNDILE
S.haematobium SNFCIGDILHKAILEVDEERGAVAAAAATSVFEFINLSLPEVEFRVDHPFFISIIWNNTVPVF
P.westermani TNLFSDVVFHKAVLEVEEGATAAAAAATAVMMNMRCAMRPTVVRDRPFVALICASTVPVF
C.sinensis ERLHVSDFVHKAVLEIDEEGATAAAATGMMV-SRMMGPPFFRVDHPFFLAIISDTMVPVF
E.multilocularis RSLAVSDVYHQAVIDVEEGAEAAAAATAMPMMVRCMPPVDFFVDHPFFIFIVTKTGIPVF
68567i2 EALFVSTVKHMAILEVNEEGAKAAAAATAVRIQLRCMIVRDFHVDHPFVVAILSATTVPLF
51568 PGLFASSAKHMAVLEVNEEGAEAAASTAIEIAFFCVVERNFVDHPFFVAILSANNVPLF
3567 RGLFASSAKHMAVLEVNEEGAEAAAAATAIEVEYASFIEANFLLIIHF-----GYPLR

. : : * . . * :

A.aegypti VGFYLKTPP
A.albopictus VGHYLKAPP
67910i2 VARIDREPSV
6791i1 VARIDREPSV
S.mansoni AGRIIKPPV
S.japonicu AAKVINPM-
Hc-serpin MGQFV----
T.suis LGRFSGQ--
T.spiralis LGRYTGLNV
An.simplex IGRFH----
IRIS AGQVNSL--
S.haematob LGHVVAPE
P.westerma IGHVTHEGS
C.sinensis VGHITNPES
E.multiloc MGHVVHPES
68567i2 VGHCVDPEP
51568 LGHCVDPEP
3567 LQRASVPRP

AA alignmenty serpinů *E. nipponicum* s ostatními parazity vč. serpinů s prokázanou antikoagulační aktivitou

žlutě vyznačené motivy s konzervovanými AA, šedě shodné AA vzory

Organismy(accession no.): A.aegypti(AAL76022.1), A. albopictus (AAV90672.1), S. mansoni (AAA29938.1) S. japonicum (AAV90672.1), Hc-serpin (ACP43576.1), T.suis (KHJ49058.1), T.spiralis (CBX25723.1), A. simplex (CBX25525.1), IRIS (EEC19903.1), S.haematobium (Accession no. KGB37771.1), P. westermani (ABV57466.1), C.sinensis (ADI60059.1), E. multilocularis (CAD12372.2)