

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Pilotní analýza kalcium-dependentních proteinkináz
prvoka *Babesia divergens***

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Marie Jalovecká, Ph.D.

Školitelka – specialistka, konzultantka: Mgr. Pavla Šnebergerová

České Budějovice 2022

Křečková T., 2022: Pilotní analýza kalcium-dependentních proteinkináz prvoka *Babesia divergens*. [Pilot Analysis of *Babesia divergens* Calcium-Dependent Protein Kinases. Bc. Thesis, in Czech] - 66 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Babesia divergens is a parasite of the Apicomplexa that causes bovine and human babesiosis primarily in Europe. The ability of *B. divergens* to parasitize inside the host red blood cells is governed by the Ca²⁺ signaling pathway employing various molecules including an array of Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs). These enzymes are orchestrating essential developmental processes of Apicomplexa parasites, and since they are absent in their animal host, they possess a great potential for therapeutic interventions. Despite CDPKs' vital and promising role, *Babesia* CDPKs remain uncharacterized, and their potential regulatory roles in host-cell invasion and intracellular parasitism are thus not known. This thesis is aimed at the pilot analysis of four putative *B. divergens*-specific CDPKs: Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560 and Bdiv_035940c. We amplified and sequenced full genomic and coding sequences of putative BdCDPKs and inserted their coding sequences into a standard vector. Using BdCDPKs protein sequences we analyzed the architecture of the individual enzyme to confirm the presence of key CDPKs domains (Ser-Thr kinase domain and EF-hands) and constructed a phylogenetic tree to confirm the clustering of putative BdCDPKs with analogous enzymes of other Apicomplexa and their relatives. Overall, the pilot analysis of BdCDPKs presented in this thesis provides important background for further functional and biochemical analyses of these yet uncharacterized but highly important *B. divergens* enzymes.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2022

.....

Tereza Křečková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Marii Jalovecké, Ph.D a konzultantce Mgr. Pavle Šnebergerové za jejich vedení, cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala ostatním členům laboratoře za ochotu mi poradit a pomoci. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Apicomplexa.....	2
1.1.1 Vybraní zástupci	2
1.1.2 Charakteristika buňky	3
1.2 Rod <i>Babesia</i>	3
1.2.1 Životní cyklus babesíí.....	3
1.2.2 Unikátní strategie babesíí	5
1.2.3 Babezióza.....	7
1.2.3.1 Výskyt lidské babeziózy	7
1.2.3.2 Šíření lidské babeziózy krevními transfúzemi.....	8
1.2.3.3 Léčba lidské babeziózy	9
1.3. Vápníková buněčná signalizace a kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs)	9
1.3.1 Vápník a jeho úloha v buněčné signalizaci.....	10
1.3.2 Mechanismus vápníkové signalizace.....	11
1.3.3 Charakteristika CDPKs.....	11
1.3.4 CDPKs u rostlin	12
1.3.5 CDPKs u parazitů ze skupiny Apicomplexa	14
2 Cíle práce	18
3 Materiál a metody	19
3.1 Kultivace <i>B. divergens</i>	19
3.1.1 Udržování kultur	19
3.1.2 Mikroskopická analýza	20
3.2 Sekvenace gDNA predikovaných BdCDPKs	20
3.2.1 Izolace gDNA	20

3.2.2 Design sekvenačních primerů.....	21
3.2.3 PCR a elektroforéza.....	22
3.2.4 Enzymatické přečištění a sekvenace.....	23
3.3 Příprava cDNA z krevních stádií <i>B. divergens</i> , zaklonování a osekvenování kódující sekvence predikovaných BdCDPKs.....	23
3.3.1 Izolace RNA.....	23
3.3.2 DNase treatment.....	23
3.3.3 Reverzní transkripce.....	24
3.3.4 PCR, elektroforéza a přečištění z gelu.....	24
3.3.5 Ligace PCR produktu do vektoru pGEM®-T Easy.....	24
3.3.6 Výroba LB agarových ploten.....	24
3.3.7 Transformace plasmidu do kompetentních buněk, jejich kultivace na agarové plotně, PCR z kolonie.....	25
3.3.8 Izolace plasmidu a sekvenace.....	26
3.4 Predikce proteinových domén BdCDPKs.....	26
3.5 Fylogenetická analýza BdCDPKs.....	26
3.6 Analýza exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs: design experimentu.....	27
4 Výsledky.....	28
4.1 Analýza gDNA sekvencí Bd CDPKs.....	28
4.2 Analýza kódujících sekvencí BdCDPKs.....	29
4.3 Predikce proteinových domén sekvencí BdCDPKs.....	30
4.4 Fylogenetická analýza BdCDPKs.....	31
4.5 Analýza exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs: design experimentu.....	36
5 Diskuze.....	40
6 Závěr.....	45
7 Literatura.....	46
Seznam příloh.....	54
Příloha č. 1 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_014540c.....	55

Příloha č. 2 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_024410.....	57
Příloha č. 3 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_030560.....	59
Příloha č. 4 – sekvence gDNA Bdiv_035940c	62
Příloha č. 5 - seznam genů použitých k fylogenetické analýze	64

1 Úvod

Babesie jsou obligátní jednobuněční parazité přenášení klíšťaty. Patří do skupiny Apicomplexa (výtrusovci), v rámci níž patří mezi méně prozkoumané parazity (Jalovecka et al., 2019). Babesie si vyvinuly unikátní strategie, aby mohly dokončit svůj životní cyklus a šířit se do dalšího hostitele pomocí specializovaných infekčních stádií (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019). Ve svém životním cyklu babesie střídají klíště jakožto hlavního hostitele a obratlovce jakožto mezihostitele (Homer et al., 2000; Hussein et al., 2021; Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019), což vyžaduje adaptaci parazita na rozličné typy hostitelských buněk a na různá prostředí (Lobo et al., 2019). Pro babesie je důležitá schopnost invaze do erytrocytů různých druhů savců (Homer et al., 2000; Lobo et al., 2019), a schopnost multiplikace v různých tkáních klíšťat včetně unikátního tzv. transovariálního způsobu přenosu parazita (z matky na potomstvo) (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019).

Pozoruhodná schopnost se šířit a celosvětový výskyt klíštěcích hostitelů udělaly z babesii jednoho z nejběžnějších parazitů volně žijících i domestikovaných zvířat (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019). Babesie ohrožují nejen zemědělské chovy, ale roste i riziko nákazy člověka (Jalovecka et al., 2019), přestože člověk je pouze příležitostným mezihostitelem babesii (Jalovecka et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013). Mnohé aspekty jako jsou například častější cestování a krevní transfúze, přispívají k vážným obavám o zdraví veřejnosti (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019). Homer et al. (2000) udávají, že babesie (a jim blízké příbuzný rod *Theileria*) jsou druhými nejčastějšími krví přenášenými parazity po trypanosomách (Yabsley & Shock, 2013).

Zásadní roli ve vývojovém cyklu babesii hraje tzv. vápníková signalizace, reprezentovaná řadou molekul včetně tzv. kalcium-dependentních proteinkináz (CDPKs) (Billker et al., 2009). U parazitů kmene Apicomplexa jsou CDPKs klíčové pro dokončení životního cyklu (Sharma et al., 2021), a protože se tyto enzymy nevyskytují v buňkách hostitelů těchto parazitů, představují CDPKs potencionální cíl specifické terapie (Hussein et al., 2021; Keyloun et al., 2014; Sharma et al., 2021; Wernimont et al., 2011). Navzdory tomu jsou funkce jednotlivých kináz rodu *Babesia* doposud neobjasněné oproti CDPKs u jiných zástupců Apicomplexa, např. *Plasmodium falciparum* (Mitcheson et al., 2015), *Toxoplasma gondii* (Wang et al., 2015) a *Cryptosporidium parvum* (Zhang et al., 2021). Tato práce je zaměřena na pilotní analýzu predikovaných *Babesia divergens*-specifických CDPKs (BdCDPKs).

1.1 Apicomplexa

Apicomplexa (výtrusovci) jsou součástí skupiny Alveolata. Fylogenetická analýza ukázala, že nejbližšími příbuznými Apicomplexa jsou Dinoflagellata (obrněnky), což je skupina jednobuněčných řas (Wiesner et al., 2008). Mezi Apicomplexa patří mnoho významných vnitrobuněčných parazitů, kteří mohou napadat obratlovce i bezobratlé (Wiesner et al., 2008) a způsobovat tzv. zoonózy, což jsou choroby přirozeně přenosné ze zvířat (většinou z obratlovců) na člověka (Lobo et al., 2019). Rozmach zoonóz bývá spojován s ekologickými změnami usnadněnými globalizací, častějším mezinárodním cestováním a obchodem, klimatickými změnami, růstem populace, urbanizací, zintenzivněním průmyslu a evolucí vztahu mezi patogenem a jeho vektorem (Lobo et al., 2019). Současná léčba těchto zoonóz se ve velké míře spoléhá na použití širokospektrých chemoterapeutik, ale je limitována významným nárůstem rezistence, která už byla prokázána na běžně využívané antimikrobiální látky jako sulfadiazin a pyrimethamin, nebo clindamycin, spiramycin a imidocarb. Navíc mohou tyto léky způsobit teratogenezi nebo vznik alergií (Keyloun et al., 2014).

1.1.1 Vybraní zástupci

Důležitými parazity kmene Apicomplexa jsou například *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Theileria* a *Babesia* (Chakraborty et al., 2017; Duszynski, 2021; Kuo et al., 2008; Wiesner et al., 2008; Yabsley & Shock, 2013). U některých těchto parazitů je hlášeno více případů nákazy a úmrtí (*T. gondii* a *P. falciparum*) než u jiných (*B. divergens*, *Babesia microti* a *C. parvum*) (Chakraborty et al., 2017), ale všichni tito parazité mohou potenciálně ohrozit život hlavně u jedinců s poškozenou či oslabenou imunitou, jako jsou například jedinci infikovaní HIV (Wiesner et al., 2008).

Cryptosporidium napadá trávicí trakt a způsobuje kryptosporidiózu u člověka a zvířat (Chakraborty et al., 2017; Kuo et al., 2008; Wiesner et al., 2008). *C. parvum* má širší spektrum hostitelů, kdežto *Cryptosporidium hominis*, napadá pouze člověka (Chakraborty et al., 2017). Kokcidie jsou známé svým širokým spektrem hostitelů. Byly objeveny u ryb, obojživelníků, plazů, ptáků i savců (Duszynski, 2021). *Toxoplasma* způsobuje toxoplazmózu, a u jedinců s poškozeným či oslabeným imunitním systémem se může vyvinout v závažné onemocnění, stejně tak může být velmi nebezpečná pro vyvíjecí se plod v těle matky (Chakraborty et al., 2017; Kuo et al., 2008). Známým a intenzivně studovaným patogenem tohoto kmene je rod *Plasmodium* způsobující malárii. Dle webu www.cdc.gov je počet případů za rok 2020 odhadnut na 241 milionů. Za nejvíce smrtící druh je považováno *P. falciparum*, kvůli závažnosti

onemocnění a vysoké úmrtnosti (Chakraborty et al., 2017; Wiesner et al., 2008). *Theileria*, která společně s rodem *Babesia* a *Cytauxzoon* tvoří skupinu Piroplasmida (Jalovecka et al., 2018; Yabsley & Shock, 2013) infikuje výhradně leukocyty a erytrocyty přežvýkavců a způsobuje značné ekonomické ztráty v zemědělském průmyslu (Chakraborty et al., 2017; Heussler & Stanway, 2008; Kuo et al., 2008).

1.1.2 Charakteristika buňky

Téměř všichni parazité kmene Apicomplexa kromě rodu *Cryptosporidium* a několika linií gregarin (Rueckert & Horák, 2017) mají nefotosyntetický plastid zvaný apicoplast (Wiesner et al., 2008). Společným znakem pro všechny členy kmene Apicomplexa je přítomnost struktury zvané apikální komplex alespoň v jednom stádiu životního cyklu (Homer et al., 2000; Wiesner et al., 2008). Apikální komplex je aparát skládající se z cytoskeletálních struktur a asociovaných organel, který zprostředkovává invazi parazita do hostitelské buňky, podílí se na schopnosti intracelulárního parazitismu, a účastní se také opuštění hostitelské buňky (tzv. egress) (Jalovecka et al., 2019; Mathur et al., 2019). V případě babesií je ovšem apikální komplex nápadně zredukován, což naznačuje alternativní molekulární mechanismy invaze a usídlení parazita v hostitelské buňce (Jalovecka et al., 2019).

1.2 Rod *Babesia*

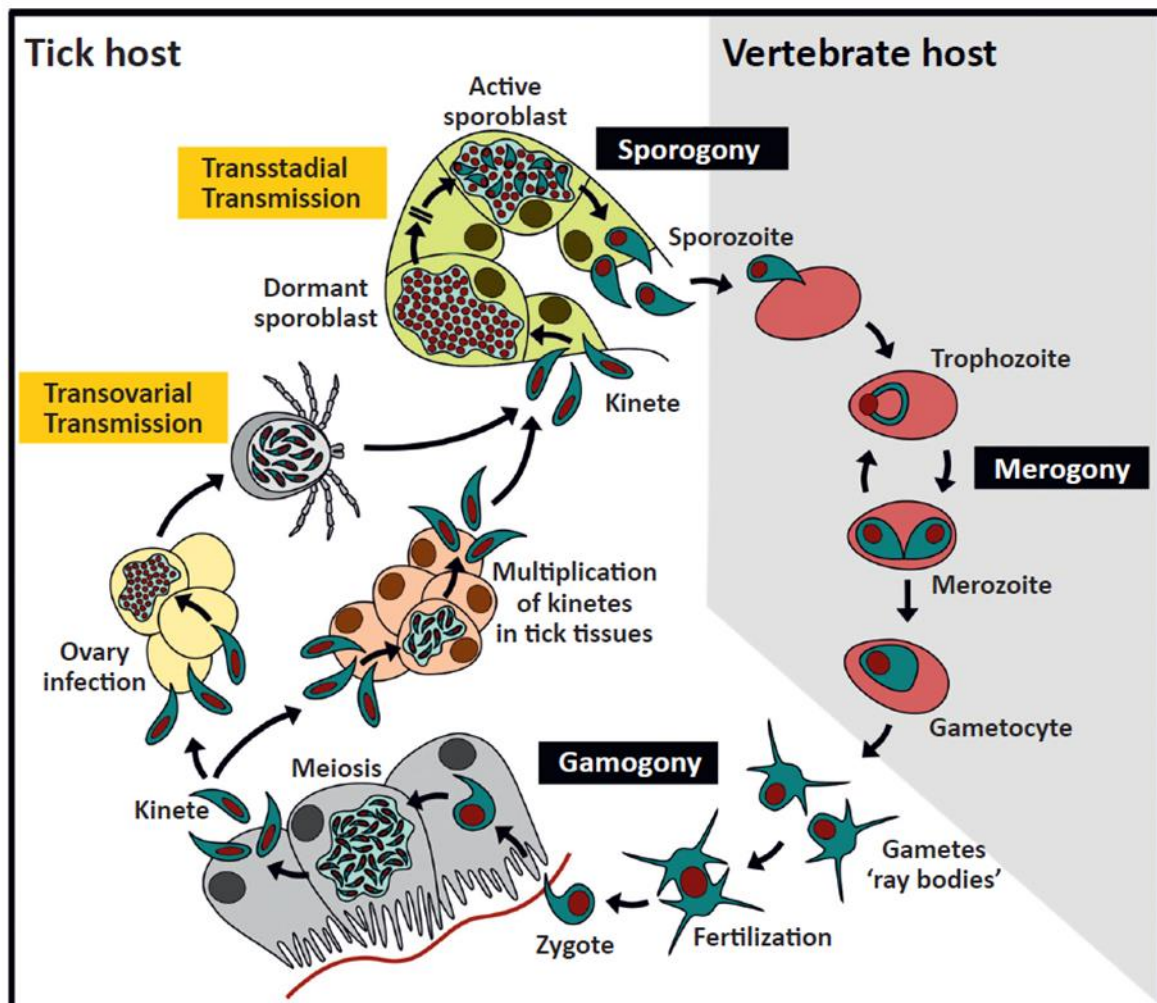
Rod *Babesia* obsahuje víc než 100 druhů (Homer et al., 2000; Lobo et al., 2019), které infikují mnoho savčích, ale i některé ptačí druhy (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Yabsley & Shock, 2013). *Babesia bovis* a *Babesia bigemina* patří k obávaným klíšťaty přenášeným patogenům dobytka (Homer et al., 2000; Hussein et al., 2021). *B. microti* má širší spektrum mezihostitelů sahající od malých hlodavců a hmyzožravců po člověka (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). *B. divergens* napadá dobytek, ale stejně jako *B. microti* je schopná infikovat člověka (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). *Babesia canis* parazituje v erytrocytech psovitých šelem a *Babesia venatorum* se vyskytuje u jelenů (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008).

1.2.1 Životní cyklus babesií

Životní cyklus babesií (viz Obrázek 1) začíná sáním klíštěte na obratlovci, který je infikován infekčními sporozoity (Hunfeld et al., 2008; Jalovecka et al., 2019; Sevilla et al., 2018). Sporozoity babesií začnou okamžitě vyhledávat erytrocyty, na rozdíl od *Plasmodium*,

kteře musí nejprve podstoupit fázi v jaterních buňkách (Cursino-Santos et al., 2019; Lobo et al., 2019), a od *Theileria*, které nejprve pronikají do lymfocytů nebo makrofágů, aby se zde vyvinuly v schizonty (Hunfeld et al., 2008). Babesie a *Plasmodium* se od sebe v raných fázích vývoje v erytrocytu stanou morfologicky nerozlišitelnými, neboť oba vytvoří trofozoity (stádium prstýnku) (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019). Stádia uvnitř erytrocytů jsou chráněna před imunitním systémem (Cursino-Santos et al., 2019) a během této erytrocytální fáze se trofozoity rozdělí na merozoity procesem zvaným merogonie, což je v případě babesii binární dělení, při kterém vznikají dvě stejně velké buňky (Bock et al., 2004; Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019). Toto nepohlavní rozmnořování je u babesii asynchronní (Sevilla et al., 2018). Výsledné merozoity opouští erytrocyt a invadují nové dosud neparazitované erytrocyty (Cursino-Santos et al., 2019; Jalovecka et al., 2019). Načasování egressu a počet merozoitů uvolněných z infikovaného erytrocytu jsou řízeny podmínkami prostředí (Lobo et al., 2019). Babesie využívají strategii, kdy parazit kontroluje množství invadovaných erytrocytů, aby ochránil svého hostitele před hemolýzou, ke které by došlo při masivní invazi (Lobo et al., 2019). Některé merozoity se již v erytrocytu mění na tzv. pre-gametocyty, které dále infikují klíště během jeho sání na obratlovci (Jalovecka et al., 2019). Tato přeměna iniciuje gamogonii, což je pohlavní rozmnořování, které probíhá výhradně v definitivním hostiteli, tedy klíštěti (Jalovecka et al., 2019). Pre-gametocyty se ve střevech klíštěte dále vyvíjí v gametocyty a následně v gamety (Hajdušek et al., 2013; Jalovecka et al., 2019). Gamety babesii označované jako „ray bodies“ nebo „Strahlenkörper“ spolu fúzí a vzniká mobilní zygota nazývaná ookineta (Bock et al., 2004; Hajdušek et al., 2013; Jalovecka et al., 2019). Ookineta proniká přes polopropustnou nebuněčnou membránu obklopující střevní dutinu – peritrofičká matrix – a invaduje do střevních buněk (Jalovecka et al., 2019). Ookineta v buňkách střevního epitelu podstoupí meiózu a tím vytvoří jednobuněčné kinety (Bock et al., 2004; Jalovecka et al., 2019). Ty se šíří přes hemolymfu do periferních tkání, včetně buněk vaječnicků (Bock et al., 2004; Hajdušek et al., 2013; Jalovecka et al., 2019). Invaze do ovárií má za následek infekci vajíček a vede k transovariálnímu přenosu (Hajdušek et al., 2013; Jalovecka et al., 2019). Zároveň primární kinety napadají další orgány klíštěte, kde se množí a vytváří sekundární kinety, které napadají slinné žlázy. Ve slinných žlázách se kinety vyvinou v mnohojaderné sporoblasty, které během ekdyse klíštěte zůstanou v dormantním stavu a zaručují transstadiální přenos (Bock et al., 2004; Jalovecka et al., 2019). Jakmile se další infikované vývojové stádium klíštěte započne sát na krvi mezihostitele, je aktivován sporoblast a ten procesem sporogonie nepřetržitě produkuje mnoho infekčních sporozoitů, které jsou uvolňovány do krevního řečiště

mezihostitele a tím je cyklus dokončen (Bock et al., 2004; Hajdušek et al., 2013; Jalovecka et al., 2019).



Obrázek 1: Schéma životního cyklu babesii. Šedá část zobrazuje stádia parazita v obratlovčím mezihostiteli a bílá část stádia v klíštěcím hostiteli. Žluté obdélníky upozorňují na výskyt transstadiálního a transovariálního přenosu. Převzato z (Jalovecka et al., 2019).

1.2.2 Unikátní strategie babesii

Životní cyklus babesii (viz Obrázek 1) se shoduje s typickým vývojovým schématem ostatních členů kmene Apicomplexa – parazit postupně podstoupí tři typy rozmnožování: merogonie (nepohlavní rozmnožování), gamogonie (pohlavní) a sporogonie (nepohlavní) (viz kapitola 1.2.1) (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019). Tím, že se babesie přizpůsobily životnímu stylu jejich klíštěcích hostitelů, vyvinuly se u nich dvě speciální strategie, které

v rámci ostatních parazitů ze skupiny Apicomplexa nejsou běžné. První z nich je tzv. transstadiální přenos, což umožňuje parazitovi setrvat ve svém klíštěcím hostiteli i během tzv. ekdyse, tedy vývoji z jednoho instaru do dalšího (Jalovecka et al., 2019; Wei et al., 2021). Transstadiální přenos umožňují dormantní sporoblasty, které jsou volně v cytoplasmě buněk slinných žláz klíštěte, kde zůstávají chráněné před konstrukčními změnami vnitřních orgánů během ekdyse (Jalovecka et al., 2019). Transstadiální přenos je běžným fenoménem u patogenů přenášených klíšťaty (Jalovecka et al., 2019; Wei et al., 2021), například u rodů *Theileria* (Uilenberg, 2006) a *Cytauxzoon* (Allen et al., 2019), nebo u bakterií: *Borrelia burgdorferi*, což je původce lymfské boreliózy (Vannier et al., 2008; Yabsley & Shock, 2013), *Anaplasma phagocytophila*, (původce lidské granulocytární ehrlichiozy) (Mott et al., 2002), *Ehrlichia chaffeensis* (lidská monocytární ehrlichioza), či u *Rickettsia rickettsii* (horečka Skalistých hor - Rocky Mountain spotted fever) (Walker, 1998).

Druhou strategií je tzv. transovariální přenos, který umožňuje parazitovi dostat se z jedné klíštěcí samice do tisíců jejích potomků (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019). V rámci Apicomplexa se jedná o neobvyklý způsob šíření, který je však považován za jednu z nejúspěšnějších evolučních strategií (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019). Schopnost transovariálního přenosu byla prokázána u haemogregarin *Karyolysus* (Haklová-Kočíková et al., 2014), ale u rodů *Theileria* a *Cytauxzoon*, které jsou rodu *Babesia* blízké příbuzné, se transovariální přenos nevyskytuje (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019). Mimo Apicomplexa se tento typ přenosu vyvinul několikrát nezávisle a byl nalezen u organismů podobným *Rickettsia* (bakterie) a u skupiny *Microsporidia* (Smith & Dunn, 1991). Transovariální přenos babesíí je zajištěn invází tzv. kinet (viz Obrázek 1) do vaječnic samice klíštěte (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019). Díky transovariálnímu a transstadiálnímu přenosu mohou babesie přebývat v klíštěti po dlouhou dobu i během nepřítomnosti obratlovčího meziphostitele (Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019).

Jak bylo zmíněno výše, merogonie je asynchronní, a proto byly pro detailní studium životního cyklu druhu *B. divergens* vyvinuty synchronizační metody (Lobo et al., 2019). Avšak po 24 hodinách začne být kultura *B. divergens in vitro* opět asynchronní (Sevilla et al., 2018). Dále bylo překvapivě zjištěno, že si babesie osvojily opatření ke kontrole své populace, což znamená, že při vysoké parazitémii prodlouží dobu strávenou v erytrocytu, ve kterém se zrovna nacházejí, a naopak při nízké parazitémii opouštějí erytrocyt, aby mohly invadovat do nových červených krvinek a zvětšovat svou populaci (Lobo et al., 2019). Tato schopnost je pro babesie unikátní ve srovnání s dalšími zástupci skupiny Apicomplexa jako je *P. falciparum* a *T. gondii*,

kteří mají vnitrobuněčné cykly přesně načasované (Lobo et al., 2019). Pro *P. falciparum* je typické strávit v erytrocytálním cyklu 48 hodin, zatímco tachyzoit *T. gondii* má šestihodinovou periodu růstu a replikace uvnitř hostitelské buňky, než dojde k egress (Lobo et al., 2019).

1.2.3 Babezióza

Babezióza je hemolytické onemocnění obratlovců vznikající při infikování erytrocytů parazitem *Babesia* (Homer et al., 2000). Bovinní babezióza je charakteristická vysokou horečkou, hemolytickou anémií a následnou hemoglobinurií, anorexií, nechutenstvím, a kapilární sekvestrací, při které se infikované erytrocyty udržují na endotheliu kapiláry, což může vést ke smrti jedince (Hussein et al., 2021). Mladší zvířata jsou k akutním infekcím odolnější než dospělci (Hussein et al., 2021). Bovinní babezióza je již déle známá jakožto veterinární riziko a má velký ekonomický vliv na živočišný průmysl (Jalovecka et al., 2019), protože způsobuje nejen snížení produkce mléka a masa, ale i smrt chovných zvířat a potracení mláďat (Bock et al., 2004). Dobytek je typickým rezervoárem druhů *B. divergens*, *B. bovis* a *B. bigemina* (Homer et al., 2000; Lobo et al., 2019).

Lidská babezióza se projevuje podobnými symptomy jako malárie (Chakraborty et al., 2017; Cursino-Santos et al., 2019), při které se opakují tři fáze: nejprve zimnice, následuje horečka, a nakonec pocení a únava. U babesiózy však chybí pro malárii typická periodicitá fází (Wiesner et al., 2008). Lidská babezióza může mít různý průběh od asymptomatického, po vážný a příležitostně až fatální, k čemuž může dojít u pacientů s imunodeficiencí (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Vannier et al., 2008; Yabsley & Shock, 2013). Babezióza se u imunokompetentních jedinců obvykle vyznačuje nespecifickými příznaky, jako je nepříliš vysoká, ale relativně stálá horečka (Hunfeld et al., 2008; Wiesner et al., 2008). Mezi další symptomy patří nevolnost, bolest hlavy, únava, zimnice, svalové křeče a anémie (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Vannier et al., 2008; Yabsley & Shock, 2013).

1.2.3.1 Výskyt lidské babeziózy

Původcem lidské babeziózy může být několik druhů (Cursino-Santos et al., 2019; Lobo et al., 2019). Nakažení člověka babesiemi, přesněji druhem *B. divergens*, bylo poprvé potvrzeno roku 1956 v bývalé Jugoslávii (Hildebrandt et al., 2007; Homer et al., 2000; Lobo et al., 2019). Tato nákaza byla bohužel fatální, a od té doby je babezióza brána jako choroba potenciálně ohrožující lidský život (Homer et al., 2000; Lobo et al., 2019). Mezi čtyři druhy babesií, u kterých bylo doposud a jistotou prokázáno, že mohou infikovat i člověka, patří *B. divergens*,

B. microti, *Babesia duncani* a *B. venatorum* (Chakraborty et al., 2017; Cursino-Santos et al., 2019; Homer et al., 2000; Wiesner et al., 2008).

B. divergens je hlavním původcem lidské babeziózy v Evropě, kde byla většina případů hlášena z Britských ostrovů a Francie (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Lobo et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013). V USA způsobuje lidskou babeziózu především druh *B. microti* (Cursino-Santos et al., 2019; Hildebrandt et al., 2007; Homer et al., 2000; Yabsley & Shock, 2013), který se vyskytuje hlavně ve východní části Severní Ameriky (Homer et al., 2000), a počty případů neustále rostou (Hunfeld et al., 2008). Hildebrandt et al. (2007) již potvrdili první autochtonní případ nákazy člověka druhem *B. microti* v Evropě. Případy lidské babeziózy způsobené *B. divergens* se zdají být vzácnější než ty způsobené *B. microti*, ale na druhou stranu *B. divergens* způsobuje vážnější průběh infekce než *B. microti* (Hildebrandt et al., 2007; Homer et al., 2000; Vannier et al., 2008).

Obecný životní cyklus babesí se při infikování člověka nemění (Cursino-Santos et al., 2019). Babesie obligátně parazitují erythrocyty a jejich schopnost je nejprve rozeznat a pak invadovat je ústřední krok lidské babeziózy (Cursino-Santos et al., 2019; Lobo et al., 2019). Intra-erythrocytární paraziti ve stadiu merozoitů k tomu využívají mnohonásobné komplexní interakce mezi svými povrchovými proteiny a povrchem hostitelské buňky (Chakraborty et al., 2017; Cursino-Santos et al., 2019; Jalovecka et al., 2019). Dle Jalovecka et al. (2019) by studium proteinů, které si merozoity vytvářejí, mohlo umožnit důkladnější pochopení povrchových změn hostitelské buňky způsobených parazitem a odhalit možnosti pro klinické aplikace proti babezióze.

1.2.3.2 Šíření lidské babeziózy krevními transfúzemi

Během posledních desetiletí počty případů lidské babeziózy pravidelně rostou (Cursino-Santos et al., 2019; Lobo et al., 2019). Avšak je obtížné stanovit množství případů, protože mnoho z nich je špatně diagnostikováno nebo není vůbec detekováno, a zbylé případy nebyly nahlášeny nebo publikovány (Lobo et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013). Babezióza navíc může být přenášena i krevní transfúzí infikované krve (Cursino-Santos et al., 2019; Hildebrandt et al., 2007; Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019; Lobo et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013) nebo vertikálně z matky na plod (Lobo et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013). Během transfúze erytrocyt slouží jako optimální šířitel usnadňující přenos (Cursino-Santos et al., 2019). Dle Hildebrandt et al. (2007) je celosvětově případům nákazy spojených s transfúzemi věnována malá pozornost a jejich výskyt je pravděpodobnější v oblastech, kde je babezióza

endemická. Vyšší frekvence klinických případů je spojená právě s častějším šířením parazitů skrze krevní transfúze (Cursino-Santos et al., 2019). To bylo prokázáno hlavně pro *B. microti*, což dělá z babeziózy nejčastější infekci přenášenou transfúzí ve Spojených státech amerických (Cursino-Santos et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013). Sáčky s krví určenou k transfúzi jsou skladovány při nízkých teplotách (Lobo et al., 2019). Pokud je krev infikována babesiemi, dojde v tomto kroku k redukci populace (Lobo et al., 2019). Ale díky strategii, kdy jsou merozoity chráněny uvnitř erytrocytu, mohou po nastolení optimálních podmínek znovu vybudovat populaci i jen z několika jedinců (Lobo et al., 2019).

1.2.3.3 Léčba lidské babeziózy

V současné době je lidská babezióza léčena kombinací antimalarik a antibiotik (Jalovecka et al., 2019; Vannier et al., 2008). Používají se dvě standardní kombinace antimikrobiotik: atovaquon s azithromycinem pro mírné infekce a clindamycin s chininem pro vážné stavy (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019; Vannier et al., 2008; Wiesner et al., 2008). Pokud by byl pacient v ohrožení života, je možné provést krevní transfúzi neinfikovanou krví (Vannier et al., 2008). Ovšem antibiotika a antimalarika nejsou toxická jen pro parazita, ale i pro pacienta (Homer et al., 2000), a proto některé výzkumné skupiny navrhují jiné způsoby léčby. Sevilla et al. (2018) navrhují zacílit léčbu na stádium merozoitu, který je během invaze a egress bezbranný vně erytrocytu. Avšak Jalovecka et al. (2019) tvrdí, že by tato strategie nemusela být úspěšná, protože vývoj babesií uvnitř erytrocytu je asynchronní a merozoity se mění na gametocyty s jinými antigeny, na které by léčba cílená na merozoity mohla být neúspěšná. Místo toho navrhují jako cíl léčby také specifické antigeny gametocytů a sporozoitů, kdy by byla tato stádia selektivně blokována.

1.3. Vápníková buněčná signalizace a kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs)

Kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs) představují jedny z nejzásadnějších signalizačních molekul reagujících na oscilace hladiny vápníku, jejíž dynamika koresponduje s buněčnými a vývojovými změnami během parazitického způsobu života výtrusovců (Apicomplexa). V následující rešerši uvádím základní fakta o roli vápníku v buněčné signalizaci a charakteristiku CDPKs, kterým je celá tato práce věnována.

1.3.1 Vápník a jeho úloha v buněčné signalizaci

Vápník je známý makrobiogenní prvek a v buňce plní důležitou roli při kontrole řady procesů. Hladina vápníku v buňce je přísně regulována a náhlé uvolnění iontů vápníku (Ca^{2+}) do cytosolu aktivuje látky reagující na tyto změny (Sharma et al., 2021). Jeden z klíčových procesů reagující na oscilaci hladiny Ca^{2+} je vápníková buněčná signalizace, která ovlivňuje řadu fyziologických procesů v buňce (Fedrizzi et al., 2008).

Významnou skupinou proteinů reagujících na změny hladiny vápníku jsou CDPKs (Billker et al., 2009), které však nejsou jediné látky aktivované vápníkem. V rostlinách byly objeveny další skupiny, např. kalmoduliny, kalmodulinu podobné proteiny (Calmodulin-like proteins) a kalcineurin B-podobné proteiny (Calcineurin B-like proteins) (Sharma et al., 2021). U živočichů mohou reagovat na koncentraci vápníku některé hormony, například při snížené hladině iontů vápníku a fosfátových iontů (PO_4^{3-}) v krvi dojde k uvolnění hormonu parathormonu a ten rozrušováním kostní tkáně uvolňuje Ca^{2+} do krve. Antagonistou parathormonu je hormon kalcitonin, který brání odbourávání kostní tkáně při hyperkalcemii. Vápníková signalizace se účastní při reakcích imunitního systému na stimulaci antigeny patogenů (Guse, 1998). V T-lymfocytech jsou Ca^{2+} klíčové pro aktivaci, diferenciaci a pro vykonávání funkce (Guse, 1998; Savignac et al., 2007). Ca^{2+} ionty mají také další specifické funkce v membránové excitabilitě, exocytóze, pohyblivosti, apoptóze a transkripci (Clapham, 2007).

U mnohobuněčných i jednobuněčných organismů je dynamika vápníku uvnitř buňky složitě regulována neustálou výměnou mezi extracelulárním prostorem, cytoplazmou a místy, kde se vápník skladuje (Sharma et al., 2021). U živočichů fungují jako sklad vápníku endoplasmatické retikulum nebo mitochondrie (Sharma et al., 2021). U rostlinných buněk se Ca^{2+} ukládá v chloroplastech, vakuolách a apoplastech (Sharma et al., 2021; Shi et al., 2018).

U živočišných i rostlinných buněk jsou ionty vápníku neustále vylučovány z cytosolu za pomoci membránových transportérů. Jedná se o takzvané vápníkové pumpy, které za spotřeby ATP přenáší Ca^{2+} přes membránu ven z buňky nebo dovnitř endoplasmatického retikula. Dalším mechanismem je sodíko-vápníkový výměník, což je proteinový přenašeč, který antiportním způsobem transportu vyměňuje jeden Ca^{2+} ion za tři Na^+ ionty, nebo transportuje jeden K^+ ion spolu s jedním Ca^{2+} ionem výměnou za čtyři Na^+ ionty (Clapham, 2007). Sodíko-vápníkový výměník používá energii elektrochemického gradientu Na^+ . Vápníkové pumpy dlouhodobě udržují nízkou koncentraci Ca^{2+} v cytosolu, zatímco sodíko-vápníkové výměníky

dělají rychlé úpravy, které jsou u živočichů potřebné během vytváření akčního potenciálu v neuronech (Clapham, 2007).

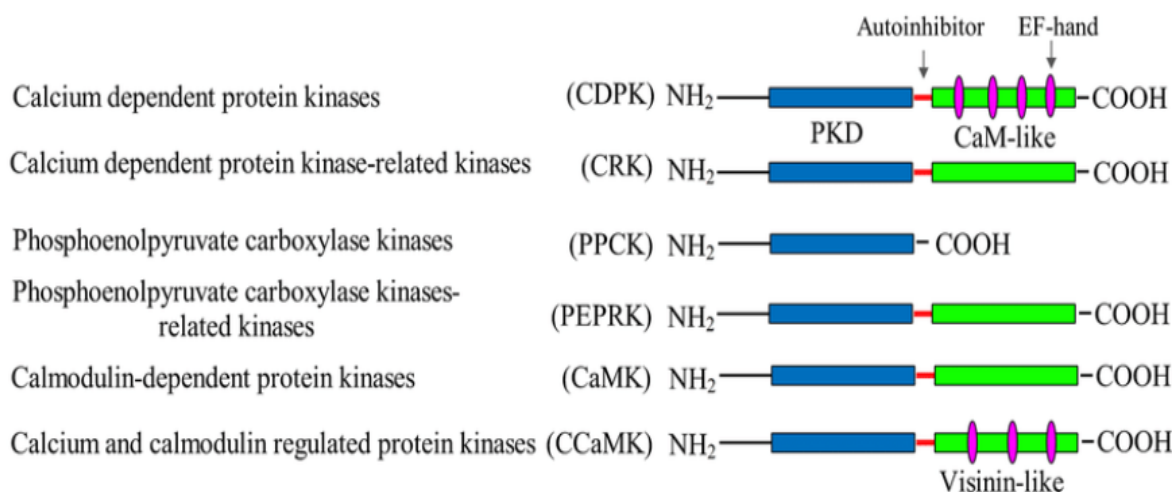
1.3.2 Mechanismus vápníkové signalizace

Ionty vápníku a na ně reagující fosfátové ionty mají schopnost měnit lokální elektrostatická pole a konformaci proteinů, což jsou dva univerzální nástroje pro vedení signálu (Clapham, 2007). Buněčná vápníková signalizace může být prováděna dvěma způsoby. Prvním z nich je využití mezerových spojů (gap junction), které se vyskytují mezi sousedními buňkami a spojují jejich cytoplasmy. Často se nacházejí v epitelových tkáních a jsou vždy přítomné mezi buňkami srdeční svaloviny. Při druhém a častějším způsobu buněčné signalizace dochází k otevření iontových kanálů cytoplasmatické membrány, kvůli změnám v napětí nebo kvůli navázání určitých ligandů nazývaných jako první poslove (first messenger). Když se kanály otevřou, začnou Ca^{2+} proudit dovnitř buňky. Počáteční zvýšení koncentrace Ca^{2+} spouští další uvolnění Ca^{2+} především z endoplasmatického retikula. Tomu se říká, že Ca^{2+} je tzv. druhý posel (second messenger) a znamená to, že koncentrace vápníku v buňce rychle vzroste po navázání molekuly prvního posla na receptor kanálu v membráně buňky. Toto zvýšení koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky vzápětí nastartuje fúzí proteinů, což umožní vesikulám obsahujícím transmitter splýnout s plasmatickou membránou. Tyto děje zprostředkované Ca^{2+} dominují velké části nervové soustavy a důsledky jsou viditelné i mimo buňky při komunikaci buněk skoro všech typů (Clapham, 2007).

1.3.3 Charakteristika CDPKs

CDPKs se vyskytují u skupiny Archaeplastida, u řasovek (Oomycota) a u Alveolata, kam patří tři skupiny – nálevníci (Ciliate), obrněnky (Dinoflagellata) a výtrusovci (Apicomplexa) (Govindasamy & Bhanot, 2020; Harmon et al., 2001). CDPKs slouží k vápníkové buněčné signalizaci, přičemž sledují okamžitou koncentraci vápenatých iontů i oscilaci jejich hladiny a v závislosti na tom odpovídajícím způsobem reagují (Billker et al., 2009; Harmon et al., 2001). CDPKs jsou aktivovány přímým navázáním Ca^{2+} na jejich EF-hand doménu v kalmodulinu podobné (calmodulin-like) regulační oblasti (viz Obrázek 2) (Govindasamy & Bhanot, 2020; Harmon et al., 2001; Shi et al., 2018). Interakce CDPK s vápníkem tuto kinázu aktivuje, a ta postupně fosforyluje substráty, nebo zprostředkovává interakce s dalšími proteiny, aby došlo ke zformování fyziologicky významných vysokomolekulárních proteinových komplexů (Sharma et al., 2021). Díky schopnosti přímo vázat vápník se CDPKs mohou chovat jako senzory pro Ca^{2+} i jako efektory (Govindasamy &

Bhanot, 2020). Ačkoli mají CDPKs konzervované aminokyselinové sekvence, jejich EF-hands jsou variabilní. Některé CDPKs mají EF-hands degenerované, nebo je úplně ztratily, což má za následek změny v citlivosti k Ca^{2+} (Shi et al., 2018).



Obrázek 2: CDPKs a jim příbuzné protein kinázy. Kinázy obsahují čtyři domény. Ve směru od N-konce k C-konci jsou to: N-terminální doména o rozličné délce a sekvenci (v diagramu černá čára), protein kinázová katalytická doména (PKD) (modrý obdelník), serine/threonine doména (červená čára) a calmodulin-like vápník vázající doména (CaM-like) (zelený obdelník), která obsahuje EF-hands (fialové elipsy) (Harmon et al., 2001; Zhang et al., 2019). Skupina CDPKs obsahuje šest typů protein kináz, které se liší právě v jejich calmodulin-like regulačních oblastech s EF-hand doménami (Harmon et al., 2001). Převzato z (Zhang et al., 2019).

1.3.4 CDPKs u rostlin

Signalizace vápníkem a CDPKs je důležitá pro velké množství dějů v rostlině. Důkazem toho je, že jsou tyto dráhy evolučně konzervované od řas až po vyšší rostliny (Shi et al., 2018). V rostlinných buňkách hrají CDPKs zásadní roli ve vývoji rostliny a během růstu (Boudsocq & Sheen, 2013; Hrabak, 2000; Sharma et al., 2021). CDPKs jsou výjimečné hlavně svými mnohostrannými funkcemi v komplexním imunitním systému a při stresové signalizaci, včetně respiračního vzplanutí, pohybu průduchů a hormonální signalizace. Byla pozorována rozdílná míra exprese CDPKs v odpovědích na různé stimuly, jako je chlad, sucho, salinita, patogeny a kyselina abscisová (Boudsocq & Sheen, 2013). Bylo zjištěno, že rostlinné CDPKs mají vliv na aktivaci a represi enzymů, kontrolují různé signální kaskády a regulují aktivitu transkripčních faktorů a transportních kanálů (Boudsocq & Sheen, 2013; Sharma et al., 2021).

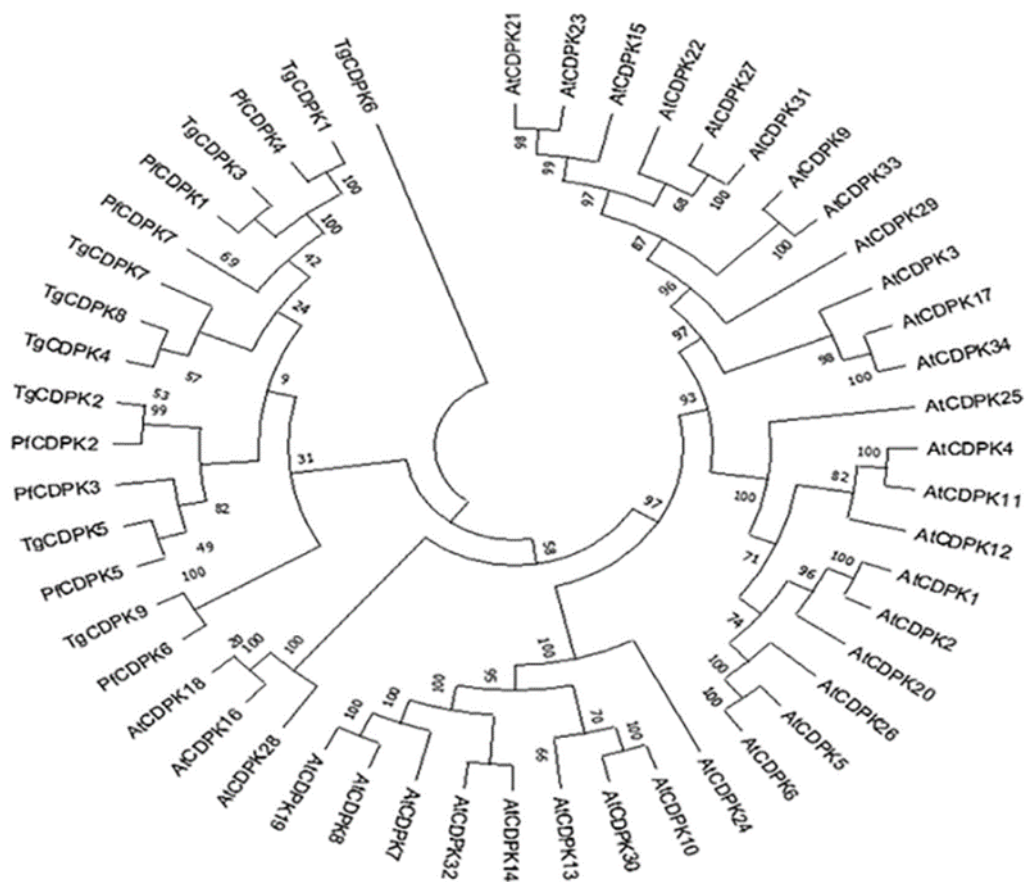
Skupina CDPKs je v rostlinách velice rozšířená. U *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 34 kináz (Sharma et al., 2021; Shi et al., 2018), u rýže (*Oryza sativa*) 31 a alespoň 20 u pšenice (*Triticum aestivum*) (Boudsocq & Sheen, 2013). Jednotlivé CDPKs se mezi sebou liší v jejich expresi, v lokalizaci uvnitř buňky, v citlivosti k Ca^{2+} , ve specifitě substrátu, ve fosforylaci a také v interakcích s proteiny (Boudsocq & Sheen, 2013; Harmon et al., 2000). Některé kinázy jsou exprimovány ve většině orgánů, zatímco jiné jsou tkáňově specifické (Boudsocq & Sheen, 2013; Harmon et al., 2000; Shi et al., 2018). Na buněčné úrovni nalezneme CDPKs hojně v meristému, xylému, pylu, ve svěřacích buňkách průduchů a v buňkách embrya (Shi et al., 2018). Uvnitř buněk se vyskytují v rozličných organelách: v cytosolu, jádře, plasmatické membráně, endoplasmatickém retikulu, tonoplastech, mitochondriích, chloroplastech, olejových těliscích a peroxisomech (Boudsocq & Sheen, 2013; Shi et al., 2018).

Právě široký arzenál jednotlivých CDPKs v rostlinách naznačuje jejich obrovský potenciál k aktivaci substrátů a k účasti na přenosu signálu v mnoha drahách (Shi et al., 2018). Shi et al. (2018) popisují, co se odehrává v rostlinné buňce na molekulární úrovni: generované Ca^{2+} jsou rozpoznávány a dekodovány těmito specifickými kinázami a vzápětí je spuštěna fyziologická a chemická odpověď. Avšak stále není jasné, jak vznikají Ca^{2+} , které se již od začátku liší podle stimulu, který signalizují. Posttranslační modifikace CDPKs včetně autofosforylace, myristoylace a palmitoylace (navázání specifických lipidů) jsou rozhodující pro funkci CDPKs a jejich umístění v buňce (Shi et al., 2018).

Boudsocq a Sheen (2013) se ve svém článku zabývají imunitní a stresovou signalizací, kde tvrdí, že více CDPKs z podskupiny I má klíčovou roli v ochranném respiračním vzplanutí a to tím, že aktivuje NADPH oxidázy jejich přímou fosforylací. CDPKs projevují napříč rostlinami konzervované obranné funkce, které podněcují apoptózu. Na druhou stranu autoři podotýkají, že existuje několik kináz, u kterých byl prokázán negativní efekt na obranu rostliny. Různé CDPKs z odlišných podskupin zprostředkovávají reakce rostliny na poranění a herbivory, a to tím že regulují syntézu hormonů a genovou expresi. Tyto kinázy mohou mít buď pozitivní nebo negativní efekt. Boudsocq a Sheen (2013) si povšimli, že by některé CDPKs mohly mít opačné role v různých typech buněk. Za různé fyziologické funkce těchto kináz v rozmanitém buněčném prostředí jsou pravděpodobně zodpovědné odlišné substráty (Boudsocq & Sheen, 2013).

1.3.5 CDPKs u parazitů ze skupiny Apicomplexa

Výtrusovci získali mnoho jedinečných schopností spojených s jejich různorodým přizpůsobením k parazitickému způsobu života (Billker et al., 2009; Sharma et al., 2021). Výskyt CDPKs u rostlin a výtrusovců souvisí s jejich společným evolučním původem (Sharma et al., 2021); k oddělení těchto dvou skupin pravděpodobně došlo ještě před rozdělením rostlin a živočichů (Billker et al., 2009). Vlastnosti rostlin výtrusovci také získali díky sekundární endosymbióze, při které pohltili buňku řasy a došlo k vytvoření apikoplastu (Billker et al., 2009).



Obrázek 3: Fylogenetická analýza CDPKs *A. thaliana* (AtCDPK, rostliny), *P. falciparum* (PfCDPK, výtrusovci) a *T. gondii* (TgCDPK, výtrusovci). Fylogenetická analýza CDPKs *A. thaliana* (34 enzymů) s CDPKs *P. falciparum* (7 enzymů) a *T. gondii* (12 enzymů) ukázala značnou blízkost mezi CDPKs u Apicomplexa a *A. thaliana*. Převzato z (Sharma et al., 2021).

Signální dráhy výtrusovců tedy mají jak konzervované, tak unikátní rysy (Billker et al., 2009). Na rozdíl od mnohobuněčných organismů je vápníkový signál u výtrusovců primárně vnímán a přenášen právě díky CDPKs (Sharma et al., 2021). CDPKs jsou u Apicomplexa méně početné oproti jejich zastoupení v rostlinách (Sharma et al., 2021). I přesto jsou však CDPKs parazitických výtrusovců zásadní pro různé fyziologické procesy, a proto jsou nepostradatelné pro úspěšné dokončení životního cyklu (Sharma et al., 2021) - řídí například sekreci proteinů, pohyb, invazi, egress, gametogenezi a také vývoj jedince (Billker et al., 2009; Mitcheson et al., 2015; Sharma et al., 2021). CDPKs se u Apicomplexa dělí na několik hlavních tříd (Billker et al., 2009), ovšem každá třída těchto kináz může mít jinou funkci i v relativně příbuzných organismech.

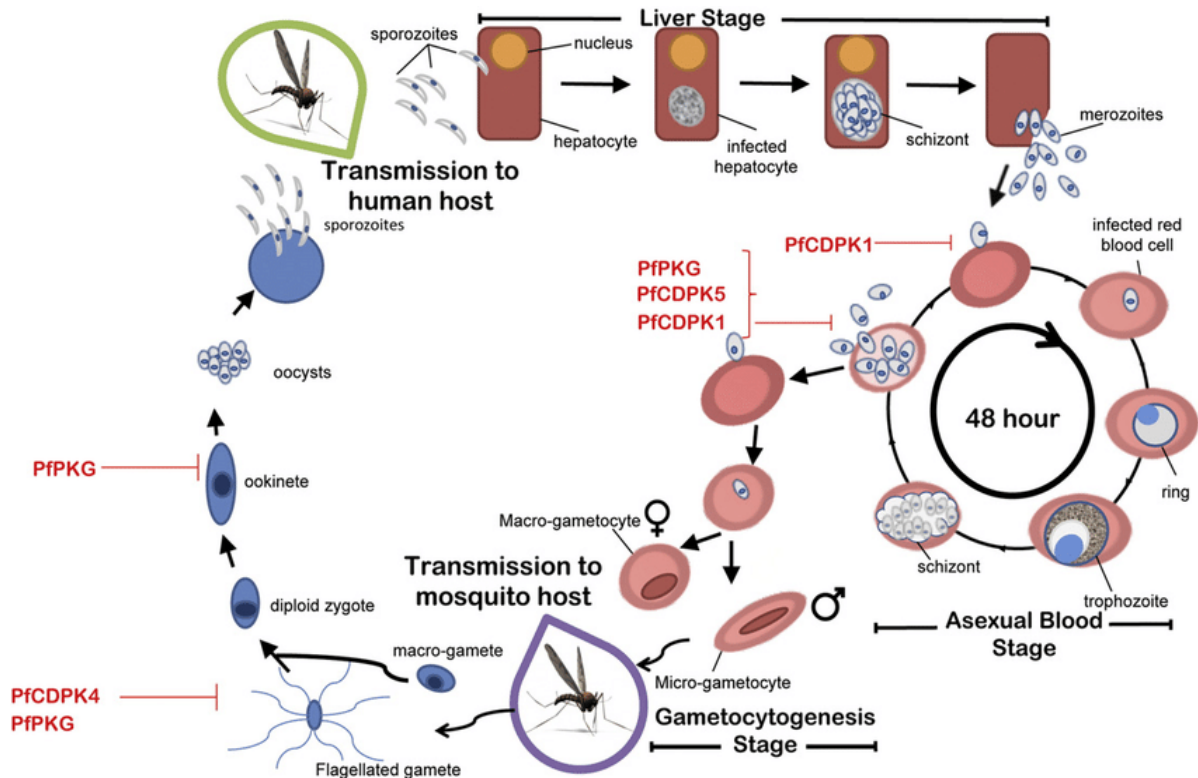
Mezi nejčastěji studovaná Apicomplexa patří *P. falciparum* (jehož kinázy se značí zkratkou PfCDPK), *Plasmodium berghei* napadající hlodavce (PbCDPK), *T. gondii* (TgCDPK) a *C. parvum* (CpCDPK). U *P. falciparum* se nachází 7 CDPKs (Mitcheson et al., 2015), u *T. gondii* 12 CDPKs (Wang et al., 2015) a u *C. parvum* 6 CDPKs (Zhang et al., 2021). Různé role CDPKs jsou dány díky jejich rozdílům v expresi a vnitrobuněčné lokalizaci během proměnlivých stádiích vývoje parazita (Sharma et al., 2021). Jak už bylo zmíněno, jednotlivé kinázy mají u rostlin i u výtrusovců odlišnou citlivost ke koncentraci Ca^{2+} (Sharma et al., 2021). Je zajímavé, že několik CDPKs v plasmodiích hlodavců se navzájem funkčně překrývají, což naznačuje možnou spolupráci mezi různými kinázami, aby bylo dosaženo co nejlepšího fyziologického výsledku ve stejné signalizační kaskádě (Sharma et al., 2021). Za určitých podmínek se mohou parazité adaptovat a zredukovat, nebo dokonce úplně přijít o aktivitu konkrétních CDPKs (Sharma et al., 2021).

Sharma et al. (2021) se věnují dynamice vápníku a jeho skladování u parazitů rodu *Plasmodium*. Vápník vně buňky hraje kritickou roli během invaze do červených krvinek sporozoity či merozoity. Dále je vápník potřebný pro vývoj parazita v erythrocytech, zejména při přechodu do stádia trofozoitu. Koncentrace Ca^{2+} je v neparazitovaných erythrocytech trvale nízká. V parazitovaných erythrocytech se koncentrace Ca^{2+} dynamicky mění s tím, jak se vyvíjí parazit uvnitř. Aby parazitované červené krvinky nemusely čelit malé dostupnosti vápníku, dokáže parazit značně zvýšit jeho příjem pravděpodobně pomocí svých vlastních iontových kanálů na povrchu infikovaného erythrocytu. Navíc parazit používá Ca^{2+} ATPázy. Tyto ATPázy jsou odvozené od plasmatické membrány erythrocytu, aby pumpovaly vápník do parazitoforní vakuoly (Sharma et al., 2021). Většina parazitů ze skupiny Apicomplexa používá parazitoforní vakuolu k usídlení a namnožení se v cytoplazmě hostitelské buňky (Cesbron-Delauw et al.,

2008). Parazitoformní vakuola pochází z parazitových i hostitelových komponent (Cesbron-Delauw et al., 2008). Na začátku druhého infekčního cyklu slouží parazitoformní vakuola jako úložiště vápníku, což je důležité pro počátek infekce v oblasti s nepříznivým ionickým prostředím (Sharma et al., 2021). I krátký pokles hladiny vápníku v parazitoformní vakuole je kritický pro vývoj parazita uvnitř erytrocytu (Sharma et al., 2021).

Změny koncentrace vápníku v hostitelské i parazitární buňce velice dobře korelují s rozhodujícími rolemi jednotlivých CDPKs, a to hlavně při přechodech do následujících vývojových stádií (viz Obrázek 4). PfCDPK1, 2, 3 a 5 jsou považovány za klíčové pro erytrocytální asexuální stádia životního cyklu parazita (Mitcheson et al., 2015). PfCDPK5 a PfCDPK1 jsou zapojeny v invazi a egress merozoitů do/z erytrocytů (Mitcheson et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2021). Bylo zjištěno, že PbCDPK1 nebo PbCDPK5 také regulují tzv. pre-erytrocytální cyklus díky přímému vlivu na pohyb sporozoitů, kteří bez těchto dvou enzymů ztrácí schopnost se plynule pohybovat, byť stále mají možnost přesouvat se mezi buňkami (Govindasamy & Bhanot, 2020). PfCDPK4 by se měla účastnit gametogeneze (Mitcheson et al., 2015) a fylogeneticky souvisí s TgCDPK1, která reguluje buněčný cyklus v samčích gametocytech (Wang et al., 2015) a s CpCDPK1 (Zhang et al., 2021). TgCDPK1 a TgCDPK3 byly vyžadovány během egress, ale pouze TgCDPK1 byla potřeba během invaze (Lourido et al., 2012). Wang et al. (2015) to potvrzují tím, že při potlačení TgCDPK1 dojde k oslabení klouzavého pohybu, invaze do hostitelských buněk a schopnosti egress. TgCDPK3 ovlivňuje pohyb parazita (Lourido et al., 2012), ale jeho ortolog PbCDPK1 hraje klíčovou roli ve vývoji schizontů, invazi do erytrocytů a regulaci mRNAs, aby byla zajištěna exprese proteinů ve specifickém čase a stádiu (Wang et al., 2015). To potvrzuje skutečnost, že ortologní geny blízce příbuzných organismů mají různě specializované funkce. Nedávné studie ukázaly, že TgCDPK7 je zásadní pro dělení a růst parazita (Wang et al., 2015). Dále se TgCDPK7 podílí se na správném umístění a rozdělení centrosomu během dělení parazita (Morlon-Guyot et al., 2014). PbCDPK1, 4 a 5 jsou dynamicky exprimované v pre-erytrocytických stádiích a také je potřebné pro pohyblivost sporozoitů (Govindasamy & Bhanot, 2020). Hlavně PbCDPK5 je žádoucí pro opuštění hepatocytů a vývoj dál ze stádia merozomů (Govindasamy & Bhanot, 2020). Třída PbCDPK6 je důležitá pro kontrolu změny sporozoitů z migračního na invazní fenotyp (Wang et al., 2015). Nejméně jsou CDPK studované u *C. parvum*. CpCDPK4 a CpCDPK6 by se mohla účastnit invaze nebo raného vývoje uvnitř buňky (Zhang et al., 2021). Fylogenetická analýza ukázala ortolog k CpCDPK4 u *T. gondii* – TgCDPK4B, zatímco nebyl nalezen žádný ortolog k *P. falciparum* (Zhang et al., 2021). Skupina *Babesia* je oproti výše

zmíněným modelovým organismům velmi málo zkoumaná, přestože se jedná o jednoho z nejdůležitějších parazitů dobytka na světě (Hussein et al., 2021). Hussein et al. (2021) zkoumali CDPK4 u *B. bovis* a zjistili, že je důležitá při vývoji sexuálních stádií a kinet, ale funkce dalších CDPKs zatím nebyly objasněny.



Obrázek 4: Schéma zapojení CDPKs během životního cyklu *P. falciparum*. Jednotlivé CDPKs a protein kináza G (cGMP-dependentní protein kináza, PKG) regulují zásadní vývojové změny během životního cyklu parazita. Převzato z (Mitcheson et al., 2015).

CDPKs by mohly být potenciálním cílem pro nově vyvíjené typy léčiv, protože u hostitelských druhů se CDPKs nevyskytují, a ani v lidském genomu nejsou kódovány žádné ortology (Sharma et al., 2021; Wernimont et al., 2011). Dále ovšem Sharma et al., (2021) namítá, že *Plasmodium* sdílí mnoho aminokyselinových sekvencí a strukturních podobností s eukaryotickými protein kinázami v místě pro vazbu ATP. A zdůrazňuje, aby byla léčiva zacílena opravdu na CDPKs parazita, a ne omylem na savčí kinázy, abychom se vyhnuli toxicitě způsobené vedlejšími účinky na buněčnou signalizaci a regulaci hostitelské buňky.

2 Cíle práce

- Stručná literární rešerše na téma významu vápníkové signalizace a současných poznatků o struktuře a funkci CDPKs.
- Osekvenovat gDNA putativních BdCDPKs a porovnat je s *in silico* predikovanými sekvencemi z databáze Piroplasmadb.org.
- Připravit cDNA z krevních stádií *B. divergens*, a zaklonovat a osekvenovat kódující sekvence putativních BdCDPKs.
- Provést analýzu struktury BdCDPKs pomocí predikce proteinových domén.
- Provést fylogenetickou analýzu klastrování BdCDPKs s izoenzymy vybraných modelových druhů ze skupiny Apicomplexa.
- Navrhnout design experimentu pro dynamickou analýzu exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs pomocí kvantitativní PCR.

3 Materiál a metody

3.1 Kultivace *B. divergens*

V této práci byl používán kmen *B. divergens* 2210A G2 (Jalovecka et al., 2016). *In vitro* kultivace *B. divergens* probíhala ve směsi bovinních erytrocytů a kultivačního média (viz kapitola 3.1.1) a kultura byla uchovávána v inkubátoru (Galaxy 170 S, Eppendorf) při konstantních podmínkách: 37 °C a 5 % CO₂. Erytrocyty použité ke kultivaci byly získány z jatečního dobytka a musely být nejprve přečištěny od séra. Přečištění odebrané krve začíná její defibrinací. Poté je krev třikrát promyta promývacím médiem (viz Tabulka I) a centrifugována (Multi Centrifuge 3SR, Heraeus; 4 °C, 2000 × g, 10 min), čímž je dosaženo odstranění zbývající fibrinové složky a krevního séra.

3.1.1 Udržování kultur

Při rutinním udržování kultury *B. divergens* byla používána 24-jamková destička (Techno Plastic Products) a při práci s kulturami bylo vždy dbáno na dodržování základních aseptických technik práce. Pasážování kultur bylo prováděno vždy jednou za dva až tři dny v laminárním boxu (Airstream® Class II, BSCO) a probíhalo následujícím způsobem. Nejprve byly do prázdné jamky přidány 2 ml kultivačního média. Složení kultivačního média je uvedeno v Tabulce I. Do jamky pak bylo přidáno 50 µl přečištěných bovinních erytrocytů a 10 µl sedliny, která obsahovala erytrocyty s parazity. Tato sedlina byla odebírána z jamky z předchozího pasážování. Způsob pasážování je možné pozměnit například v případě, když je v jamce nižší (pouze výměna média) nebo naopak příliš vysoká parazitémie (častější pasáž nebo menší pasážovaný objem kultury). Parazitémie byla pravidelně zjišťována vždy před pasážováním pomocí barvených krevních roztěrů (viz kapitola 3.1.2), které byly mikroskopicky analyzovány (viz kapitola 3.1.2). V případě potřeby byla kultura *B. divergens* namnožena do větších objemů, například pro izolaci gDNA (genomická DNA) nebo RNA (viz kapitoly 3.2.1 a 3.3.1). Do kultivační lahve 25 cm² (VWR) bylo přidáno 8 ml kultivačního média, 250 µl bovinních erytrocytů a celý objem jedné jamky z 24-jamkové destičky, kde bylo předtím vyměněno kultivační médium. Pro kultivaci do lahve 75 cm² (VWR) bylo použito 30 ml kultivačního média, 1 ml bovinních erytrocytů a celý obsah lahve 25cm², kde bylo odebráno původní médium a přidán stejný objem nového (10 ml).

Tabulka I: Složení promývacího a kultivačního média.

Chemikálie	Promývací médium	Kultivační médium
RPMI 1640 (Lonza)	500 ml	400 ml
Amphotericin B (Sigma, c=250 µg/ml)	0,5 ml	0,5 ml
Gentamycin sulfát (Sigma, c=10 mg/ml)	2,5 ml	2,5 ml
Fetální bovinní sérum (Capricorn)	-	100 ml

3.1.2 Mikroskopická analýza

Pravidelné mikroskopické sledování kultur *B. divergens* je důležité pro již zmíněné určení parazitémie, ale i pro kontrolu zda kultura nebyla kontaminována. Z kultury bylo odebráno malé množství sedimentu s parazitovanými erytrocyty (přibližně 2 µl), přeneseno na podložní sklíčko a pomocí druhého podložního sklíčka byl vytvořen krevní roztěr („blood smear“). Roztěr byl po zaschnutí nabarven následujícím způsobem. Nejprve bylo sklíčko 10× ponořeno do roztoku Diff-Quik Fix (Siemens), poté 10× do Diff-Quik I (Siemens) a nakonec bylo po 60 sekund ponecháno v Diff-Quik II (Siemens). Takto nabarvený a zafixovaný krevní roztěr byl opláchnut vodou, jemně postříkán 70% ethanolem a opět opláchnut vodou. Připravený preparát byl analyzován pod světelným mikroskopem (Olympus BX53F) při zvětšení 1000× s použitím imerzního oleje (Olympus). Parazitémie byla počítána jako poměr infikovaných erytrocytů z celkového počtu 1000 spočtených erytrocytů.

3.2 Sekvence gDNA predikovaných BdCDPKs

3.2.1 Izolace gDNA

Kultura *B. divergens* byla namnožena v kultivační lahvi 25 cm² (VWR) na parazitémii ~10%. Obsah lahve byl centrifugován (Multi Centrifuge 3SR, Heraeus; 5 minut, 2000 × g, zpomalování 1) a z peletu bylo odebráno 50 µl, k nimž bylo přidáno 150 µl 1×PBS (Phosphate Buffered Saline). Složení 1×PBS: 8g NaCl, 0,2g KH₂PO₄, 2,9g Na₂HPO₄ · 12H₂O a 0,2g KCl, doplněno destilovanou vodou do objemu 1l. Ze směsi peletu a 1×PBS byla následně izolována gDNA pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Blood DNA (Macherey-Nagel) dle návodu výrobce. gDNA byla uchovávána při -20°C. Poté byla pomocí PCR (viz kapitola 3.2.3) s již dříve v laboratoři ověřenými primery (viz Tabulka II) a následnou elektroforézou (viz kapitola 3.2.3) ověřena skutečnost, že je gDNA správně vyizolována.

Tabulka II: Primery pro ověření izolace gDNA.

Název	Interní značení	Sekvence	T _m
BdSub1_pet100_F	PK809	CACCACACTGGACCAGGAGACACCTTC	60 °C
BdSub1_pet100_R	PK810	CTATGGAAAGAAGTAGACTTGCAACACCCG	60 °C

3.2.2 Design sekvenačních primerů

Sekvenační primery pro jednotlivé putativní kinázy (Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560 a Bdiv_035940c) byly designovány v programu SnapGene® Viewer 5.2.4 a jejich seznam a vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce III. První forward primery (seq_F) byly navrženy v oblasti 150 bp před kódující sekvencí a reverse primery (seq_R) byly navrženy v oblasti 150 bp za kódující sekvencí.

Tabulka III: Sekvenační primery pro geny kódující BdCDPKs

Název	Sekvence	T _m
MJ_7_Bdiv_014540c_seq_F	CGGGAAGAAACAAACATGGC	55 °C
MJ_8_Bdiv_014540c_seq_F2	CAGCTTGATCATCCAAACATCG	
MJ_9_Bdiv_014540c_seq_F3	GAAGTCGCCAAGTTCGACAA	
MJ_10_Bdiv_014540c_seq_R	CTTGGTGATGCTAACGCAC	
MJ_11_Bdiv_024410_seq_F	GCTACGAATACTAAACGCAG	55 °C
MJ_12_Bdiv_024410_seq_F2	CAAAACGTAGTACACCGTGATC	
MJ_13_Bdiv_024410_seq_F3	CAGCAAAATGGACAAGAACGG	
MJ_14_Bdiv_024410_seq_R	CGAGCTACTGCGAATTTGGT	
MJ_20_Bdiv_030560_seq_F	CATGTCTACAGTCGTGATGCC	55 °C
MJ_21_Bdiv_030560_seq_F2	GGTAGCGCTTCTGAAAGCA	
MJ_22_Bdiv_030560_seq_F3	GTTTGGATGAGGCTGAGACC	
MJ_23_Bdiv_030560_seq_F4	CGATACGCCTACTTCTTCGA	
MJ_24_Bdiv_030560_seq_F5	GTGATAAGGAGAGCACCAAGC	
MJ_25_Bdiv_030560_seq_F6	GACAAGACTGAGAGTGCGAC	
MJ_26_Bdiv_030560_seq_R	GAAGGCGCATGGATCGTAAT	
MJ_27_Bdiv_035940c_seq_F	GGGGAAGTTTAAGAATCTTCTCGC	
MJ_16_Bdiv_035940c_seq_F2	GTCGTCGAGGGATGTGACT	55 °C
MJ_17_Bdiv_035940c_seq_F3	GTAGCACCTGAGGTGTTACTT	
MJ_18_Bdiv_035940c_seq_F4	GGAGCAGGATGTTTATATGCAGA	
MJ_19_Bdiv_035940c_seq_R	AGGGCTCTTCTTGCAAATG	

3.2.3 PCR a elektroforéza

Před sekvenováním musely být žádané geny naamplifikovány pomocí PCR. Pro každý gen byly provedeny dvě nezávislé PCR. Úseky gDNA byly vymezeny prvním forward a jediným reverse primerem (viz Tabulka III, primery s označením seq_F a seq_R). Objem PCR reakce činil 25 μ l. Tato reakce obsahovala 12,5 μ l Combi PPP Master Mixu (Top-Bio), 7,5 μ l Ultra PCR H₂O (Top-Bio), 3 μ l templátové gDNA, 1 μ l 10 μ M forward primeru a 1 μ l 10 μ M reverse primeru. PCR probíhaly v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) nastaveném dle hodnot v Tabulce IV.

Tabulka IV: Parametry nastavení termocycleru pro PCR.

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	15 s	30
Nasednutí primerů	55 °C ¹	15 s	
Elongace	72 °C	1 min na 1 kb ²	
Finální elongace	75 °C	7 min	1
Chlazení	22 °C		

¹ odpovídá T_m navržených sekvenačních primerů viz Tabulka III

² gen Bdiv_014540c (2019 bp) – elongace 2,5 min; gen Bdiv_024410 (1855 bp) – elongace 2 min; gen Bdiv_030560 (3883 bp) – elongace 4 min; gen Bdiv_035940c (2376 bp) – elongace 3 minuty

Následně byla provedena elektroforéza k ověření, zda PCR správně proběhla. Pro elektroforézu byl připraven 1% agarózový gel, obsahující 50 μ l 1 \times TAE, 0,5g agarózy (Bioline) a 0,5 μ l ethidium bromidu (Sigma-Aldrich). Zásobní 50 \times TAE pufr vznikl smícháním 242g TRIS, 100 μ l 0,05M EDTA a 1ml CH₃COOH, doplněno destilovanou vodou na objem 1l. Do první jamky na gelu bylo přidáno 3 μ l 1 kb ladderu (Thermo scientific) pro ověření délky produktů. Do dalších jamek bylo přidáváno po 5 μ l PCR produktu. Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (Mupid-One, Advance) při napětí 100 V po dobu 25 minut. Gel byl poté vizualizován pod UV světlem pomocí UV transluminátoru (G:BOX F3, Syngene).

3.2.4 Enzymatické přečištění a sekvenace

Zbylých 20 μ l PCR produktu bylo enzymaticky přečištěno přidáním 0,75 μ l Exonukleázy I (Thermo scientific) a 1,5 μ l FastAPTM termosenzitivní alkalické fosfatázy (Thermo scientific). Tato směs byla 15 minut inkubována v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) při 37 °C a poté dalších 15 minut při 85 °C. Z takto přečištěného PCR produktu bylo odebráno 7,5 μ l a smícháno s 2,5 μ l daného sekvenačního primeru (viz Tabulka III). Takto připravená směs o celkovém objemu 10 μ l byla odeslána na Sangerovo sekvenování do laboratoře SEQme. Výsledky sekvenace byly vyhodnocovány v programu Geneious Prime (verze 2021.0.3).

3.3 Příprava cDNA z krevních stádií *B. divergens*, zaklonování a osekvenování kódující sekvence predikovaných BdCDPKs

3.3.1 Izolace RNA

Obdobně jako před izolací gDNA (viz kapitola 3.2.1) byla *in vitro* kultura *B. divergens* namnožena v kultivační lahve 25 cm² (VWR) na parazitěmii ~10%. Kultura byla centrifugována (Multi Centrifuge 3SR, Heraeus; 5 minut, 2000 \times g, zpomalování 1). Centrifugací se vytvořil pelet erytrocytů s parazity. Z tohoto peletu bylo odebráno 200 μ l do nové 1,5ml zkumavky (Eppendorf), k tomu bylo přidáno 800 μ l Trizolu (Sigma-Aldrich) a směs byla zhomogenizována pipetováním. Z této směsi byla poté vyizolována RNA pomocí NucleoSpin® RNA kitu (Macherey-Nagel) podle pokynů výrobce. Výsledná RNA byla uložena při teplotě -80 °C.

3.3.2 DNase treatment

Aby byly zničeny případné zbytky gDNA ve vyizolované RNA, proběhl tzv. DNase treatment pomocí TURBO DNA-freeTM Kitu (ThermoFisher scientific). Podle změřené koncentrace RNA (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) byl vypočten poměr ředění získané RNA s RNase free H₂O (Roche), tak aby bylo docíleno požadované koncentrace: 10 μ g RNA / 50 μ l celkového objemu vzorku. Dále bylo postupováno podle instrukcí výrobce TURBO DNA-freeTM Kitu (ThermoFisher scientific). Absence gDNA ve vzorku byla ověřena pomocí PCR s ověřenými primery (viz Tabulka II).

3.3.3 Reverzní transkripce

Následně byla RNA převedena na cDNA (komplementární DNA) pomocí reverzní transkripce. K tomu byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Koncentrace RNA byla určena na nanodropu (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Podle této koncentrace bylo vypočteno ředění RNA s RNase free H₂O (Roche), aby výsledná koncentrace byla mezi 1ng až 4μg a finální objem činil 9,4 μl. K takto naředěné RNA byly přidány 2 μl OligoDT (Roche). Dále bylo postupováno dle instrukcí výrobce kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Výsledná cDNA byla uskladněna při -20°C.

3.3.4 PCR, elektroforéza a přečištění z gelu

PCR a následná elektroforéza byly provedeny obdobným způsobem jako v kapitole 3.2.3. Byly použity stejné primery (viz Tabulka III, primery s označením seq_F a seq_R), avšak místo gDNA byla jako templát použita cDNA (3 μl) a na elektroforézu byl využit celý objem vzorku (25μl). Poté byly PCR produkty přečištěny z agarózového gelu pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kitu (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce.

3.3.5 Ligace PCR produktu do vektoru pGEM®-T Easy

Na nanodropu (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) byla změřena koncentrace přečištěného PCR produktu, a dle této koncentrace a velikosti vkládaného insertu bylo vypočteno, jaké množství PCR produktu použít k zaklonování. K vypočtenému množství PCR produktu bylo přidáno: 5 μl 2x Rapid Ligation Buffer (Promega), 1 μl pGEM®-T Easy Vector (50 ng) (Promega), 1 μl T4 DNA ligázy (Promega) a doplněno Ultra PCR H₂O (Top-Bio) na objem 10 μl. Takto připravená reakce byla ponechána přes noc při teplotě 16 °C, aby došlo k ligaci.

3.3.6 Výroba LB agarových ploten

K výrobě deseti LB (Luria broth) agarových ploten bylo potřeba: 2 g triptonu (Sigma-Aldrich), 1 g kvasnicového extraktu (Amresco) a 2 g NaCl (Lach-Ner) a 3 g agaru (Amresco). Tyto látky byly naváženy do skleněné nádoby a byla dolita destilovaná voda na objem 200 ml. Nádoba byla na 90 minut umístěna do autoklávu (MLS 3751, PHCbi). Poté byla nádoba přemístěna do vodní lázně (SWB15D, STUART) o 52°C, aby se médium zchladilo, ale nezatuhlo. Když mělo médium stejnou teplotu jako vodní lázeň, bylo do něj přidáno 200 μl

ampicilinu – AMP (zásobní roztok 50 mg/ml). Ve sterilním prostředí biohazard boxu (SafeFAST Classic) bylo hotové médium nalito do deseti plastových Petriho misek (Thermo Scientific). Po úplném zatuhnutí byly misky přiklopeny víčkem a uchovány při 4 °C dnem vzhůru.

3.3.7 Transformace plasmidu do kompetentních buněk, jejich kultivace na agarové plotně, PCR z kolonie

Z ligační reakce (viz kapitola 3.3.5) byly odebrány 3 µl a přidány k 50 µl kompetentních buněk One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Vzorek byl 20 minut chlazen na ledu, následně byl na 30 sekund umístěn na heatblock (Digital Dry Bath, Labnet) přehřátý na 42 °C a poté byl vzorek ihned vrácen na led. K vzorku bylo přidáno 200 µl S.O.C. média (ThermoFisher). Zkumavka byla řádně uzavřena a třepána (Gallenkamp IOI400.XX2.C, 37 °C, 1 hodina, 200rpm). Na LB AMP plotnu (viz kapitola 3.3.6) bylo rozprostřeno 50 µl Xgal (Promega) a 10 µl 1M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranozid) (Invitrogen). Na takto připravenou plotnu bylo rozetřeno 100 µl vzorku a kultura byla kultivována v inkubátoru (Froilabo) přes noc při 37°C.

Následující den bylo na agarové plotně zvoleno několik bílých kolonií, které byly nabrány špičkou pipety a rozsuspendovány v 30 µl PCR vody. Z každého vzorku byly 2 µl přidány do připravené PCR reakce (tzv. PCR z kolonie) o celkovém objemu 10µl obsahující: 5 µl Combi PPP Master Mixu (Top-Bio), 2 µl Ultra PCR H₂O (Top-Bio), 0,5 µl forward primeru M13 a 0,5 µl reverse primeru M13 (viz Tabulka V). PCR z kolonie proběhla v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) nastaveném dle hodnot v Tabulce IV a poté byla vyhodnocena elektroforézou (viz kapitola 3.2.3) Z rozsuspendovaných kolonií byly rovněž 2 µl přeneseny na novou agarovou plotnu (viz kapitola 3.3.6), kde byl udělán tzv. křížek. Tato plotna pak byla opět přes noc kultivována při 37 °C (Froilabo) a následující den byly narostlé kolonie využity na izolaci plasmidu (tzv. miniprep, viz kapitola 3.3.8).

Tabulka V: Primery pro PCR z kolonie

Název	Sekvence	T _m
M13 forward	TGTAACGACGGCCAGT	55 °C
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	55 °C

3.3.8 Izolace plasmidu a sekvenace

Podle výsledku PCR z kolonie (viz kapitola 3.3.7) byly vybrány pozitivní klony, tedy ty které obsahovaly plasmid se zaklonovaným genem. Z křížků, které korespondovaly s PCR ověřenými pozitivními klony byly připraveny miniprepy. Miniprep obsahoval 4 ml tekutého LB (Luria broth) média, 4 µl AMP a pipetovací špičkou přenesené buňky z vybraných křížků. 1 l LB média obsahoval: 10 g triptonu (Sigma-Aldrich), 5 g kvasnicového extraktu (Amresco) a 10 g NaCl (Lach-Ner). Takto připravené vzorky (tzv. miniprepy) byly uzavřeny víčkem a přes noc třepány v třepačce (Gallenkamp IOI400.XX2.C, 37 °C, 200rpm).

Obsah miniprepů s namnoženými buňkami byl po 1ml postupně odebírán a centrifugován (Centrifuge 5424 Eppendorf, 30 sekund, 11 000 × g). Supernatant byl vždy odstraněn. K izolaci plasmidu byl použit NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) kit (Macherey-Nagel) a bylo postupováno dle přiloženého návodu.

U vyizolovaného plasmidu byla změřena koncentrace (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Na sekvenaci bylo zasláno vždy 500 ng plasmidu, ke kterému bylo přidáno 2,5 µl sekvenačního primeru (viz Tabulka III) a celkový objem byl pak doplněn do 10 µl Ultra PCR H₂O (Top-Bio). Vzorek byl odeslán na Sangerovo sekvenování do laboratoře SEQme a výsledky sekvenace byly vyhodnocovány v programu Geneious Prime (verze 2021.0.3).

3.4 Predikce proteinových domén BdCDPKs

Osekvenované kódující sekvence BdCDPKs (Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560) (viz kapitola 3.3.8) byly přeloženy do proteinové sekvence pomocí online platformy Translate tool - ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Protože u genu Bdiv_035940c nebylo možné získat cDNA k osekvenování (viz kapitola 4.2), byla pro tento gen proteinová sekvence stažena z Piroplasmadb.org. Predikce proteinových domén a funkčních motivů proběhla v rámci programu Geneious Prime (verze 2021.0.3) pomocí pluginu InterProScan.

3.5 Fylogenetická analýza BdCDPKs

Pro fylogenetickou analýzu byly využity proteinové sekvence BdCDPKs s predikovanými doménami (viz kapitola 3.4), a již ověřené či pouze predikované sekvence CDPKs modelových parazitů ze skupiny Apicomplexa (*C. hominis*, *C. parvum*, *Cyclospora*

cayetanensis, *Eimeria tenella*, *Hammondia hammondi*, *T. gondii*, *P. berghei*, *Plasmodium cynomolgi*, *P. falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax*, *Theileria anulata*, *Theileria equi*, *Theileria orientalis*, *Theileria parva*, *Cytauxzoon felis*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. microti* a *Babesia ovata*) a jim blízké příbuzných organismů (*Chromera velia*, *Vitrella brassicaformis*) (viz příloha č. 5), které byly staženy z několika databází: Piroplasmadb.org, Plasmodb.org, Cryptodb.org a Toxosdb.org. Sekvence byly ukládány v programu Geneious Prime (verze 2021.0.3), kde byly podrobeny analýze predikce domén a funkčních motivů (viz kapitola 3.4). Takto ověřené sekvence byly redukovány na serine/threonine doménu a EF-hands a následně pomocí software MUSCLE Alignment uspořádány (alignovány). Výsledný alignment byl poté podroben fylogenetické analýze metodou maximální pravděpodobnosti (ML - maximum likelihood) v online platformě IQ-TREE multicore [verze 1.6.12, (Nguyen et al., 2015)]. Analýza proběhla za použití modelu LG+I+G4+F, který byl vybrán pomocí ModelFinder programu (Kalyaanamoorthy et al., 2017) v rámci téže platformy. Bootstrapová analýza byla stanovena s tisíci opakováními. Výsledný fylogenetický strom byl zobrazen opět v programu Geneious Prime (verze 2021.0.3), a poté graficky upraven v programu CorelDRAW Graphics Suite 2017.

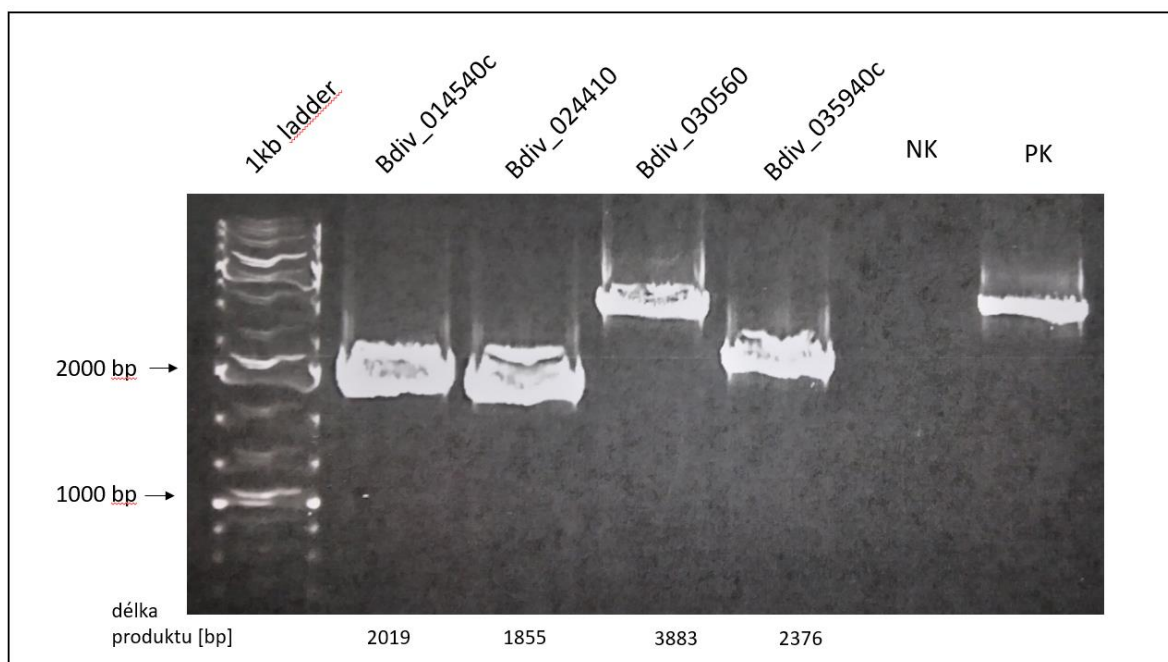
3.6 Analýza exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs: design experimentu

Plán experimentu analyzující dynamiku exprese individuálních BdCDPKs v *in vitro* kultuře *B. divergens* pomocí kvantitativní PCR (qPCR) je uveden v kapitole 4.5. PCR ověřující design qPCR primerů (viz Tabulka VI) byla provedena stejným způsobem jako v kapitole 3.2.3, jen s rozdílem, že jako templát bylo použito 3 μ l cDNA. Termocycler (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) byl nastaven na stejné parametry jako v Tabulce IV, jen se lišila teplota nasednutí primerů, která odpovídala T_m qPCR primerů – tedy 60 °C. Doba elongace byla snížena na 30 sekund, protože délky očekávaných produktů činily méně než 200 bp. Pro elektroforézu byl připraven 2% agarózový gel.

4 Výsledky

4.1 Analýza gDNA sekvencí Bd CDPKs

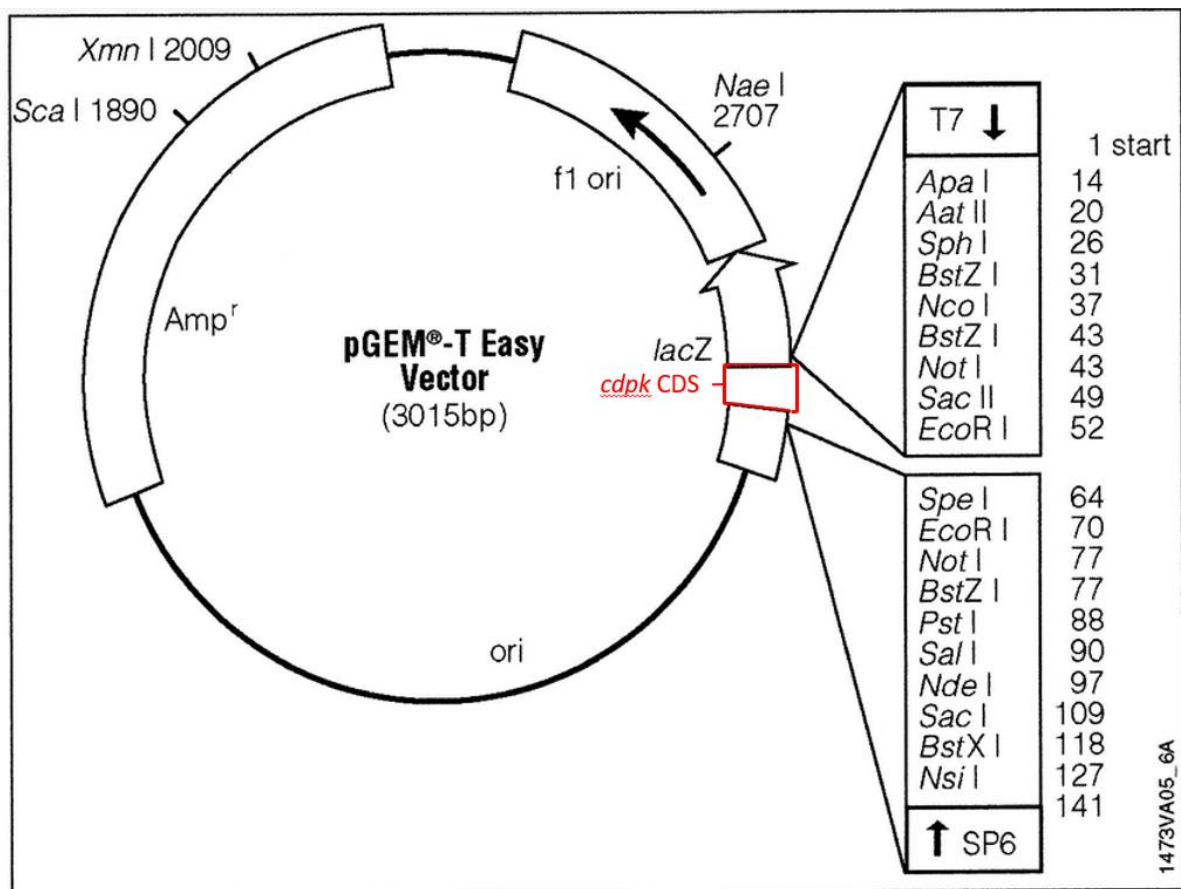
Pomocí PCR s ověřenými primery (viz Tabulka II) a následné elektroforézy bylo ověřeno, že gDNA byla vyizolována úspěšně. Při další PCR s mnou navrženými primery (viz Tabulka III) byly naamplifikovány čtyři úseky DNA kódující predikované BdCDPKs (viz Obrázek 5). Tyto PCR produkty pak byly po částech úspěšně osekvenovány pomocí sekvenačních primerů (viz Tabulka III). Výsledný konsenzus sekvencí byl potvrzen osekvenováním dalšího nezávislého PCR produktu pro každý gen. Sekvence *cdpk* genů z našeho modelového kmenu *B. divergens* 2210A G2 byly poté v pomoci aligmentů porovnány s referenčními sekvencemi staženými z Piropasmadb.org. Výsledné sekvence jsou uvedeny v přílohách č. 1-4. Sekvence genů Bdiv_014540c a Bdiv_030560 se nelišily od referenčních sekvencí z Piropasmadb.org. V sekvenci genu Bdiv_024410 byl odhalen jeden SNP (jednonukleotidový polymorfismus) (viz příloha č. 2). Jedná se o záměnu z adeninu (v referenční sekvenci) na cytosin. Tato změna nemění význam kodónu aminokyseliny. V sekvenci genu Bdiv_035940c bylo zjištěno celkem 14 SNPs (viz příloha č. 4) z nichž jeden mění význam dané aminokyseliny, a to z alaninu (GCC) na valin (GTC).



Obrázek 5: Amplifikace predikovaných BdCDPKs. Bdiv_014540c (2019 bp), Bdiv_024410 (1855 bp), Bdiv_030560 (3883 bp) a Bdiv_035940c (2376 bp). $T_m = 55^\circ\text{C}$. NK je negativní kontrola bez templátu. PK je pozitivní kontrola s ověřenými primery (viz Tabulka II). Byl použit 1 kb ladder (Thermo scientific).

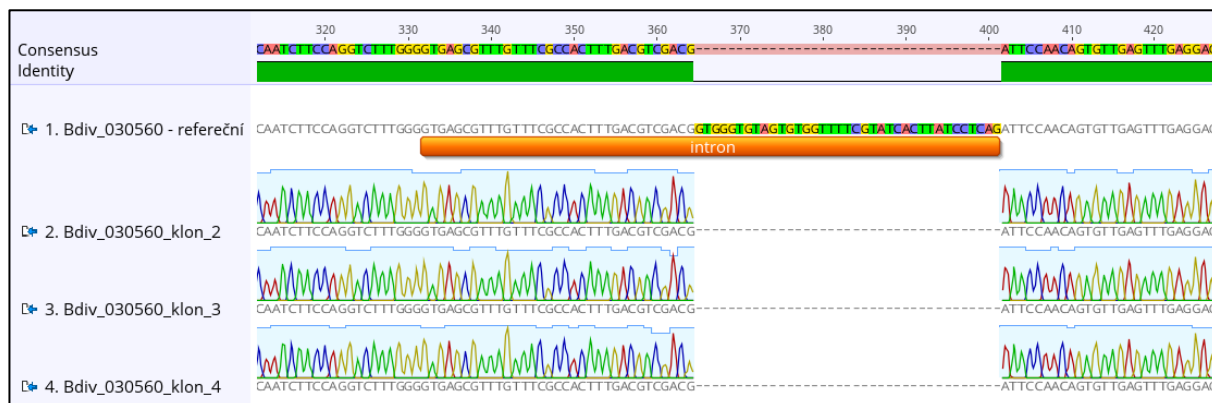
4.2 Analýza kódujících sekvencí BdCDPKs

Kódující sekvence (cDNA) tří BdCDPKs byly úspěšně zaklonovány do plasmidu pGEM®-T Easy Vector (Promega) (viz Obrázek 6), a po částech úspěšně osekvenovány (viz Tabulka III). Konsenzus výsledných cDNA sekvencí BdCDPKs našeho modelového kmenu *B. divergens* 2210A G2 byl potvrzen vždy ze tří plasmidů (samostatné kolonie kompetentních buněk). Alignment těchto tří nezávislých cDNA sekvencí byl poté porovnán s výslednými sekvencemi gDNA (viz přílohy č. 1-4) a s referenčními sekvencemi z Piroplasmadb.org.



Obrázek 6: Schéma pGEM®-T Easy Vector (Promega). Červeně vyznačené místo značí, kam byly zaklonovány kódující sekvence BdCDPKs (Bdiv_014540c, Bdiv_024410 a Bdiv_030560).

Výsledné kódující sekvence BdCDPKs jsou uvedeny v přílohách č. 1-3. Kódující sekvence genů Bdiv_014540c a Bdiv_024410 se shodovaly s predikovanými sekvencemi uvedenými Piroplasmadb.org. U genu Bdiv_030560 bylo zjištěno, že kódující sekvence je odlišná od sekvence predikované na Piroplasmadb.org (viz Obrázek 7). *In silico* predikce chybně označila část kódující sekvence jako intron. Kódující sekvence genu Bdiv_030560 je tedy delší o 33 nukleotidů (11 aminokyselin). Kódující sekvenci Bdiv_035940c se z *in vitro* kultury *B. divergens* nepodařilo naamplifikovat.

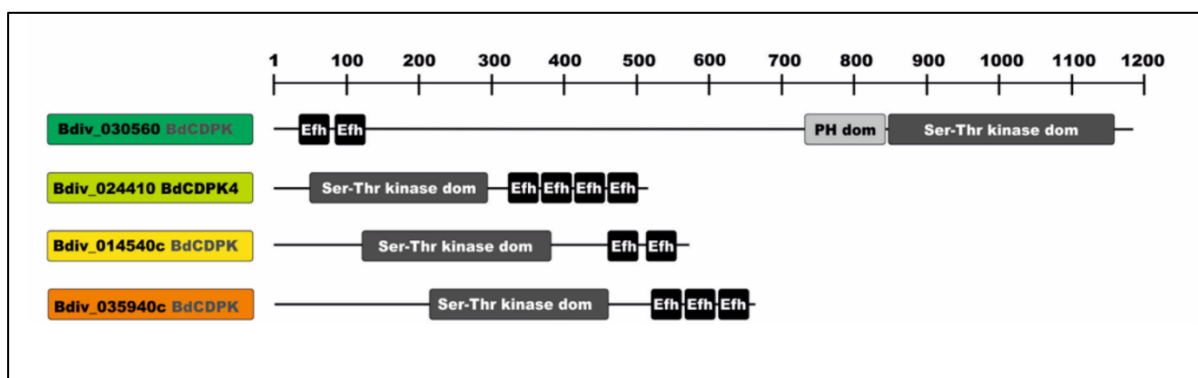


Obrázek 7: Sekvence kódující sekvence genu Bdiv_030560. Úsek sekvence cDNA ze tří klonů plasmidů (2, 3 a 4) a referenční sekvence z Piroplasmadb.org (1) byl alignován v programu Geneious Prime (verze 2021.0.3). Predikovaný intron je značen oranžovým obdélníkem.

4.3 Predikce proteinových domén sekvencí BdCDPKs

K ověření správné proteinové struktury BdCDPKs zkoumaných v této práci byly použity mnou osekvenované kódující sekvence tří BdCDPKs (Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560) (viz kapitola 3.3.8) přeložené do proteinových sekvencí (viz kapitola 3.4). Kódující sekvenci Bdiv_035940c nebylo možné získat z krevních stádií parazita (viz kapitola 4.2), a proto byla proteinová sekvence tohoto genu stažena z Piroplasmadb.org. Predikce proteinových domén (viz kapitola 3.4) ukázala, že gen Bdiv_030560 má dvě EF-hand domény v blízkosti N-terminálního konce. V druhé polovině genu se nachází PH doména (plekstrin homologní doména) a za ní následuje Ser-Thr doména (serine/threonine doména) (viz Obrázek 8, tmavě zelená). Gen Bdiv_024410 má ze všech čtyř BdCDPKs zkoumaných v této práci Ser-Thr doménu nejbliže k N-terminálnímu konci, za kterou se nacházejí čtyři EF-hand domény (viz Obrázek 8, světle zelená). Bdiv_014540c má Ser-Thr doménu téměř

uprostřed sekvence a dvě EF-hands v blízkosti C-konce (viz Obrázek 8, žlutá). Bdiv_035940c má rozsáhlou N-terminální doménu a tři EF-hands u C-konce (viz Obrázek 8, oranžová).



Obrázek 8: Schéma proteinových domén BdCDPKs. Tmavě šedé obdélníky značí serine/threonine doménu. Světle šedý obdélník vyznačuje PH doménu (plekstrin homologní doména). Černé čtverce označují úsek genu s EF-hand doménou.

4.4 Fylogenetická analýza BdCDPKs

Fylogenetická analýza klastrování BdCDPKs byla zhotovena z celkem 153 sekvencí hypotetických nebo již ověřených CDPKs z 22 druhů organismů zahrnující parazity ze skupiny Apicomplexa a jejich blízce příbuzné volně žijící organismy *C. velia* a *V. brassicaformis* (viz příloha č. 5). Výsledný fylogenetický strom je zobrazen na Obrázku 9 a jeho bázi tvoří skupina, která je podpořená hodnotou bootstrap 99%, a sdružuje dvě odlišné skupiny CDPKs. První skupina CDPK9 (bootstrap podpora 100%) zahrnuje TgCDPK9 (TGME49_217600, *T. gondii*) a analogické enzymy CDPK9 kokcií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*. Sesterskou skupinu (bootstrap 100%) pak tvoří skupina CDPK6, kam klastrují predikované CDPKs *C. velia* a *V. brassicaformis*, a CDPK6 z pěti druhů plasmodií včetně modelových PfCDPK6 (PF3D7_1122800, *P. falciparum*) a PbCDPK6 (PBANKA_0925500, *P. berghei*). K této skupině klastrují rovněž CDPK6 kokcií včetně TgCDPK6 (TGME_218720, *T. gondii*) a CDPK6 kryptosporidií reprezentovanými druhy *C. parvum* a *C. hominis*. Do skupin CDPK9 a CDPK6 neklastruje žádná ze zkoumaných BdCDPKs.

Dále se oddělují dvě větve (bootstrap 58%), do kterých již klastrují BdCDPKs. BdCDPK kódovaná genem Bdiv_030560 klastruje do skupiny CDPK7 (bootstrap 100%) (viz Obrázek 9, tmavě zelený obdélník). V rámci této skupiny se nejprve oddělují sekvence CDPK7 *H. hammondi* a TgCDPK7 (TGME49_228750) modelového organismu *T. gondii*.

Sesterskou skupinu pak tvoří CDPK7 *E. tenella*, který oproti CDPK7 *C. cayetanensis* leží na delší větvi, což může naznačovat genetickou variabilitu. V rámci CDPK7 skupiny se dále odděluje linie rodu *Plasmodium*. Nejodvozenější sekvence mají enzymy kódované geny PKNH_0920900 (*P. knowlesi*) a PcyM_0926900 (*P. cynomolgi*), patří sem však i již dobře prozkoumané PfCDPK7 (PF3D7_1123100, *P. falciparum*) a PbCDPK7 (PBANKA_0925200, *P. berghei*). Další větev pak zahrnuje zatím pouze predikované CDPKs řádu Piroplasmida, reprezentovanými rody *Cytauxzoon*, *Theileria* a *Babesia*, kde se nachází i dosud nepopsaná BdCDPK kódovaná genem Bdiv_030560.

Z další větve (bootstrap 100%) se nejprve oddělují proteinové sekvence organismů příbuzných Apicomplexa – *C. velia* a *V. brassicaformis*. Sesterská linie se rozděluje na dvě větve. První větev (bootstrap 100%) zahrnuje TgCDPK3 (TGME49_305860, *T. gondii*) a analogické enzymy CDPK3 kokcií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*. Dále sem klastrují CDPK1 pěti druhů plasmodií včetně již charakterizovaných PfCDPK1 (PF3D7_0217500, *P. falciparum*) a PbCDPK1 (PBANKA_0314200, *P. berghei*), které leží na společné větvi. Jako sesterská k větvi genů rodu *Plasmodium* se jeví větev (bootstrap 79%) s predikovanými CDPKs BMR1_04g08970 (*B. microti*) a TA16570 (*T. anulata*), které dosud nebyly charakterizovány. Izoenzymy ostatních modelových zástupců Piroplasmida včetně zkoumaných BdCDPKs, které by klastrovaly do této skupiny, nebyly identifikovány.

BdCDPK4 kódovaná genem Bdiv_024410 klastruje do skupiny CDPK4 (bootstrap 100%) (viz Obrázek 9, světle zelený obdélník), která je rozdělena na dvě větve. První větev tvoří sekvence predikovaných CDPKs skupiny Piroplasmida (rody *Cytauxzoon*, *Theileria* a *Babesia*), kam klastruje BdCDPK4 kódovaná genem Bdiv_024410, která je jako jediná ze zkoumaných BdCDPKs anotována a pojmenována. V rámci druhé větve se nejprve oddělují sekvence genů pro CDPK1 rodu *Cryptosporidium*. Dále se oddělují dvě sesterské linie – CDPK1 u kokcií a CDPK4 u rodu *Plasmodium* (odlišné číslování je dáno z historických důvodů). V první z nich se nejprve oddělují sekvence CDPK1 *H. hammondi* a TgCDPK1 (TGME49_301440, *T. gondii*) a k nim tvoří sesterskou linii CDPK1 *E. tenella* a CDPK1 *C. cayetanensis*. CDPK4 u pěti druhů rodu *Plasmodium*, včetně PfCDPK4 (PF3D7_0717500, *P. falciparum*) a PbCDPK4 (PBANKA_0615200, *P. berghei*), náleží do samostatné linie a vykazují velkou podobnost.

Do další skupiny (bootstrap 64%) klastruje BdCDPK kódovaná genem Bdiv_014540c (viz Obrázek 9, žlutý obdélník). Z této skupiny se jako první odděluje sekvence *C. velia*. K ní

sesterská linie (bootstrap 100%) se rozděluje na dvě větve, ani jedna však nezahrnuje CDPKs rodu *Plasmodium*. V první větvi (bootstrap 100%) se nacházejí TgCDPK4A (TGME49_295760, *T. gondii*) a CDPK4A příbuzných kokcií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*. Druhá větev (viz Obrázek 9, žlutý obdélník, bootstrap 100%) se dělí na dvě linie, kde první z nich obsahuje TgCDPK4 (TGME49_237890, *T. gondii*) a CDPK4 kokcií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*. Druhá linie zahrnuje zatím pouze predikované CDPKs řádu Piroplasmida, reprezentovanými rody *Cytauxzoon*, *Theileria* a *Babesia*, kde se nachází i dosud nepopsaná BdCDPK kódovaná genem Bdiv_014540c.

Gen Bdiv_035940c spadá do poměrně odvozené skupiny genů CDPK5 (viz Obrázek 9, oranžový obdélník, bootstrap 98%). Ještě před ustanovením skupiny CDPK5 se oddělují CDPKs organismů *C. velia* a *V. brassicaformis*. Skupina CDPK5 se větví na dvě hlavní linie. V první z nich se nacházejí CDPK5 rodu *Cryptosporium* (cgd2_1300, *C. parvum* a GY17_00003491, *C. hominis*) a k nim sesterská skupina genů kokcií, kam klastrují TgCDPK5 (TGME49_224950, *T. gondii*) a CDPK5 *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*. Druhá linie pak obsahuje samostatnou skupinu CDPK5 u pěti druhů rodu *Plasmodium* včetně velmi dobře prozkoumaných enzymů PfCDPK5 (PF3D7_1337800, *P. falciparum*) a PbCDPK5 (PBANKA_1351500, *P. berghei*). Sesterská linie ke skupině CDPK5 rodu *Plasmodium* zahrnuje zatím pouze predikované CDPKs skupiny Piroplasmida, reprezentovanými rody *Cytauxzoon*, *Theileria* a *Babesia*, kde se nachází i dosud nepopsaná BdCDPK kódovaná genem Bdiv_035940c. Do následujících linií už neklastruje žádná ze zkoumaných BdCDPKs.

Další poměrně odvozená linie (bootstrap 53%) se dělí na dvě větve. První z nich (bootstrap 56%) zahrnuje část skupiny CDPK2 včetně enzymů CDPK2A a CDPK2B. Na bázi této skupiny se nacházejí putativní sekvence CDPKs rodu *Cryptosporium*. Odvozenější část zahrnuje TgCDPK2B (TGME49_242400, *T. gondii*) a CDPK2B kokcií *H. hammondi* a *C. cayetanensis*, a také se zde objevují sekvence predikovaných CDPKs organismů příbuzných skupině Apicomplexa *C. velia* a *V. brassicaformis*. V druhé části (bootstrap 84%) se na bázi vyskytuje PfCDPK2 (PF3D7_0610600, *P. falciparum*), odvozenější jsou pak sekvence *V. brassicaformis* následované skupinou CDPK2A kokcií zahrnující TgCDPK2A (TGME49_206590, *T. gondii*) a enzymy CDPK2A *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*.

V druhé větvi (bootstrap 58%) se nachází samostatná linie (bootstrap 100%) CDPK3 pěti druhů rodu *Plasmodium* včetně již charakterizovaných PfCDPK3 (PF3D7_0310100, *P. falciparum*) a PbCDPK3 (PBANKA_0408200, *P. berghei*). Sesterská linie k CDPK3 u rodu

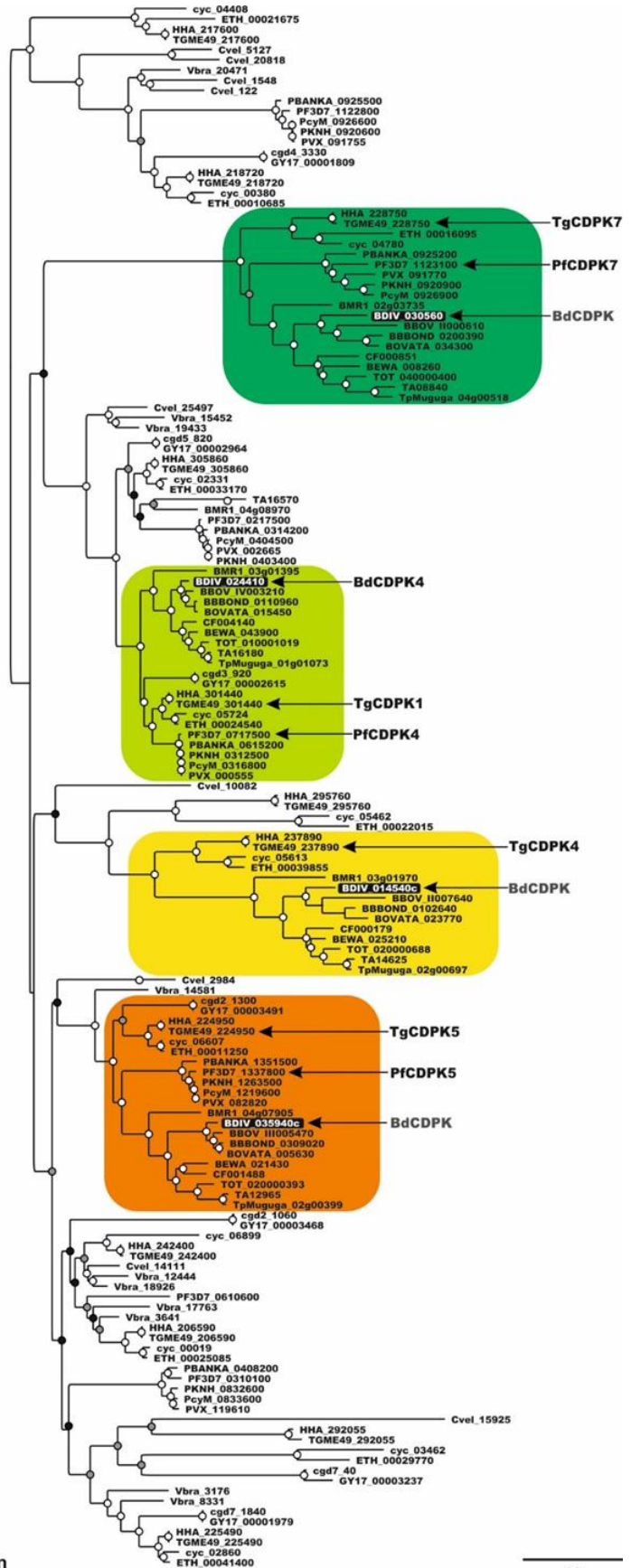
Plasmodium (bootstrap 74%) se větví na dvě části. První část tvoří skupina CDPK8, která zahrnuje TgCDPK8 (TGME49_292055, *T. gondii*) a CDPK8 enzymy kokcidií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis*, a putativní CDPKs rodu *Cryptosporidium* a *C. velia*. V druhé části se pak nachází enzymy CDPK2 kokcidií *H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis* včetně TgCDPK2 (TGME49_225490, *T. gondii*), a predikované CDPKs organismů *C. velia* a *V. brassicaformis*.

V celém fylogenetickém stromu platí, že k sekvencím genů *T. gondii* jsou fylogeneticky nejpříbuznější geny *H. hammondi*. Geny *C. cayetanensis* mají nejbliže ke genům *E. tenella*. Geny zástupců rodu *Cryptosporidium* (*C. parvum* a *C. hominis*) spolu také vždy blízce klastrují. Sekvence z organismů rodu *Plasmodium* klastrují pokaždé do společné linie (bootstrap vždy 100 %). Stejně je tomu tak u zástupců řádu Piroplasmida (rody *Cytauxzoon*, *Theileria* a *Babesia*) (bootstrap vždy 100 %).

BDIV - Babesia divergens

BBBOND - *Babesia bigemina* strain BOND
 BBOV - *Babesia bovis*
 BOVATA - *Babesia ovata*
 BMR1 - *Babesia microti* strain R1
 CF - *Cytauxzoon felis* strain Winnie
 TA - *Theileria anulata*
 BEWA - *Theileria equi*
 TOT - *Theileria orientalis* strain Shintoku
 TpMuguga - *Theileria parva*

Cvel - *Chromera velia*
 Vbra - *Vitrella brassicaformis*
 Gy17 - *Cryptosporidium hominis* isolate 30976
 cgd - *Cryptosporidium parvum* strain Iowa II
 cyc - *Cyclospora cayentanensis* strain CHN_HEN01
 ETH - *Eimeria tenella* strain Houghton
 HHA - *Hammondia hammondi*
 TGME49 - *Toxoplasma gondii* Me49
 PF3D7 - *Plasmodium falciparum* 3D7
 PBANKA - *Plasmodium berghei* ANKA
 PcyM - *Plasmodium cynomolgi* strain M
 PKNH - *Plasmodium knowlesi* strain H
 PVX - *Plasmodium vivax* Sal-1



Obrázek 9: Fylogenetická analýza klastrování BdCDPKs. Kinázy kódované geny Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560 a Bdiv_035940c klastrují s izoenzymy vybraných modelových druhů skupiny Apicomplexa do tzv. funkčních skupin (barevné značení). V šedém rámečku jsou vysvětleny zkratky druhů organismů. Seznam sekvencí genů použitých pro fylogenetickou analýzu je uveden v příloze č. 5.

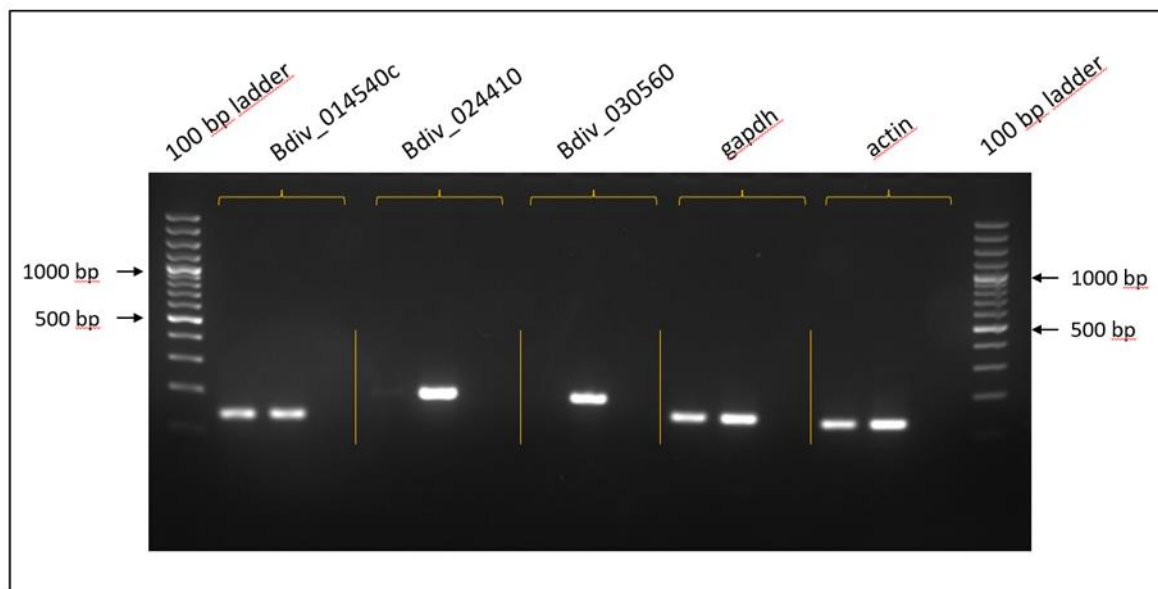
4.5 Analýza exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs: design experimentu

Byl připraven plán experimentu analyzující dynamiku exprese individuálních BdCDPKs v *in vitro* kultuře *B. divergens*. K tomuto účelu byla zvolena metoda kvantitativní PCR (qPCR). Pro qPCR byly navrženy specifické primery pro tři kinázy, jejichž exprese byla potvrzena v intra-erytrocytárních stádiích *B. divergens* (viz kapitola 4.2) (Bdiv_014540c, Bdiv_024410 a Bdiv_030560) a pro dva housekeeping geny (*gapdh* a *actin*), které již byly dříve ověřeny (Jalovecka et al., 2016) (viz Tabulka VI). qPCR primery byly navrženy v programu SnapGene® Viewer 5.2.4. s využitím mnou osekvenovaných gDNA a cDNA sekvencí BdCDPKs (viz kapitoly 4.1 a 4.2). qPCR primery byly u genů s intronem (Bdiv_024410 a Bdiv_030560) designovány na cDNA tak, aby vedly přes úsek, kde by se v gDNA vyskytoval intron. Tímto způsobem se eliminuje případná kontaminace vzorků gDNA. U třetího genu (Bdiv_014540c) toto bohužel nebylo možné kvůli absenci intronu v sekvenci.

Tabulka VI: Návrh qPCR primerů pro analýzu exprese BdCDPKs

Název genu	Označení primeru	Sekvence	T _m
Bdiv_014540c	MJ_28_bdiv_014540c_qPCR_F	AGGTTCTCGGAGTGCCCTAT	60 °C
Bdiv_014540c	MJ_29_bdiv_014540c_qPCR_R	TGAACCACATACCCCGAAGC	
Bdiv_024410	MJ_30_bdiv_024410_qPCR_F	CAAGATCGGAACCGCCTACTACAT	
Bdiv_024410	MJ_31_bdiv_024410_qPCR_R	GCCATTGAGGCATATCGAAGGAG	
Bdiv_030560	MJ_38_bdiv_030560_qPCR_F_B	GACGTCGACGATTCCAACAGT	
Bdiv_030560	MJ_33_bdiv_030560_qPCR_R	CAACGCCATCCTGGGGAAATTAG	
gapdh	MJ_34_gapdh_qPCR_F	TACTTACGAGCAGATCGTTGC	
gapdh	MJ_35_gapdh_qPCR_R	CGGCCTTGACATCGAAAATG	
actin	MJ_36_actin_qPCR_F	GTCAGCGTATGACGAAGGAG	
actin	MJ_37_actin_qPCR_R	CTGGAAGGTGGAAAGGGATG	

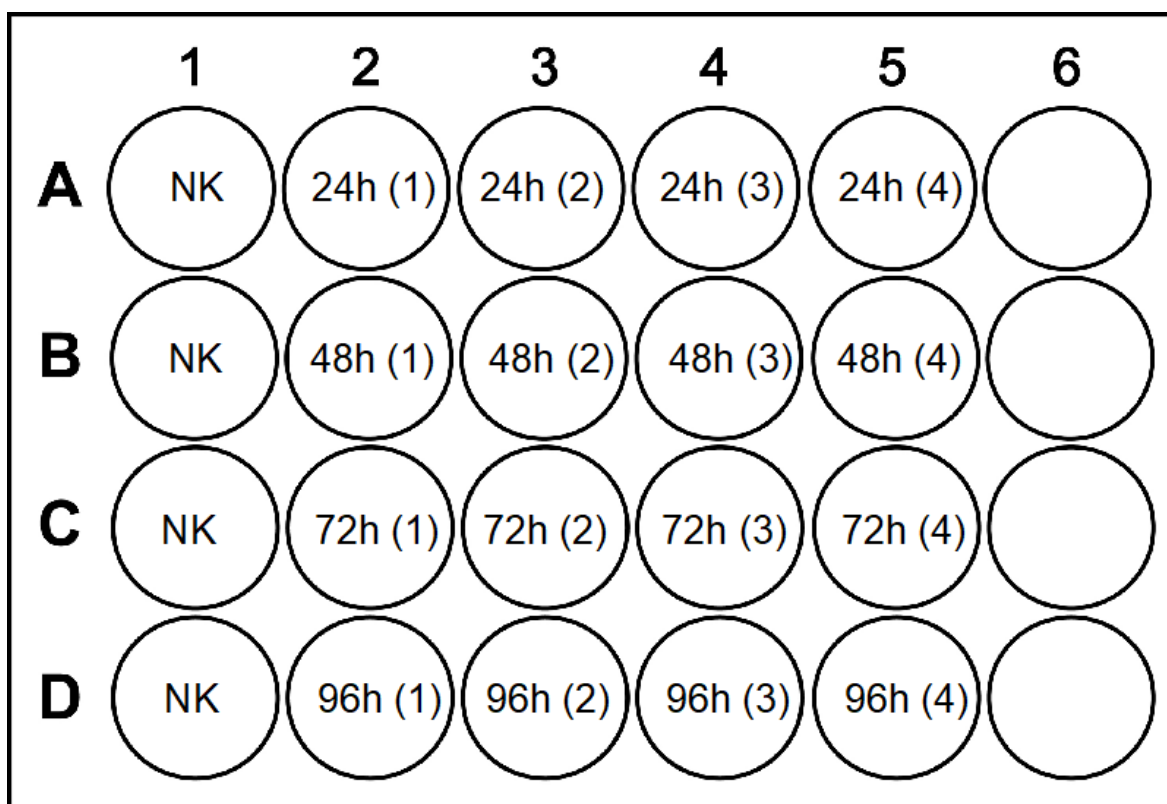
Navržené primery pro qPCR (viz Tabulka VI) jsem úspěšně ověřila pomocí PCR, výsledek je zobrazen na Obrázku 10. U genů Bdiv_024410 a Bdiv_030560 nedošlo k amplifikaci z gDNA, protože jejich primery byly navrženy specificky na cDNA v místě intronu. Tento výsledek také potvrzuje, že vzorek cDNA není kontaminován gDNA. U genů Bdiv_014540c, *gapdh* a *actin* žádný intron není, a proto se amplifikovaly i z gDNA.



Obrázek 10: Kontrola navržených qPCR primerů. Zleva: CDPKs Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560 a housekeeping geny *gapdh* a *actin*. Od každého genu byly použity tři vzorky v pořadí gDNA – cDNA – NK (negativní kontrola bez templátu). $T_m = 60^\circ\text{C}$. Byl použit 100 bp ladder (Thermo scientific).

Následující část experimentu byla detailně naplánována, ale bohužel se ji kvůli výskytu kontaminací v kultuře nepodařilo uskutečnit v rámci této práce. Proto zde uvádím pouze navrhovaný postup: Nejprve bude potřeba namnožit *B. divergens in vitro* do kultivační lahve 75 cm² (viz kapitola 3.1.1). Po určení parazitémie (viz kapitola 3.1.2) budou infikované erythrocyty naředěny neinfikovanou krví na počáteční parazitémii experimentu 0,5 %. Experiment bude probíhat dle schématu uvedeného na Obrázku 11. Celkem bude připraveno 16 experimentálních jamek a čtyři jamky budou sloužit jako negativní kontrola (NK). Každá jamka bude obsahovat 50 μl infikovaných či neinfikovaných (NK) bovinních erythrocytů a 2 ml

kultivačního média (viz Tabulka I), kultivace bude probíhat za standardních podmínek (viz kapitola 3.1.1).



Obrázek 11: Analýza exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs: návrh experimentálního postupu. Experiment bude probíhat v 24-jamkové destičce. Vzorky budou odebírány vždy po 24 h, celková doba trvání experimentu bude 120 h od založení experimentu. Každý interval bude analyzován vždy ve čtyřech opakováních a pro každý interval bude provedena analýza negativní kontroly (NK).

Každých 24 hodin bude ve čtyřech experimentálních jamkách a jedné negativní kontrole spočtena parazitémie (viz kapitola 3.1.2). Obsah jamek bude poté centrifugován ($2000 \times g$, 5 minut), a k peletu bude přidáno 800 ml Trisolu (Sigma-Aldrich). Vzorky budou propipetovány, inkubovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě a následně zamraženy do $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento postup zamražení do Trisolu (Sigma-Aldrich) opakovat vždy po 48, 72 a 96 hodinách od začátku experimentu.

Ze zamražených vzorků bude vyizolována RNA (viz kapitola 3.3.1). Bude následovat DNase treatment (viz kapitola 3.3.2) a reverzní transkripce (viz kapitola 3.3.3). Výsledná cDNA bude uskladněna při -20°C a pak bude použita jako templát pro qPCR. qPCR reakce bude připravena s využitím komerčního mastermixu LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) dle návodu výrobce, a získaná data budou podrobena analýze relativní exprese komparativní „delta-delta Ct“ ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) metodou, tedy bude stanovena exprese jednotlivých *cdpk* genů na základě exprese houskeeping genů (*actin* a *gapdh*).

5 Diskuze

Tato práce se věnuje pilotní analýze predikovaných BdCDPKs. CDPKs jsou unikátní enzymy vyskytující se u skupin Apicomplexa a Archaeplastida (Govindasamy & Bhanot, 2020; Harmon et al., 2001). Tyto kinázy se účastní vápníkové buněčné signalizace a u parazitů skupiny Apicomplexa hrají CDPKs klíčovou roli při pohybu a jsou nezbytné pro dokončení životního cyklu (Billker et al., 2009; Keyloun et al., 2014; Mitcheson et al., 2015; Sharma et al., 2021). Protože se CDPKs nevyskytují v buňkách hostitelů Apicomplexa, mohly by sloužit jako potenciální cíl specifické terapie (Hussein et al., 2021; Keyloun et al., 2014; Sharma et al., 2021; Wernimont et al., 2011).

In silico výzkumem genomických a transkriptomických dat *B. divergens* (González et al., 2019) byly identifikovány čtyři geny – Bdiv_014540c, Bdiv_024410, Bdiv_030560 a Bdiv_035940c (viz Obrázek 5) – které dle predikce kódují BdCDPKs. Sekvenací jsem ověřila sekvence gDNA a cDNA těchto genů a analyzovala rozdíly oproti *in silico* predikci v online databázi Piroplasmadb.org. Detailní osekvenování kódujících sekvencí BdCDPKs bylo zásadní především u genu Bdiv_030560, jehož kódující sekvence se významně lišila (je o 11 aminokyselin delší) od predikované (viz Obrázek 7), a tato informace je nezbytná pro další výzkum funkce tohoto enzymu. Kódující sekvence tří BdCDPKs specifických pro náš modelový kmen *B. divergens* 2210A G2 byla v rámci této práce navíc vložena do standardního pGEM®-T Easy vektoru (viz Obrázek 6), a tyto zaklonované cDNA budou v laboratoři RNDr. Marie Jalovecké, Ph.D. a RNDr. Daniela Sojky, Ph.D. sloužit jako základ pro další výzkum – dané kódující sekvence již byly například využity pro přípravu rekombinantních proteinů.

Mnou ověřené kódující sekvence tří putativních BdCDPKs byly poté podrobeny analýze predikce proteinových domén (viz kapitola 3.4). Protože nebylo možné získat kódující sekvenci genu Bdiv_035940c z krevních stádií parazita (viz kapitola 4.2), byla proteinová sekvence tohoto genu stažena z Piroplasmadb.org. Tato analýza (viz Obrázek 8) ukázala, že tyto dosud hypotetické BdCDPKs mají strukturu typickou pro rodinu těchto enzymů. Každý predikovaný protein obsahuje jednu Ser-Thr doménu (serine/threonine doména), která dokáže inhibovat CDPK po celé její délce (Azevedo et al., 2013), a minimálně jednu EF-hand doménu, která na sebe přímo váže Ca^{2+} (Govindasamy & Bhanot, 2020; Harmon et al., 2001; Shi et al., 2018). Na základě zjištěné struktury predikovaných BdCDPKs a polohy klíčových domén těchto enzymů byla poté provedena fylogenetická analýza. Pro ni bylo využito 153 sekvencí

z 22 organismů zahrnující parazity ze skupiny Apicomplexa a jejich blízké příbuzné volně žijící organismy *C. velia* a *V. brassicaformis* (viz příloha č. 5). Výsledný fylogenetický strom (viz Obrázek 9) ukázal, že všechny čtyři predikované BdCDPKs kladují do skupin s již popsányi CDPKs modelových organismů ze skupiny Apicomplexa.

BdCDPK kódovaná genem Bdiv_030560 spadá do skupiny CDPK7 (viz Obrázek 9, tmavě zelená), kde se nachází TgCDPK7 (TGME49_228750, *T. gondii*) a CDPK7 u rodu *Plasmodium* (PBANKA_0925200, *P. berghei*; PcyM_0926900, *P. cynomolgi*; PF3D7_1123100, *P. falciparum*; PKNH_0920900, *P. knowlesi*; PVX_091770, *P. vivax*). Pro enzymy skupiny CDPK7 je charakteristické neobvyklé umístění EF-hand domén v blízkosti N-konce (Billker et al., 2009; Kumar et al., 2014). Role takto umístěných EF-hands v regulaci kinázové aktivity dosud nebyla zkoumána (Billker et al., 2009). Dále směrem k C-konci se nachází PH doména (plekstrin homologní doména) (Billker et al., 2009; Kumar et al., 2014), která se u jiných skupin CDPKs nevyskytuje (Morlon-Guyot et al., 2014). Bylo zjištěno, že PH doména interaguje s fosfoinositidy (Kutateladze, 2010), což naznačuje, že skupina CDPK7 by se mohla účastnit také vnitrobuněčného transportu látek (Morlon-Guyot et al., 2014). Za PH doménou je Ser-Thr doména (Billker et al., 2009; Hui et al., 2015; Kumar et al., 2014). Skupina CDPK7 se jako jediná přímo účastní nepohlavního rozmnožování parazita. TgCDPK7 je důležitá během časných fází dělení, protože má na starost rozdělení a správné umístění centrosomu (Morlon-Guyot et al., 2014). Pokud byl u parazita proveden tzv. knock-out TgCDPK7, došlo k značným poruchám při dělení, k asynchronnímu vývoji a k narušení rozdělení centrosomu (Morlon-Guyot et al., 2014). PfCDPK7 a PbCDPK7 jsou esenciální pro nepohlavní rozmnožování parazita v krevních stádiích (Kumar et al., 2014; Sharma et al., 2021). Narušení PfCDPK7 způsobilo výraznou redukci v růstu krevních stádií, protože došlo k zastavení přeměny ze stádia „prstýnku“ (ring stage) do stádia trofozoitu (Kumar et al., 2014). Navíc byla markantně utlumena schizogonie parazita (Kumar et al., 2014). Parazitě, kteří měli knock-out genu PfCDPK7 nebyli schopni dokončit sporogonii ve svém komářím hostiteli (Dorin-Semblat et al., 2008). Geny ostatních Apicomplexa, které klastrovaly do skupiny CDPK7 (*H. hammondi*, *E. tenella*, *C. cayetanensis* a rody *Babesia*, *Cytauxzoon* a *Theileria*) (viz Obrázek 9) dosud nebyly charakterizovány, a jejich funkce tedy není známa.

BdCDPK4 kódovaná genem Bdiv_024410 dle fylogenetické analýzy (viz Obrázek 9, světle zelená) kladuje do skupiny CDPK4, která obsahuje již charakterizované enzymy TgCDPK1 (TgME49_301440), CpCDPK1 (cgd3_920, *C. parvum*) a CDPK4 u rodu *Plasmodium* (PBANKA_0615200, PcyM_0316800, PF3D7_0717500, PKNH_0312500

a PVX_000555) (Billker et al., 2009; Hui et al., 2015). Skupina CDPK4 se vyznačuje relativně krátkou N-terminální doménou a čtyřmi EF-hand doménami (viz Obrázek 9) (Billker et al., 2009). Dle dosud známých poznatků mohou mít CDPKs v této skupině různé funkce. TgCDPK1 je zásadní pro přežití parazita, protože se účastní pohybu, invaze do hostitelské buňky a následné egress (Lourido et al., 2010). Homologem k TgCDPK1 je CpCDPK1, které spolu sdílí 70 % sekvence protein kinázové katalytické domény (Murphy et al., 2010). Jakou roli hraje CpCDPK1 nebylo doposud objasněno (Murphy et al., 2010), ale pravděpodobně se týká stejných fází životního cyklu jako TgCDPK1 (Zhang et al., 2014). PfCDPK4 je postradatelná při nepohlavním rozmnožování krevních stádií parazita (Sharma et al., 2021). PfCDPK4 a PbCDPK4 mají také na starost exflagelaci samčích gametocytů (odhození bičíku) (Kato et al., 2009; Vidadala et al., 2014), což z nich dělá esenciální geny pro pohlavní rozmnožování v hlavním hostiteli (Billker et al., 2004; Vidadala et al., 2014) a celkově pro schopnost parazita infikovat komářského hostitele (Vidadala et al., 2014). V rámci babesii je CDPK4 jediným částečně funkčně charakterizovaným enzymem: CDPK4 druhu *B. bovis* byla prokázána jako zásadní pro vývoj sexuálních stádií a kinet (Hussein et al., 2021). Toto zjištění naznačuje, že CDPK4 má pravděpodobně funkční analogii s CDPK4 rodu *Plasmodium*. Geny ostatních organismů klastrující do této skupiny (*H. hammondi*, *E. tenella* a *C. cayetanensis* a rody *Cytauxzoon* a *Theileria*) nebyly dosud příliš zkoumány a jejich funkce zůstává neznámá.

BdCDPK kódovaná genem Bdiv_014540c (viz Obrázek 9, žlutá) klastruje s geny TgCDPK4 (TGME49_237890) a TgCDPK4A (TGME49_295760), ale neklastrují sem žádné ortology genů u rodu *Plasmodium*, a proto nemá tato skupina CDPKs jasné číselné označení. Strukturně se tyto proteiny vyznačují delší N-terminální doménou a různým počtem EF-hand domén ležících u C-konce (Hui et al., 2015). Funkce TgCDPK4 nebyly dosud určeny, ale bylo zjištěno, že TgCDPK4 a TgCDPK4A nejsou důležité pro růst parazita (Wang et al., 2016). Dostupná data naznačují, že TgCDPK4A se nejspíše účastní invaze do hostitelské buňky, egress a pohybu (Wang et al., 2015). TgCDPK4 pak pravděpodobně hraje roli v metabolismu a replikaci DNA (Wang et al., 2015). Dále byla objevena skutečnost, že TgCDPK4 a TgCDPK4A jsou během vývoje parazita různě regulovány a jejich exprese se cyklicky mění (Long et al., 2016). Geny dalších organismů klastrující do této skupiny (*H. hammondi*, *E. tenella*, *C. cayetanensis* a rody *Babesia*, *Cytauxzoon* a *Theileria*) dosud nebyly charakterizovány a jejich funkce tedy není známa.

BdCDPK kódovaná genem Bdiv_035940c patří do skupiny CDPK5 (viz Obrázek 9, oranžová), kde se nacházejí TgCDPK5 (TGME49_224950) a CDPK5 u rodu *Plasmodium*

(PBANKA_1351500, PcyM_1219600, PF3D7_1337800, PKNH_1263500 a PVX_082820). Tyto proteiny mají rozsáhlejší N-terminální doménu a různý počet EF-hand domén u C-konce (Billker et al., 2009). TgCDPK5 je poměrně málo prozkoumána, ale bylo zjištěno, že se neúčastní růstu při lytickém cyklu parazita (Wang et al., 2016), ale může být zapojena do invaze do hostitelské buňky, egress a obecně pohybu parazita (Wang et al., 2015). Bylo zjištěno, že PfCDPK5, která je exprimována ve stádiu merozoitů, je zásadní při proliferaci parazita a egress z erytrocytu (Dvorin et al., 2010). Paraziti bez PfCDPK5 zastavili svůj vývoj ve stádiu schizontů (Dvorin et al., 2010). Merozoity, které byly mechanicky uvolněny z takto pozastavených schizontů, byly schopny invadovat nové erytrocyty, čímž se oddělují dráhy egress a invaze (Dvorin et al., 2010). PfCDPK5 a PbCDPK5 jsou esenciální pro nepohlavní rozmnožování krevních stádií parazita (Sharma et al., 2021). PbCDPK5 je navíc pravděpodobně potřeba pro opuštění hepatocytů a tedy pro iniciaci části životního cyklu, která probíhá v erytrocytu (Govindasamy & Bhanot, 2020). Právě kódující sekvenci kinázy (Bdiv_035940c), klastrující s těmito geny, se nepodařilo naamplifikovat z cDNA získané z krevních stádií parazita, což může naznačovat, že je tato kináza specifická pouze pro klíštěcí stádia parazita. Tuto hypotézu je však třeba ještě ověřit. Geny ostatních Apicomplexa, které klastrovaly do skupiny CDPK5 (*H. hammondi*, *E. tenella*, *C. cayetanensis* a rody *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Cytauxzoon* a *Theileria*) (viz Obrázek 9) dosud nebyly charakterizovány, a jejich funkce tedy nebyla zjištěna.

Na základě klastrování BdCDPKs lze předběžně odhadnout funkci těchto enzymů v rámci základních biologických procesů babesii. Tato predikce však nemusí být spolehlivá, protože ortology CDPKs se v rámci jedné skupiny mohou funkčně lišit. Toto bylo prokázáno např. u skupiny CDPK4, kam klastrují funkčně odlišné enzymy TgCDPK1 a PfCDPK4 (Hui et al., 2015; Lourido et al., 2010). TgCDPK1 se účastní pohybu, invaze do hostitelské buňky a následné egress (Lourido et al., 2010), zatímco PfCDPK4 je klíčová pro pohlavní rozmnožování v hlavním hostiteli (Billker et al., 2004; Vidadala et al., 2014), protože má na starost exflagelaci samčích gametocytů (odhození bičíku) (Kato et al., 2009; Vidadala et al., 2014). Tyto odlišnosti souvisí s rozdíly v parazitární strategii a životními cykly těchto organismů.

Babesie mají v rámci Apicomplexa unikátní vývojový cyklus (viz kapitoly 1 a 1.2.2). Odlišují mimo jiné také tím, že nevytváří parazitoforní vakuolu. Babesie sice parazitují v erytrocytech jako *Plasmodium*, ale merogonie probíhá jiným způsobem. V klíšťatech pak babesie tvoří kinety, které jim umožňují provádět transstadiální a transovariální přenos. Lze

tedy předpokládat, že navzdory klastrování budou námi zkoumané BdCDPKs reflektovat tyto biologické rozdíly ve své funkci. Přesto však klastrování BdCDPKs s lépe prozkoumanými enzymy modelových organismů *Toxoplasma* a *Plasmodium* poskytuje inspiraci pro metodické přístupy ve studiu těchto kináz. Právě popis základních funkcí BdCDPKs a jejich asociace s vývojovými strategiemi babesíí je předmětem výzkumu RNDr. Marie Jalovecké, Ph.D. a RNDr. Daniela Sojky, Ph.D. v právě běžícím projektu „Functional Analysis of *Babesia* Calcium-Dependent Protein Kinases“ (GAČR 21-11299S), pro který tato bakalářská práce poskytla základní informace o sekvenci, struktuře a klastrování jednotlivých BdCDPKs. Dalším dílčím cílem tohoto projektu je analýza dynamiky exprese jednotlivých kináz v rámci intra-erytrocytárního cyklu *B. divergens*, pro který jsem navrhla plán experimentu. Záměrem je odhalit změny v expresi jednotlivých BdCDPKs a jejich vzájemné poměry během rostoucí parazitémie pomocí qPCR (viz kapitola 4.5). Tato analýza v rámci této bakalářské práce neproběhla kvůli problémům s kontaminací v *in vitro* kultuře *B. divergens*, ale v brzkém čase bude uskutečněna v laboratoři RNDr. Marie Jalovecké, Ph.D. a RNDr. Daniela Sojky, Ph.D. za použití mnou navržených a ověřených primerů (viz Obrázek 10).

6 Závěr

- Provedla jsem stručnou literární rešerši na téma významu vápníkové signalizace a současných poznatků o struktuře a funkci CDPKs.
- Osekvenovala jsem gDNA putativních BdCDPKs, a provedla jsem analýzu těchto sekvencí porovnáním s *in silico* predikovanými sekvencemi z databáze Piropiasmdb.org.
- Připravila jsem cDNA z krevních stádií *B. divergens*, a zaklonovala a osekvenovala jsem kódující sekvence putativních BdCDPKs.
- Zanalyzovala jsem strukturu jednotlivých BdCDPKs pomocí predikce proteinových domén.
- Provedla jsem fylogenetickou analýzu klastrování BdCDPKs s izoenzymy vybraných modelových druhů ze skupiny Apicomplexa a jim příbuzných organismů *C. velia* a *V. brassicaformis*.
- Navrhla jsem design experimentu pro dynamickou analýzu exprese intra-erytrocytárních BdCDPKs pomocí kvantitativní PCR.

7 Literatura

- Allen, K. E., Thomas, J. E., Wohltjen, M. L., & Reichard, M. v. (2019). Transmission of *Cytauxzoon felis* to domestic cats by *Amblyomma americanum* nymphs. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3276-8>
- Azevedo, M. F., Sanders, P. R., Krejany, E., Nie, C. Q., Fu, P., Bach, L. A., Wunderlich, G., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2013). Inhibition of *Plasmodium falciparum* CDPK1 by conditional expression of its J-domain demonstrates a key role in schizont development. *Biochemical Journal*, *452*(3), 433–441. <https://doi.org/10.1042/BJ20130124>
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., & Brinkmann, V. (2004). Calcium and a Calcium-Dependent Protein Kinase Regulate Gamete Formation and Mosquito Transmission in a Malaria Parasite. *Cell*, *117*(4), 503–514. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00449-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00449-0)
- Billker, O., Lourido, S., & Sibley, L. D. (2009). Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. *Cell Host & Microbe*, *5*(6), 612–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.017>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, *129*(S1), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Boudsocq, M., & Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. In *Trends in Plant Science* (Vol. 18, Issue 1, pp. 30–40). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.008>
- Cesbron-Delauw, M.-F., Gendrin, C., Travier, L., Ruffiot, P., & Mercier, C. (2008). Apicomplexa in Mammalian Cells: Trafficking to the Parasitophorous Vacuole. *Traffic*, *9*(5), 657–664. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00728.x>
- Chakraborty, S., Roy, S., Mistry, H. U., Murthy, S., George, N., Bhandari, V., & Sharma, P. (2017). Potential Sabotage of Host Cell Physiology by Apicomplexan Parasites for Their Survival Benefits. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01261>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Cursino-Santos, J. R., Singh, M., Senaldi, E., Manwani, D., Yazdanbakhsh, K., & Lobo, C. A. (2019). Altered parasite life-cycle processes characterize *Babesia divergens* infection in

- human sickle cell anemia. *Haematologica*, 104(11), 2189–2199.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214304>
- Dorin-Semblat, D., Sicard, A., Doerig, C., Ranford-Cartwright, L., & Doerig, C. (2008). Disruption of the Pf PK7 Gene Impairs Schizogony and Sporogony in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 279–285.
<https://doi.org/10.1128/EC.00245-07>
- Duszynski, D. W. (2021). Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. *Folia Parasitologica*, 68. <https://doi.org/10.14411/fp.2021.001>
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., & Duraisingh, M. T. (2010). A Plant-Like Kinase in *Plasmodium falciparum* Regulates Parasite Egress from Erythrocytes. *Science*, 328(5980), 910–912.
<https://doi.org/10.1126/science.1188191>
- Fedrizzi, L., Lim, D., & Carafoli, E. (2008). Calcium and signal transduction. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(3), 175–180. <https://doi.org/10.1002/bmb.20187>
- González, L. M., Estrada, K., Grande, R., Jiménez-Jacinto, V., Vega-Alvarado, L., Sevilla, E., Barrera, J. de la, Cuesta, I., Zaballos, Á., Bautista, J. M., Lobo, C. A., Sánchez-Flores, A., & Montero, E. (2019). Comparative and functional genomics of the protozoan parasite *Babesia divergens* highlighting the invasion and egress processes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(8), e0007680. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007680>
- Govindasamy, K., & Bhanot, P. (2020). Overlapping and distinct roles of CDPK family members in the pre-erythrocytic stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLOS Pathogens*, 16(8), e1008131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008131>
- Guse, A. H. (1998). Ca²⁺ Signaling in T-Lymphocytes. *Critical ReviewsTM in Immunology*, 18(5), 419–448. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v18.i5.20>
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>

- Haklová-Kočíková, B., Hižňanová, A., Majláth, I., Račka, K., Harris, D. J., Földvári, G., Tryjanowski, P., Kokošová, N., Malčeková, B., & Majláthová, V. (2014). Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* – a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & Vectors*, 7(1), 555. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0555-x>
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. <http://plantsp.sdsc.edu>
- Harmon, A. C., Gribskov, M., & Harper, J. F. (2000). CDPKs – a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends in Plant Science*, 5(4), 154–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01577-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01577-6)
- Heussler, V. T., & Stanway, R. R. (2008). Cellular and molecular interactions between the apicomplexan parasites *Plasmodium* and *Theileria* and their host cells. *Parasite*, 15(3), 211–218. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153211>
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.-J., & Straube, E. (2007). First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(8), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0333-1>
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Hrabak, E. M. (2000). Calcium-dependent protein kinases and their relatives (pp. 185–223). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)32025-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)32025-0)
- Hui, R., el Bakkouri, M., & Sibley, L. D. (2015). Designing selective inhibitors for calcium-dependent protein kinases in apicomplexans. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.011>
- Hunfeld, K., Hildebrandt, A., & Gray, J. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219–1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Hussein, H. E., Johnson, W. C., Taus, N. S., Capelli-Peixoto, J., Suarez, C. E., Mousel, M. R., & Ueti, M. W. (2021). Differential expression of calcium-dependent protein kinase 4, tubulin tyrosine ligase, and methyltransferase by xanthurenic acid-induced *Babesia bovis*

- sexual stages. *Parasites & Vectors*, 14(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04902-3>
- Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasites & Vectors*, 9(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1731-y>
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 5, pp. 356–368). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kato, K., Sudo, A., Kobayashi, K., Sugi, T., Tohya, Y., & Akashi, H. (2009). Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. *Parasitology International*, 58(4), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.08.001>
- Keyloun, K. R., Reid, M. C., Choi, R., Song, Y., Fox, A. M. W., Hillesland, H. K., Zhang, Z., Vidadala, R., Merritt, E. A., Lau, A. O. T., Maly, D. J., Fan, E., Barrett, L. K., van Voorhis, W. C., & Ojo, K. K. (2014). The gatekeeper residue and beyond: homologous calcium-dependent protein kinases as drug development targets for veterinarian Apicomplexa parasites. *Parasitology*, 141(11), 1499–1509. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000857>
- Kumar, P., Tripathi, A., Ranjan, R., Halbert, J., Gilberger, T., Doerig, C., & Sharma, P. (2014). Regulation of *Plasmodium falciparum* Development by Calcium-dependent Protein Kinase 7 (PfCDPK7). *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20386–20395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561670>
- Kuo, C.-H., Wares, J. P., & Kissinger, J. C. (2008). The Apicomplexan Whole-Genome Phylogeny: An Analysis of Incongruence among Gene Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 25(12), 2689–2698. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn213>

- Kutateladze, T. G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nature Chemical Biology*, 6(7), 507–513. <https://doi.org/10.1038/nchembio.390>
- Lobo, C. A., Cursino-Santos, J. R., Singh, M., & Rodriguez, M. (2019). *Babesia divergens*: A drive to survive. In *Pathogens* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030095>
- Long, S., Wang, Q., & Sibley, L. D. (2016). Analysis of Noncanonical Calcium-Dependent Protein Kinases in *Toxoplasma gondii* by Targeted Gene Deletion Using CRISPR/Cas9. *Infection and Immunity*, 84(5), 1262–1273. <https://doi.org/10.1128/IAI.01173-15>
- Lourido, S., Shuman, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Hui, R., & Sibley, L. D. (2010). Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. *Nature*, 465(7296), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature09022>
- Lourido, S., Tang, K., & Sibley, L. D. (2012). Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *The EMBO Journal*, 31(24), 4524–4534. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.299>
- Mathur, V., Kolísko, M., Hehenberger, E., Irwin, N. A. T., Leander, B. S., Kristmundsson, Á., Freeman, M. A., & Keeling, P. J. (2019). Multiple Independent Origins of Apicomplexan-Like Parasites. *Current Biology*, 29(17), 2936-2941.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.019>
- Mitcheson, D. F., Tobin, A. B., & Alam, M. M. (2015). Applying chemical genetic tools to the study of phospho-signalling pathways in malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(10), 1650–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.06.014>
- Morlon-Guyot, J., Berry, L., Chen, C.-T., Gubbels, M.-J., Lebrun, M., & Daher, W. (2014). The *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 7 is involved in early steps of parasite division and is crucial for parasite survival. *Cellular Microbiology*, 16(1), 95–114. <https://doi.org/10.1111/cmi.12186>
- Mott, J., Rikihisa, Y., & Tsunawaki, S. (2002). Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH Oxidase Components in Human Neutrophils and HL-60 Cells. *Infection and Immunity*, 70(3), 1359–1366. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1359-1366.2002>

- Murphy, R. C., Ojo, K. K., Larson, E. T., Castellanos-Gonzalez, A., Perera, B. G. K., Keyloun, K. R., Kim, J. E., Bhandari, J. G., Muller, N. R., Verlinde, C. L. M. J., White, A. C., Merritt, E. A., van Voorhis, W. C., & Maly, D. J. (2010). Discovery of potent and selective inhibitors of CDPK1 from *C. parvum* and *T. gondii*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *1*(7), 331–335. <https://doi.org/10.1021/ml100096t>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Rueckert, S., & Horák, A. (2017). Archigregarines of the English Channel revisited: New molecular data on *Selenidium* species including early described and new species and the uncertainties of phylogenetic relationships. *PLOS ONE*, *12*(11), e0187430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187430>
- Savignac, M., Mellström, B., & Naranjo, J. R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *454*(4), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0238-y>
- Sevilla, E., González, L. M., Luque, D., Gray, J., & Montero, E. (2018). Kinetics of the invasion and egress processes of *Babesia divergens*, observed by time-lapse video microscopy. *Scientific Reports*, *8*(1), 14116. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32349-7>
- Sharma, M., Choudhury, H., Roy, R., Michaels, S. A., Ojo, K. K., & Bansal, A. (2021). CDPKs: The critical decoders of calcium signal at various stages of malaria parasite development. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 5092–5107). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.054>
- Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q., & Liu, H. (2018). The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7), 1900. <https://doi.org/10.3390/ijms19071900>
- Smith, J. E., & Dunn, A. M. (1991). Transovarial transmission. *Parasitology Today*, *7*(6), 146–148. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90283-T](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90283-T)
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

- Vannier, E., Gewurz, B. E., & Krause, P. J. (2008). Human Babesiosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(3), 469–488. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.010>
- Vidadala, R. S. R., Ojo, K. K., Johnson, S. M., Zhang, Z., Leonard, S. E., Mitra, A., Choi, R., Reid, M. C., Keyloun, K. R., Fox, A. M. W., Kennedy, M., Silver-Brace, T., Hume, J. C. C., Kappe, S., Verlinde, C. L. M. J., Fan, E., Merritt, E. A., van Voorhis, W. C., & Maly, D. J. (2014). Development of potent and selective *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) inhibitors that block the transmission of malaria to mosquitoes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.048>
- Walker, D. (1998). Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annual Review of Public Health*, 19(1), 237–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.19.1.237>
- Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Li, T.-T., Chen, K., Ning, H.-R., & Zhu, X.-Q. (2016). Evaluation of the basic functions of six calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii* using CRISPR-Cas9 system. *Parasitology Research*, 115(2), 697–702. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4791-6>
- Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Zhang, N.-Z., Chen, J., & Zhu, X.-Q. (2015). Genome-wide expression patterns of calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0917-z>
- Wei, N., Cao, J., Zhang, H., Zhou, Y., & Zhou, J. (2021). The Tick Microbiota Dysbiosis Promote Tick-Borne Pathogen Transstadial Transmission in a *Babesia microti*-Infected Mouse Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.713466>
- Wernimont, A. K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J. C., Artz, J. D., Lin, Y.-H., Lew, J., Hutchinson, A., & Hui, R. (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(3), 803–820. <https://doi.org/10.1002/prot.22919>
- Wiesner, J., Reichenberg, A., Heinrich, S., Schlitzer, M., & Jomaa, H. (2008). The Plastid-Like Organelle of Apicomplexan Parasites as Drug Target. *Current Pharmaceutical Design*, 14(9), 855–871. <https://doi.org/10.2174/138161208784041105>

- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Zhang, Q., Shao, Q., Guo, Y., Li, N., Li, Y., Su, J., Xu, R., Zhang, Z., Xiao, L., & Feng, Y. (2021). Characterization of Three Calcium-Dependent Protein Kinases of *Cryptosporidium parvum*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622203>
- Zhang, X.-M., Liu, L.-X., Su, Z.-M., Tang, J., Shen, Z.-J., Gao, G.-F., Yi, Y., & Zheng, H.-L. (2019). Expression analysis of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) superfamily genes in *Medicago lupulina* in response to high calcium, carbonate and drought. *Plant and Soil*, 441(1–2), 219–234. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04109-7>
- Zhang, Z., Ojo, K. K., Vidadala, R., Huang, W., Geiger, J. A., Scheele, S., Choi, R., Reid, M. C., Keyloun, K. R., Rivas, K., Kallur Siddaramaiah, L., Comess, K. M., Robinson, K. P., Merta, P. J., Kifle, L., Hol, W. G. J., Parsons, M., Merritt, E. A., Maly, D. J., ... Fan, E. (2014). Potent and selective inhibitors of CDPK1 from *T. gondii* and *C. parvum* based on a 5-aminopyrazole-4-carboxamide scaffold. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(1), 40–44. <https://doi.org/10.1021/ml400315s>

Seznam příloh

Příloha č. 1 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_014540c

Příloha č. 2 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_024410

Příloha č. 3 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_030560

Příloha č. 4 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_35940c

Příloha č. 5 – seznam použitých sekvencí k fylogenetické analýze

Vysvětlivky

a SNP

AAAAAA 5' a 3' UTRs (netranslatovatelné úseky)

AAA start nebo stop kodon

AAAAAA kódující sekvence

AAAAAA a **AAAAAA** amplifikační a sekvenační primery (viz Tabulka III)

AAAAAA intron

Příloha č. 1 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_014540c

gDNA

CTTTGTTTAATTACATGGAATCAACCCACCGCGAACGCGTATGGGATGGTGCGCGCAATACGGGAAGAAACA
AACATGGCCACACACAATCTCACATAAAATTGACCCATGTAATTTGTTAGGGCGACGAGGTTCGCTTATTTGATA
TACGATGGGAAATTGTTGTTCCCAAGGCGCAGCGGTTGTAGAACAAAATGTTGCTGAACAAAAGCCAGTGGT
ATGGTCGTAAGACAGCAGTCATCTGACAGCTCAGACGCGCATTAGATTATATCGCGCCAGAAGTGT
ACGGATGTCTTCAAGGATCTCCGAAGGCCGGTGTACATACCCACCTCGCAACCAAATATCGTACCACGCTC
CTCGCCGCTGTTATCAACAGATACAATGGAGAGGCTGAATATGATGAAGACGCGAGTGACGACGGATGCTG
TGCCGATTCCGTTGGTCGTAGGTTCTCGGAGTGCCTATGCTGATGGACCTTGTGTTGGTGCGTGATCTCTGGA
GATCTCGCATCATTACCGGGAGTAACATTAGTGCAAAGTACGCTGTCAGCCCTAACTTATCGGCTTCGGGGT
ATGTGGTTCAGTGAGACAGATTATCGAGAAAAAGTACAGCGCTCATTGCGCTGAAGAGCCTCAAGACCTC
ACTGCATCACGGAGAAAGCTGACCAGTATATTCAACGAAATCGCAATATACATTCAGCTTGATCATCCAAACA
TCGCATTCCCTCACGAGGTGCATGAAGAGGTCGGTGTCTGTACATGGTCATGGAGCACTGCACGGGGAACG
AGCTCTATGACAGACTCGACAATAAAGCGCTTCGCCGAAAATTACACCAAACAGCTCACCGTGCAAATGCTA
CTCGCCCTAACTATCTGCATTCTAACGGAATATGCCACAGGGACCTAAAGCTGGAGAACTGGGTGTTTTCAAC
CCCCGACATGGGCTCGCCCTAAAAATGATAGACTTCGGCTTCGTAAGGCTCTTCAAGAGGGAGTACCCATG
GGTGGAATGCATGGAAGTGTACTATGTCGACCCTGAGGTCATTGACGGATGCTACAACGAAAAGTGTGAT
GTGTGGAGCACTGGTGTATCATGCTATACATGCTGCTATCAGGCTCACCCCATCAACGGGGATGCTGACAGAG
ATATCCTATTGAAGATCAAAAAGGCACTCTCAAATTCGAAGGAATTCGGTGGAGCCAGGTTTCGGAAACGGC
GAAGGACTTCATAAGATACCTGCTCAACAGAAATGGGACGGAGCGCGCATCTGCTATTAGGCGCTCCACCAC
CCGTGGCTGCGTGATGAAGTCGCAAGTTCGACAAAAACACCATTTCTGTTGAGATGTTACGCCACATTGTGG
AATTTAGCAAAAAGACACCACTACACAGGGCCATTGTGGCACTATGTGTTCTAAATGGCGATCGTAATCTGCAC
CCGGAATATATCAGGCGTTCTTCTCAATAAATACATCGAGCACTGGGTCGATAACGCTGGCAGAGTTTACAA
CAGCCATGGAACAGCATTAGGGCTAAGTGAGCAAGAAATCGCCAACATCTTCGACACCATTGCATTCCGCGG
AACGCCCTATCTGCATTATACGGAATTCGTAACGGCAGTATATGAAAATATAACGAAAGTGGATATCAATTCTC
TCTCGCAAGTGTACAAAAAATCGATGTTTTCGGAAACGGGCGTGTAAATGCCAGTCATTACAGCCTGTATT
GGCGAGTATTTAGCGGGACTCCTGTGGATTCCATGTTAAGCGAGGTCGAGTTGAACCAAATGGAGTCATTG
ACTTCGCGAAATTTGTGAGTGCATCATTAGCGTACATTAGTGTGTACGCGCAGGGCGACGTTGCGTAATGGA
GGCCGAAAATCAACAATGCCATTGGGGACGCGAATGAGTGCCTTAGCATCACCAGAAAAAATCATGACT
ACAAACCCTAGCAAAAAGAGCGGCATGAATGTCCACTACCCCGA

cDNA

CTTTGTTTAATTACATGGAATCAACCCACCGCGAACGCGTATGGGATGGTGCGCGCAATACGGGAAGAAACA
AACATGGCCACACACAATCTCACATAAAATTGACCCATGTAATTTGTTAGGGCGACGAGGTTCGCTTATTTGATA
TACGATGGGAAATTGTTGTTCCCAAGGCGCAGCGGTTGTAGAACAAAATGTTGCTGAACAAAAGCCAGTGGT
ATGGTCGTAAGACAGCAGTCATCTGACAGCTCAGACGCGCATTAGATTATATCGCGCCAGAAGTGT
ACGGATGTCTTCAAGGATCTCCGAAGGCCGGTGTACATACCCACCTCGCAACCAAATATCGTACCACGCTC
CTCGCCGCTGTTATCAACAGATACAATGGAGAGGCTGAATATGATGAAGACGCGAGTGACGACGGATGCTG
TGCCGATTCCGTTGGTCGTAGGTTCTCGGAGTGCCTATGCTGATGGACCTTGTGTTGGTGCGTGATCTCTGGA
GATCTCGCATCATTACCGGGAGTAACATTAGTGCAAAGTACGCTGTCAGCCCTAACTTATCGGCTTCGGGGT
ATGTGGTTCAGTGAGACAGATTATCGAGAAAAAGTACAGCGCTCATTGCGCTGAAGAGCCTCAAGACCTC
ACTGCATCACGGAGAAAGCTGACCAGTATATTCAACGAAATCGCAATATACATTCAGCTTGATCATCCAAACA
TCGCATTCCCTCACGAGGTGCATGAAGAGGTCGGTGTCTGTACATGGTCATGGAGCACTGCACGGGGAACG

AGCTCTATGACAGACTCGACAACATAAGCGCTTCGCCGAAAATTACACCAAACAGCTCACCGTGCAAATGCTA
CTCGCCCTTAACTATCTGCATTCTAACGGAATATGCCACAGGGACCTAAAGCTGGAGAACTGGGTGTTTTCAAC
CCCCGACATGGGCTCGCCCTTAAAAATGATAGACTTCGGCTTCGCTAGGCTCTTCGAAGAGGGAGTACCCATG
GGTGGAAATGCATGGAAGTGTGTACTATGTCGACCCTGAGGTCATTGACGGATGCTACAACGAAAAGTGTGAT
GTGTGGAGCACTGGTGTTCATCGTATACATGCTGCTATCAGGCTCACCCCCATTCAACGGGGATGCTGACAGAG
ATATCCTATTGAAGATCAAAAAGGGCACTCTCAAATTCGAAGGAATTCGGTGGAGCCAGGTTTCGGAAACGGC
GAAGGACTTCATAAGATACCTGCTCAACAGAAATGGGACGGAGCGCGCATCTGCTATTCAGGCGCTCCACCAC
CCGTGGCTGCGTGAT**GAAGTCGCCAAGTTCGACAA**AAACACCATTTCTGTTGAGATGTTACGCCACATTGTGG
AATTTAGCAAAAAGACACCACTACACAGGGCCATTGTGGCACTATGTGTTCTAAATGGCGATCGTAATCTGCAC
CCGGAAATATATCAGGCGTTCTTCTCAATAAATACATCGAGCACTGGGTCGATAACGCTGGCAGAGTTTACAA
CAGCCATGGAACAGCATTAGGGCTAAGTGAGCAAGAAATCGCCAACATCTTCGACACCATTGCATTCCGCGG
AACGCCCTATCTGCATTATACGGAATTCGTAACGGCAGTATATGAAAACATAACGAAGGTGGATATCAATTCTC
TCTCGCAAGTGTACAAAAAATCGATGTTTTCGGAAACGGGCGTGTAATGCCAGTCATTACAGCCTGTATT
GGCGAGTATTTAGCGGGACTCCTGTGGATTCCATGTTAAGCGAGGTCGAGTTGAACCAAAATGGAGTCATTG
ACTTCGCGAAATTTGTGAGTGCATCATTAGCGTACAT**TAGTGTACGCGCAGGGCGACGTTGCGTAATGGA**
GGCCGAAAACCAATGCCATTGGGGACGCGAATGAGTGGTTAGCATCACCAAGAAAAAATCATGACT
ACAAACCCTAGCAAAAAGAGCGGCATGAATGTCCACTACCCGA

Primery a jejich sekvence (viz Tabulka III):

MJ_7_Bdiv_014540c_seq_F = CGGGAAGAAACAAACATGGC

MJ_8_Bdiv_014540c_seq_F2 = CAGCTTGATCATCCAAACATCG

MJ_9_Bdiv_014540c_seq_F3 = GAAGTCGCCAAGTTCGACAA

MJ_10_Bdiv_014540c_seq_R = CTTGGTGATGCTAACGCAC

Příloha č. 2 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_024410

gDNA

CATACATGAATTTTTGAATAATTGCTAGCGTTTTGCTACGAATACACTAAACGCAGTACTTCAATTTTAATGCAA
TTGATTGCCGCAAATAACGGCATCCCTTCAAGTAGATGTGCTTGCGCAGGAATATTTTCAAACCTCAGAAAG
CATGGATGATAAATCCGGACAGCTTCGTGGCAGCAATGAACGGGCTGCCACAGTTGCCACCTCTGTGCCGGGA
ACGAGCAGTCAACGCTCCAGCTCGCTAAGGGCGACACCGGGTATGTTTGTTACATGCTCATACGCATCCTCCG
CCAAACTACAAGGCTGTCAAGCTTCTTGCAAAGGTTCAATTTGGAGAAGTCTTGCTGTGCATTAACAGAGCC
ACGGGTCAGCAGTACGCCGTGAAGGTCATTGTTAAAAGCTCAGTCAAGAGGAAGGGAGACCATGAGTCCTTG
TTACGCGAAGTCGAAGTTCTCAAGGGACTTGACCACCCCAATATTATGAAGATATTTGAGTTTTTCGAGGATGA
CAAGTACTATTACTTTGTTACAGAACTCTACTCTGGAGGTGAACTGTTGACGAAATTGTCAACCGAAAGTGCT
TTTCGGAGCAGGACGCCGCTAAAATCATCAAACAGGTGCTCAGTGAATTAATTACATGCACAAGCAAAACGT
AGTACACCGTGATCTCAAACCGGAGAATCTACTTTTGAATCCAAGATTCCCAACTCTAACATTAATAATCATTG
ATTTCCGGCCTGTCAACATACTGCGATGTGGATTCAAAAATGAAGGACAAGATCGGAACGTAAGTGGCTTCCTT
CAGCTCTACAATCTTGTGCAGCGCTACTACATTGCCCCGATGTGCTCAGGGGTGTATACGACAGCAAATGT
GACATCTGGTCGATTGGTGTAAATCTCTACATTTACTCTGTGGCTTCCCGCGTTCAACGGTGCTAACGAAGG
CGAAATCATTAAAGAAGGTTCAAAGCGGAAAGTACTCCTTCGATATGCCTCAATGGCGCAAGGTCTCAGAGAGC
GCGAAAGACCTCATCAGACGCATGATCACCTACAACCCTGCCAAGAGGATAACAGCGTCAGAAGCACTAGAG
CACCATTGGATCCAATACATGACTAAGGATGCCAATGTGGATCTACCGAGTCTGGAATCATCTATCAACAATAT
GAAAACTTCTACCTCACGCAGAACTCTACAAGCTGCCTACTGTACATAGGATCGAAATTAATCACAAGG
AAGAGAGTGCACACCTCACACAATATT**CAGCAAAATGGACAAGAACGG**AGATGGCCAACTTGACCGCAATG
AACTCATCGAGGGATTCTCTGAGTATATGCGTCTGAAGGGAACACCGTCCGACAACATCGACCTTAGCAGCGT
GGAAGAACAGGTCGACCAGATATTGCAGAGTATAGATTTGATAGGAACGGTTACATCGACTACAGCGAATTC
CTCACCGTAGCCATGGACCGTCGTAGCTTGATGCAGAAGGATAGACTCGAAAAGGCTTTCAAGCTCTTCGACG
CGGATGACTCGGGCACCATATCCTCAACGGAAGTGGTAAAATATTCGGCGTAGTGGATGTTAGCCAGGAGG
ACTGGCAACGTGTCCTGCATGAAGTTGACAGCAACAACGACGGCGTGATAGATTTTGAAGAGTTCAAGGCCAT
GTTGACAAGATTGGTT**TAA**AAATTTTCAATAAATGGCAATAGCTTATCACATATTGCCAAGTAAGTGCATTATC
TTAATTAGTAGACTAACTATTGTTTTATG**ACCAAATTCGAGTAGCTCG**TTATATCGACATCCTTGCCACAGATT
TGTTAATTCCTATCAGCAT

cDNA

CATACATGAATTTTTGAATAATTGCTAGCGTTTTGCTACGAATACACTAAACGCAGTACTTCAATTTTAATGCAA
TTGATTGCCGCAAATAACGGCATCCCTTCAAGTAGATGTGCTTGCGCAGGAATATTTTCAAACCTCAGAAAG
CATGGATGATAAATCCGGACAGCTTCGTGGCAGCAATGAACGGGCTGCCACAGTTGCCACCTCTGTGCCGGGA
ACGAGCAGTCAACGCTCCAGCTCGCTAAGGGCGACACCGGGTATGTTTGTTACATGCTCATACGCATCCTCCG
CCAAACTACAAGGCTGTCAAGCTTCTTGCAAAGGTTCAATTTGGAGAAGTCTTGCTGTGCATTAACAGAGCC
ACGGGTCAGCAGTACGCCGTGAAGGTCATTGTTAAAAGCTCAGTCAAGAGGAAGGGAGACCATGAGTCCTTG
TTACGCGAAGTCGAAGTTCTCAAGGGACTTGACCACCCCAATATTATGAAGATATTTGAGTTTTTCGAGGATGA
CAAGTACTATTACTTTGTTACAGAACTCTACTCTGGAGGTGAACTGTTGACGAAATTGTCAACCGAAAGTGCT
TTTCGGAGCAGGACGCCGCTAAAATCATCAAACAGGTGCTCAGTGAATTAATTACATGCACAAGCAAAACGT
AGTACACCGTGATCTCAAACCGGAGAATCTACTTTTGAATCCAAGATTCCCAACTCTAACATTAATAATCATTG
ATTTCCGGCCTGTCAACATACTGCGATGTGGATTCAAAAATGAAGGACAAGATCGGAACCGCCTACTACATTGC
CCCCGATGTGCTCAGGGGTGTATACGACAGCAAATGTGACATCTGGTGCATTGGTGTAAATCTCTACATTTAC
TCTGTGGCTTCCCGCGTTCAACGGTGCTAACGAAGGCGAAATCATTAAAGAAGGTTCAAAGCGGAAAGTACTC

CTTCGATATGCCTCAATGGCGCAAGGTCTCAGAGAGCGCGAAAGACCTCATCAGACGCATGATCACCTACAAC
CCTGCCAAGAGGATAACAGCGTCAGAAGCACTAGAGCACCATTGGATCCAATACATGACTAAGGATGCCAATG
TGGATCTACCGAGTCTGGAATCATCTATCAACAATATGAAAACTTCTACCTCACGCAGAACTCTCACAAGCT
GCCTTACTGTACATAGGATCGAAATTACTCACAAAGGAAGAGAGTGCACACCTCACACAAATATT**CAGCAAAA**
TGGACAAGAACGGAGATGGCCAACCTTGACCGCAATGAACTCATCGAGGGATTCTCTGAGTATATGCGTCTGA
AGGGAACACCGTCCGACAACAT**G**GACCTTAGCAGCGTGGAAGAACAGGTCGACCAGATATTGCAGAGTATAG
ATTCGATAGGAACGGTTACATCGACTACAGCGAATTCCTCACCGTAGCCATGGACCGTCGTAGCTTGATGCA
GAAGGATAGACTCGAAAAGGCTTTCAAGCTTTGACGCGGATGACTCGGGCACCATATCCTCAACGGAAGCTG
GGTAAAATATTCGGCGTAGTGGATGTTAGCCAGGAGGACTGGCAACGTGTCCTGCATGAAGTTGACAGCAAC
AACGACGGCGTGATAGATTTTGAAGAGTTCAAGGCCATGTTGACAAGATTGGTT**TA**AAATTTTCAATAAAT
GGCAATAGCTTATCACATATTGCCAAGTAAGTGCATTATCTTAATTAGTAGACTAACTATTGTTTTATGACCAAA
TTCGCAGTAGCTCGTTATATCGACATCCTTGCCACAGATTGTTAATTCCTATCAGCAT

SNP: změna tripletu ATA na ATC, oba triplety kódují Isoleucin.

Primery a jejich sekvence (viz Tabulka III):

MJ_11_bdiv_024410_seq_F = GCTACGAATACACTAAACGCAG

MJ_12_bdiv_024410_seq_F2 = CAAAACGTAGTACACCGTGATC

MJ_13_bdiv_024410_seq_F3 = CAGCAAAATGGACAAGAACGG

MJ_14_bdiv_024410_seq_R = CGAGCTACTGCGAATTTGGT

Příloha č. 3 – sekvence gDNA a cDNA Bdiv_030560

gDNA

TCGTCCGCGCATTGTAGTTTTATAGTTCCATGTCTACAGTCGTGATGCCGCGTAATCTACCTATTCGGCTTTG
TCTTTCGCTTGCGCCCTGGGAGTGTGTCTTCTATTTCCACCTGTGGTTCGGGATTCTGACCAAGACGACA
ATGGTTTTGTCTGACGGTTTCCGATTCCAAAAGAGCTGTACACGCACTGCATCAAGAAGTTCGACAGCAGTG
AGTTTGAGTTCTGAGTCAGTTGTTCAAGGAATTGGCTGGCCGTTCTCAGACCCCTGGCATAGACAAGGAGAC
GTTTTGCAATACTTCAATCTCCAGGTCTTGGGGTGAGCGTTTTCGCCACTTTGACGTCGACGGTGGGT
GTAGTGTGGTTTTCGTATCACTTATCCTCAGATTCCAACAGTGTGAGTTGAGGAGTTTATGGTTGGCATATC
AATATGTTGCCGTGGTACCCGCGCAGAGAAGATCAACGTGTTATTTACGTCTTTGATCTAAACGAGGATGGTT
TCATTGAGAAGCCGGAGCTCGTGGCTATGCTTCTAATTTCCCAGGATGGCGTTGCATATGTCCAAGTGTCTG
AATGCTCAGATTTCCGATGGCAGTTGTGATCAGAGTGTGCGTTGGACCATTGCCCTGTGCTTGGCTACCGG
TAGCGCTTCTGAAAGCA

GGAAGGATTCCCGTGGAGTTTCGTCTCCGAAGATGTACGTGGACCCCTTTATGCC
GCCACACCGAGCATCAAAGACGCCGATACGTCAATGGGCGTAAGGAAGATGGTGCACAAAGACACAGCTGCT
TTAAGGAGTTGGTTTTCTTCTGAGCAGGTTATCATTTAGTCTGTTGTTCCAATGAGTCTCTGCGTAAGGTA
GAGGTTGTTGAGAATTCTGCCGACAGTATGCTGCTTTCACGGAGTGTCAAGAATCGCAGGCGATTAATTTCTC
GAGGAATCAGATCTCCAATCTGCGTCGGTCTTGTCTGCCTCGGCATGTGACCGTATGGCCAGTTCGTCATCT
CGCCCATGTGCTGACCTGTCCCCCAGGATAAGCTGTGCGGACACTGTAGATCGTCTTCTATTGATAGCAGTCG
GCCATCCCTTGGATTGGATAGTCCACATTCCGATATTGACGTTGGCAAGGATTTCCGCCATCGCCGCTCTAGTC
TGCGCATCTCGTCCCCCCTGTCCAGGATCTTGGTGATACCGATCCAATTATTTATCGCATAACGGCCGGGAC
GCGAACGTTGTCGCTGCATCCAAGGTTTGGATGAGGCTGAGACC

CATCGCAAGTCACAGTGTGACAATTCCC
CGCGCAGCCTCGACAGTCTCATGTGCCATTGCCGCGATGGCCATAGTGGACGAAGACCCGCTTGTGATGT
CGACAGCATTGCAATGGACATTATCGTTGAGAGCATTTCGGAGACTGTGAATTCAACGATAAGGGCAGCCTT
GATTTGGCCAAGTTAAGATGTGGCTGAATAAGAACGACTCTGTGCTTACTATGTTTTCCGAGTACATGCATGA
GGAGTTTTGGGGTCTGCAGGGCAACGCCTTCTGCCATCTCCTGAGAGTACAGAGTTTTTTGTGAACAGTGTTT
CTGGCGATCTGAGGCTATCTCCCCTGAGTTTGGCGATGATTCTAAGGGTGCTTAGAGGTTGATGGTCAGGA
CAAGGTGGTTCAGCGCATGGTCTACCAGATGTTTTGGTGAACGATACGGAGGCGCAGGCGTTTACGGAATG
CGTATCGTCTTGGAGAATGTTGTTAGTGAGGAGCTTTTGAATATCTGCACCAGGTTTCCAGCAAGATGCAGC
GTAAGAGCAGCCTTGTGACAGGTAGAATTCGTACCGATGACATCACCGATACGCCTACTTCTTCGAATGTGTT
AACTAAGGAGATTTTTTCGTGCCCAACTGTGGGACACCATTTTCATGTGCCCTGAGTGTTCATAGGCACG
AATCACTTTCCCTTACGTGGACTCCGGGGTGACATTGTATGTGATCACTGTGAGAGTAATAACAGGGGCACT
CGCTTACGAGTTGTTGGATTTGTGGCTGGACTTTTTCCGAGGCCATGCAGATGGCGCTCATCAAGCGTCGCCA
GCGGGATAGGTCTCAGTTATGCAATCGTAGGCCTTCAAGCATAACGAACGTCTCCTATCAGGCGTTTCCGCACCG
TTTACGCCCTTCTGTAGGATTCTGATGTCAGACGATACGCCACGCAGTAGGCGTTCGATGAAGTATGCGATT
TCCCAAGCTCTGTAACCTCAGGAGTGGATTGCATAACGCCGAGCTGCTTGTACATCAAAGGATAACCTATT
GGTGCCGTTGGATAGTTTACTTCTCTGTCTCATGCAGTGAGGGCGGTGACTGGCCGCTGGTGCATGCCAAG
CTTCTATAAAGTCTGGCTACATGTTCAAGCACGGCCGGCACTTCCACAAGTTGAAGAAGCGTTATTTCATTTT
GATTGACAACCTATTATACTATTATAGTGATAAGGAGAGCACCAAGCCAGTGGCTGTCTTTTCTCGAGGGT
TGTTACCTGGACTTCTTGGTGAGGAACGACCACGCGTCTGACATGTATGGGTTGTGCATTTGCCACAAGGCCA
ACAAGTTCAACCGTCGTGAATTTTACGTGGCTTCTAGGGCTGACTTTTTCGAATGGGTTGAGGCTCTCTCCGTT
GCCATGAAGCAGCAGAGCCTGATGCAGCTGTACAACATATGTGAGCAGATTGGCCACGGCAAGTTCAGTGTG
GTTTATCGCGGATTACAAGAGCACTGGTGAGGAGTTCGCCGTGAAGATTGTTGACAAGTCGAAGATTGGG
GTTCAGGAGCGGGAGCTGCTCCGTAGTGAGATTGCCATTTGCGTCTGTTGAGCCATAAGCACGTGATTTACC
TGAAGGATGTTAGCGACACGTGTGACTCCCTGTACATCGTGATGGAGCTTGTGAAGGGCGGCGAGCTGTACG
ATTTGATAAACCAGAAGCACCGTTTGTCTGAAGCGCACGCGACAAGATTATCTGTCAGTTGTTGGAGATCGT
GGCGTACCTCCACAAGTGCGGTATCATCCACCGCGACATAAAACCTGAGAACATCTTCTGACTGACAAGACT

GAGAGTGCGACTATAAAGCTGACAGACTTTGGTTTATCTACGCTATGCGACCCCAACGAGCTGCTCACGCAGC
CGTGCGGTACGCTCGCGTATGTCGCCCCGAAGTGCTGACCCTCAGGGGTACAACCAGAAGGCGGACGTAT
GGTCCATTGGCGTGATTATGTTTCTGCTTCTGCGTGGGCGTCTCCGTTTTAGTGAAGAACCCCGCTAACCTC
GATATGAACAAGCACTATCGCGTCCGCTTCGAGGGGCGTCACTGGGACGGCGTGTCTACGCTGCGAAGGAC
CTAATAACGCGTCTGCTACACTTGAACCCTGAGAAGCGCATCACTGTGTTTGTATGCTCTTGACCACATTTGGGT
GAAGAACTTCGTTGCCGTGAATTATGACGAATCGCTGAGTGTATGCGGGGAGCATGGAGGCTACGACAGAGTT
GATCACTCGCTGCGTAACACCACAGACACGACCTTTGTGATCCCTACACTGAGAGTTGTATCGAGAACTTAA
AAGCCCTTCAGAACGATGCGTATGAGCCCCGCGATGAGCCGCTGGGACCGTTGAGGAG**TGATGCCTAAGCG**
CCGTCGTAGCTTATCTTTAACAGACCTTCTGCGGGCGTTTTACAGGAGCTCGTGGATTACGATCCATGCGCCT
TCGCTCCGCTATGCCGAGGCTGAGCGACCTCGCCTTGGGGCGCATCGCACGCTTATAATATCAC

cDNA

TCGTCGCGCATTGTAGTTTTATAGTT**CATGTCTACAGTCGTGATGCCGCGGTAATCTACCTATTCGGCTTTG**
TCTTTCGCTTGCGCCCTGGGAGTGTGTCTTCTATTTCCACCTGTGGTTCGGGATTCTGACCAAGACGACA
ATGGTTTTGTCTGACGGTTTCCGATTCCAAAAGAGCTGTACACGCACTGCATCAAGAAGTTCGACAGCAGTG
AGTTTGAGTTCTGAGTCAGTTGTTCAAGGAATTGGCTGGCCGTTCTCAGACCCCTGGCATAGACAAGGAGAC
GTTTTGCAATACTTCAATCTCCAGGTCTTTGGGGTGAAGCGTTTGTTCGCCACTTTGACGTGACGATTCCAA
CAGTGTGAGTTTGAAGGAGTTTATGGTTGGCATATCAATATGTTGCCGTGGTACCCGCGCAGAGAAGATCAAC
GTGTTATTTACGTCTTTGATCTAAACGAGGATGTTTTATTGAGAAGCCGGAGCTCGTGGCTATGCTTTCTAA
TTTCCCAGGATGGCGTTGCATATGTCCAAGTGTCTGAATGCTCAGATTTCCGATGGCAGTTGTGATCAGAGTG
TTGCGTTGGACCATTGCCCTGTGCTTGGCTACC**GGTAGCGCTTCTGAAAGCA**GGAAGGATTCCCGTGGAGT
TTCGTCTCCGAAGATGTACGTGGACCCCTTTTATGCCGCCACACCGAGCATCAAAGACGCCGATACGTCAATGG
GCGTAAGGAAGATGGTGCACAAAGACACAGCTGCTTTTAAAGGAGTTGGTTTCTTCTCTGAGCAGTTATCATT
CAGTCTGTTGTTTCCAATGAGTCTCTGCGTAAGGTAGAGGTTGTTGAGAATTCTGCCGACAGTATGCTGCTTTC
ACGGAGTGTCAAGAATCGCAGGCGATTAATTTCTGAGGAATCAGATCTCCAATCTGCGTGGTCTTGTCTG
CCTCGGCATGTGACCGTATGGCCAGTTCGTATCTCGCCATGTGCTGACCTGTCCCCCAGGATAAGCTGTG
GACACTGTAGATCGTCTTTCTATTGATAGCAGTCGGCCATCCCTGGATTGGATAGTCCACATTCCGATATTGAC
GTTGGCAAGGATTTCCGCCATCGCCGCTCTAGTCTGCGCATCTCGTCCCCCTGTCCAGGATCTTGGTGATAC
CGATCCAATTATTTATCGCATAACGGCCGGGACGCGAACGTTTCGTGCTGCATCCAAG**GTTTGGATGAGGCT**
GAGACCATCGCAAGTACAGTGTGACAATTCCCCGCGCAGCCTCGACAGTCTCATGTGTCCATTGCCGCGAT
GGCCATAGTGGACGAAGACCGCCTTGTGATGTGACAGCATTGCAATGGACATTATCGTTGAGAGCATTITG
GAGGACTGTGAATTCAACGATAAAGGGCAGCCTTGATTTGGCCAAGTTTAAAGATGTGGCTGAATAAGAACGACT
CTGTGCTTACTATGTTTTCCGAGTACATGCATGAGGAGTTTTGGGGTCTGCAGGGCAACGCCTTCTGCCATCT
CCTGAGAGTCACGAGTTTTTTGTGAACAGTGTCTGCGCATCTGAGGCTATCTTCCCCTGAGTTTGGCGATGA
TTCTAAGGGTGTCTTAGAGGTTGATGGTCAGGACAAGGTGGTTCAGCGCATGGTCTACCAGATGTTTTTGGTG
AACGATACGGAGGCGCAGGCGTTTACGGAATGCGTATCGTCTTTGGAGAATGTTGTTAGTGAGGAGCTTTTGC
AATATCTGCACCAGGTTTCCAGCAAGATGCAGCGTAAGAGCAGCCTTGTGACAGGTAGAATTCGTACCGATGA
CATCAC**CGATAACGCCTACTTCTCGA**ATGTGTTAACTAAGGAGATTTTTCTGCCCCAACTGTGGGACACCAT
TTTTCATGTGCCCTGAGTGTTCATAGGCACGAATCACTTTCCCTTACGTGGACTCCGGGGTGTACATTGTAT
GTGATCACTGTGAGAGTAATAACAGGGCACTCGCTTACAGAGTTGTTGGATTTGTGGCTGGACTTTTTCCGA
GGCCATGCAGATGGCGCTCATCAAGCGTCGCCAGCGGGATAGTCTCAGTTATGCAATCGTAGGCCTTCAAGC
ATACGAACGTCTCCTATCAGGCGTTTCCGCACCGTTTACGCCCTTCTGTAGGATTCTGATGTCAGACGATACG
CCACGCAGTAGGCGTTTCGATGAAGTATGCGATTTCCCAAGCTCTGTAACCTCAGGAGTGGATTGCATAACGC
CGCAGCTGCTTGTACATCAAAGGATAACCTATTGGTGCCGTTGGATAGTTGACTTCTCTGTCTCATGCAGT

GAGGGCGGTGACTGGCCGCTGGTGCATGCCAAGCTTCTATAAAGTCTGGCTACATGTTCAAGCACGGCCGGC
ACTTCCACAAGTTGAAGAAGCGTTATTTCATTTTGATTGACAACCTATTATACTATTATAG**GTGATAAGGAGAGC**
ACCAAGCCCAGTGGCTGTCTTTTCTCGAGGGTTGTTACCTGGACTTCTTGGTGAGGAACGACCACGCGTCTG
ACATGTATGGGTTGTGCATTTGCCACAAGGCCAACAAGTTCAACCGTCGTGAATTTTACGTGGCTTCTAGGGCT
GACTTTTTCGAATGGGTTGAGGCTCTCTCCGTTGCCATGAAGCAGCAGAGCCTGATGCAGCTGTACAACATAT
GTGAGCAGATTGGCCACGGCAAGTTCAGTGTGGTTTATCGCGCGATTACACAAGAGCACTGGTGAGGAGTTCCG
CCGTGAAGATTGTTGACAAGTCGAAGATTGGGGTTCAGGAGCGGGAGCTGCTCCGTAGTGAGATTGCCATTTT
GCGTCTGTTGAGCCATAAGCACGTGATTTACCTGAAGGATGTTAGCGACACGTGTGACTCCCTGTACATCGTG
ATGGAGCTTGTGAAGGGCGGCGAGCTGTACGATTTGATAAACCAGAAGCACCGTTTGTCTGAAGCGCACGCG
CACAAGATTATCTGTCAGTTGTTGGAGATCGTGGCGTACCTCCACAAGTGCGGTATCATCCACCGCGACATAAA
ACCTGAGAACATCCTCTTGACT**GACAAGACTGAGAGTGCAGC**TATAAAGCTGACAGACTTTGGTTTATCTACG
CTATGCGACCCCAACGAGCTGCTCACGCAGCCGTGCGGTACGCTCGCGTATGTCGCCCCGAAGTGTGACCC
TTCAGGGGTACAACCAGAAGGCGGACGTATGGTCCATTGGCGTGATTATGTTTCTGCTTCTGCGTGGGCGTCT
TCCGTTTTTCAAGTGAAGAACCCCGCTAACCTCGATATGAACAAGCACTATCGCGTCCGCTTCGAGGGGCGTCACT
GGGACGGCGTGTCTACGTCTGCGAAGGACCTAATAACGCGTCTGCTACACTTGAACCCTGAGAAGCGCATCAC
TGTGTTTGTGCTCTTGACCACATTTGGGTGAAGAACTTCGTTGCCGTGAATTATGACGAATCGCTGAGTGTC
TGGGGAGCATGGAGGCTACGACAGAGTTGATTCACTCGCTGCGTAACACCACAGACACGACCTTTGTGATTCC
CTACACTGAGAGTTGTATCGAGAACTTAAAAGCCCTTCAGAACGATGCGTATGAGCCCCGCGATGAGCCGCTG
GGCACCGTTGAGGAG**TATGCCTAAGCGCCGTCGTAGCTTATCTTTAACAGACCTTCTGCGGGCGTTTTACAG**
GAGCTCGTGGATTACGATCCATGCGCCTTCGCTCCGCTATGCCGAGGCTGAGCGACCTCGCCTTGC
GGCGCATCGCCTTATAATATCAC

Primery a jejich sekvence (viz Tabulka III):

MJ_20_Bdiv_030560_seq_F = CATGTCTACAGTCGTGATGCC

MJ_21_Bdiv_030560_seq_F2 = GGTAGCGCTTCTGAAAGCA

MJ_22_Bdiv_030560_seq_F3 = GTTTGGATGAGGCTGAGACC

MJ_23_Bdiv_030560_seq_F4 = CGATACGCCTACTTCTTCGA

MJ_24_Bdiv_030560_seq_F5 = GTGATAAGGAGAGCACCAAGC

MJ_25_Bdiv_030560_seq_F6 = GACAAGACTGAGAGTGCAGC

MJ_26_Bdiv_030560_seq_R = GAAGGCGCATGGATCGTAAT

Příloha č. 4 – sekvence gDNA Bdiv_035940c

gDNA

GAACACTTTAATCTTAAGGGGAAGTTTAAGAATCTTCTCGCAAAAAAATTTGTTTGCAACTTTAAGGATGGGG
ATGTGGCTGAGACATGCGGGGATCCCAACCGCTGACGATGGATGCAACCAGCTGCCAGCTTTGAGGACACTG
CTCCTATGAAGAATGAGTCGACCGTACCATCCAATGTAGCATCTACTGTATCTTCCAATCAGAGATACGTCTGCG
CTTCTGTGCATCCAAGGGATCCACAATGTAGTAAAACACCTTCTCACAGCATCAACAGTATGGCAAGGCGGTT
GCGGAGAAATCGGAAATGCCTACACATCATAAGGTGAATCCACGCAGCGGGCCACCGAATGACCCAGATTGT
GGAAGTATATCGCTGCTAGAGCTGCCGCCTAACGCTGTCGATCATATCCAACACGTGAACAAGAATGCATGCT
GGCAGCACGATAGGATGTATAACCATGATAACCGGAATAAGAAGATTCAACACTGCGGGGATAACGTGGACT
GCCGCCAGCCTCCTATGGCTAGGCACGGGTCTACAGAATGCAAGTCTGAGAAACACATGTTACGTGCAGCCGT
CAGCATGGATTACAAACCAGACCAGTATATAATTCGCTATGCACTAAATGCATGCCGGAGGAGGATAAGATT
ACGAAGGGGTTACGGGCTTCTAATAACAAACCCCAATTTTTAATTACGTCAATGAGCCCAAGCCACAGTCTGTC
GAGGGATGTGACTCCAACTTTTGACAGATCTTTGTTGATCCACGAAACTGCTCGTTCGACGGAATGAGCATT
AATGATGTGTATGAACTTTACAGTCACCGGTTGGGCAAGGGCAGCTACGGCCAGGTGCTCAAAGCTTGCCACA
GGGAGACTGGGGAAGTGAAGGCGGTTAAAGTATCAGGAAGGCGAGTATAGAGAACGCCATGCCGATGAA
GCGCGAGATTGCTATCATGTAAGTTTAGAGCTAAAAACATTTAACCTGCCGAAGGAAAACCTTGATCATCCC
AACATTGTAAAGCTATTAGAAGTGTACGAAGATGAAGAGTGCCTCTATCTCGTATGGAGATGTGCAGCGGC
GGCGAGCTTTTTGATGAGATTGAAGGCGCGCTGTTTACAGTGAGGACTATGCCGCGACGGTAATGCCGCGAG
ATCTTTTCTGCCATTTCTACTGCCACGTAAGAGTATCTTGACCCGAGACCTCAAGCCTGAAAACATTCTCTAC
GCAAATAAAAAATAATGATTCGCCAATCAAGGTGATTGACTGGGGGTTTGTACGAAATGCCGCAAGGCGCATA
AATTCCACACGTTGGTGGGCACACCATACTAC**GTAGCACCTGAGGTGTTACTT**GGGAACTACGACAAGAGTTG
CGATATTTGGAGCGCTGGCGTCATTCTGTTTCATCATGCTTGTGGATACCCACCTTTCCACGGTAATGACAATGC
AACCATTTTGCAGAAATGTGAAGAGGGGGACGATCAACTTTGTACCTCACCATTGGAAAAACATCTCCAAGAGC
GCAATCGACCTTATCACACGCTGCCTTTCTTATGATCCAAGATACAGAATCACTGCGAAGGCGGCGTTCAATCA
TGAGTGGATCCTCCAAAAGGCAACCTCTATTTATGTCAGCCCTGTACTACGTCAATCACTACCAAGGATCTGG
TCAAACGGTTCCAGAAGTTCGACCAGTACAACAGTATGAAGCGACTGGCGCTCACTTGTATTGCGCACCACTG
TCGGACATGGATATTGGTCCGCTCAGCACGGCCTTGAAGTGCTAAACATGGAGGGCAACGGAGTGCTCTACG
TTAAGGACATTGTGAAGGTTTGCAAAATGATAAGGCCAGGGTCAAGTATGACCCCGCCATGGAGAGTCTCCT
CGAGAATCTTGACACGAATGGGAACGGTGCAATCGACTATGTCGAGTTCATCGCTGCTCCAT**GGAGCAGGAT**
GTTTATATGCAGAAGGACTTCTGTATGAAGGCATTCAAGGTATTCGACCTGGAAGGCCAAGGTGTTATCACAC
GTGAGAACATGCGGAAGGTGTTTCAAGTGCACATGAGTGCAGGCGAGTTCTCCGATGATTTTGTGGAAGAGAT
ATTCAATGAGGTTGATCTGGACAGAGATGGTGTAAATAAACTACACCGACTTCTGTACCATGCTATACGGGCTGT
CACGGCCCGGAGATGTAGCCACATTAGACTAACTCATTCAAATAAGATGTACTACTCGTTTACACAGAGCTTA
TTTATATGATGTG**CATTTGCCAAGAAGAGCCCT**GTGCTTATTTTTCCGACTCCTGGCGGTCTAATTCATCAAGG
CTTTGCAATAAGCCCAAAGCCTGAAAAGGTCGC

Primery a jejich sekvence (viz Tabulka III):

MJ_27_Bdiv_035940c_seq_F = GGGGAAGTTTAAGAATCTTCTCGC

MJ_16_Bdiv_035940c_seq_F2 = GTCGTCGAGGGATGTGACT

MJ_17_Bdiv_035940c_seq_F3 = GTAGCACCTGAGGTGTTACTT

MJ_18_Bdiv_035940c_seq_F4 = GGAGCAGGATGTTTATATGCAGA

MJ_19_Bdiv_035940c_seq_R = AGGGCTCTTCTTGGCAAATG

SNPs dle pořadí v sekvenci

- 1) změna tripletu AGG na AGA (Arginin)
- 2) **změna tripletu GCC (Alanin) na GTC (Valin)**
- 3) změna tripletu ACT na ACC (Threonin)
- 4) změna tripletu AAG na AAA (Lysin)
- 5) změna tripletu GCC na GCT (Alanin)
- 6) změna tripletu GCC na GCT (Alanin)
- 7) změna tripletu GCA na GCG (Alanin)
- 8) změna tripletu AAG na AAA (Lysin)
- 9) změna tripletu GCC na GCT (Alanin)
- 10) změna tripletu TTG na CTG (Leucin)
- 11) změna tripletu TTT na TTC (Fenylalanin)
- 12) změna tripletu GGC na GGT (Glycin)
- 13) změna tripletu ACC na ACG (Threonin)
- 14) změna tripletu TTC na TTT (Fenylalanin)

Příloha č. 5 - seznam genů použitých k fylogenetické analýze

Ortology Bdiv_014540c

Název genu	Druh organismu
BBBOND_0102640	<i>Babesia bigemina</i> strain BOND
BBOV_II007640	<i>Babesia bovis</i>
BMR1_03g01970	<i>Babesia microti</i> , strain R1
BOVATA_023770	<i>Babesia ovata</i>
CF000179	<i>Cytauxzoon felis</i> strain Winnie
TA14625	<i>Theileria anulata</i>
BEWA_025210	<i>Theileria equi</i>
TOT_020000688	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku
TpMuguga_02g00697	<i>Theileria parva</i>

Ortology Bdiv_024410

Název genu	Druh organismu
BBBOND_0110960	<i>Babesia bigemina</i> strain BOND
BBOV_IV003210	<i>Babesia bovis</i>
BMR1_03g01395	<i>Babesia microti</i> , strain R1
BOVATA_015450	<i>Babesia ovata</i>
CF004140	<i>Cytauxzoon felis</i> strain Winnie
TA16180	<i>Theileria anulata</i>
BEWA_043900	<i>Theileria equi</i>
TOT_010001019	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku
TpMuguga_01g01073	<i>Theileria parva</i>

Ortology Bdiv_030560

Název genu	Druh organismu
BBBOND_0200390	<i>Babesia bigemina</i> strain BOND
BBOV_II000610	<i>Babesia bovis</i>
BMR1_02g03735	<i>Babesia microti</i> , strain R1
BOVATA_034300	<i>Babesia ovata</i>
CF000851	<i>Cytauxzoon felis</i> strain Winnie
TA08840	<i>Theileria anulata</i>
BEWA_008260	<i>Theileria equi</i>
TOT_040000400	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku
TpMuguga_04g00518	<i>Theileria parva</i>

Ortology Bdiv_035940c

Název genu	Druh organismu
BBBOND_0309020	<i>Babesia bigemina</i> strain BOND
BBOV_III005470	<i>Babesia bovis</i>
BmR1_04g07905	<i>Babesia microti</i> , strain R1
BOVATA_005630	<i>Babesia ovata</i>
CF001488	<i>Cytauxzoon felis</i> strain Winnie
TA12965	<i>Theileria anulata</i>
BEWA_021430	<i>Theileria equi</i>
TOT_020000393	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku
TpMuguga_02g00399	<i>Theileria parva</i>

Další použité geny:

Chromera velia: Cvel_122, Cvel_1548, Cvel_5127, Cvel_15925, Cvel_10082, Cvel_20818, Cvel_25497, Cvel_14111, Cvel_2984

Vitrella brassicaformis: Vbra_20471, Vbra_19433, Vbra_12444, Vbra_14581, Vbra_15452, Vbra_3176, Vbra_8331, Vbra_17763, Vbra_3641, Vbra_18926

Cryptosporidium hominis: GY17_00001809, GY17_00003237, GY17_00002615, GY17_00002964, GY17_00003491, GY17_00001979, GY17_00003468

Cryptosporidium parvum: cgd4_3330, cgd7_40, cgd3_920, cgd5_820, cgd2_1300, cgd7_1840, cgd2_1060

Cyclospora cayetanensis strain CHN_HEN01: cyc_05613, cyc_00380, cyc_04408, cyc_02331, cyc_02860, cyc_00019, cyc_06899, cyc_05462, cyc_05724, cyc_06607

Eimeria tenella: ETH_00039855, ETH_00010685, ETH_00021675, ETH_00033170, ETH_00011250, ETH_00022015, ETH_00016095, ETH_00029770, ETH_00024540, ETH_00041400, ETH_00025085

Hammondia hammondi: HHA_237890, HHA_218720, HHA_292055, HHA_217600, HHA_224950, HHA_225490, HHA_206590, HHA_242400, HHA_295760, HHA_228750, HHA_305860, HHA_301440

Toxoplasma gondii ME49: TGME49_228750, TGME49_237890, TGME49_218720, TGME49_292055, TGME49_217600, TGME49_301440, TGME49_305860,

TGME49_224950, TGME49_225490, TGME49_206590, TGME49_242400,
TGME49_295760

Plasmodium berghei ANKA: PBANKA_0925200, PBANKA_0925500, PBANKA_0615200,
PBANKA_0314200, PBANKA_1351500, PBANKA_0408200

Plasmodium cynomolgi strain M: PcyM_0926900, PcyM_0926600, PcyM_0316800,
PcyM_0404500, PcyM_1219600, PcyM_0833600

Plasmodium falciparum 3D7: PF3D7_1123100, PF3D7_1122800, PF3D7_0217500,
PF3D7_0717500, PF3D7_1337800, PF3D7_0310100, PF3D7_0610600

Plasmodium knowlesi strain H: PKNH_0920900, PKNH_0920600, PKNH_0312500,
PKNH_0403400, PKNH_1263500, PKNH_0832600

Plasmodium vivax: PVX_091770, PVX_091755, PVX_000555, PVX_002665, PVX_082820,
PVX_119610

Ke genům BMR1_04g08970 (*B. microti*) a TA16570 (*T. anulata*) dosud nebyly nalezeny
žádné další ortology v rámci skupiny Piroplasmida. G