

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Milan Ročeň

Využití systému CRISPR-CAS9 pro genové manipulace u parazitických prvoků

Applications of CRISPR-Cas9 for genetic engineering in parasitic protists

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 20. 5. 2018

Podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Janu Tachezemu, Ph.D. za jeho vstřícnost a mnoho cenných rad. Dále pak Kateřině Šiškové za neocenitelnou podporu a neposlední řadě pak děkuji i své rodině, bez níž by tento text nemohl vzniknout.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	5
Seznam zkratek	6
1 Úvod	7
1.1. Historie	7
1.2. Klasifikace CRISPR/Cas systémů	8
1.2.1. Třída 1 CRISPR/Cas systémů.....	9
1.2.2. Třída 2 CRISPR/Cas systémů.....	11
2. CRISPR/Cas9 systém typu II	14
2.1. Integrace spacerů.....	15
2.2. Cas9 endonukleasa.....	16
2.2.1. Regulace exprese pomocí dCas9.....	17
2.3. Opravy ds zlomů DNA.....	18
3. Využití CRISPR/Cas9 systému typu II pro genové manipulace u parazitických prvoků	18
3.1. Specifika použití systému u parazitických prvoků	18
3.2. Přehled využití podle organismů	19
3.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	19
3.2.2. <i>Plasmodium spp.</i>	20
3.2.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	23
3.2.4. <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
3.2.5. <i>Trypanosoma spp.</i>	26
4. Závěr.....	28
5. Použitá literatura	29

Abstrakt

Systém CRISPR/Cas slouží jako buněčný obranný mechanismus, který chrání bakterie a archea před cizorodou DNA, především bakteriofágy. Jeho produkt utváří ribonukleoproteinový komplex, jehož složkami jsou sgRNA a Cas endonukleasy. Pomocí sgRNA, které jsou komplementární k cizorodé DNA, tuto DNA rozezná a Cas endonukleasy v ní indukují dvojitě vlákenné zlomy. Tato metoda nalézá uplatnění jak v základním výzkumu, kde je aplikovatelná pro funkční analýzu proteinů a studium genové exprese, tak i v aplikovaném výzkumu, kde může uplatnit například v tvorbě geneticky modifikovaných organismů či geneticky atenuovaných vakcín. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o systému CRISPR/Cas a jeho aplikaci pro genovou manipulaci parazitických prvoků.

Klíčová slova: CRISPR, Cas9, parazit, prvok, bakteriofág

Abstract

The CRISPR / Cas system serves as a cellular defense mechanism that protects bacteria and archaea from foreign DNA, especially bacteriophages. Its product forms a ribonucleoprotein complex, whose components are sgRNA and Cas endonucleases. Using sgRNAs, which are complementary to foreign DNA, this complex recognizes the DNA and Cas endonucleases induce double-strand breaks. This method is applied both in primary research, where it is applicable for functional analysis of proteins and the study of gene expression, as well as in applied research, where it can apply, for example, in the production of genetically modified organisms or genetically attenuated vaccines. This work summarizes the current knowledge of the CRISPR / Cas system and its application for gene manipulation in parasitic protists.

Keywords: CRISPR, Cas9, parasite, protists, bacteriophage

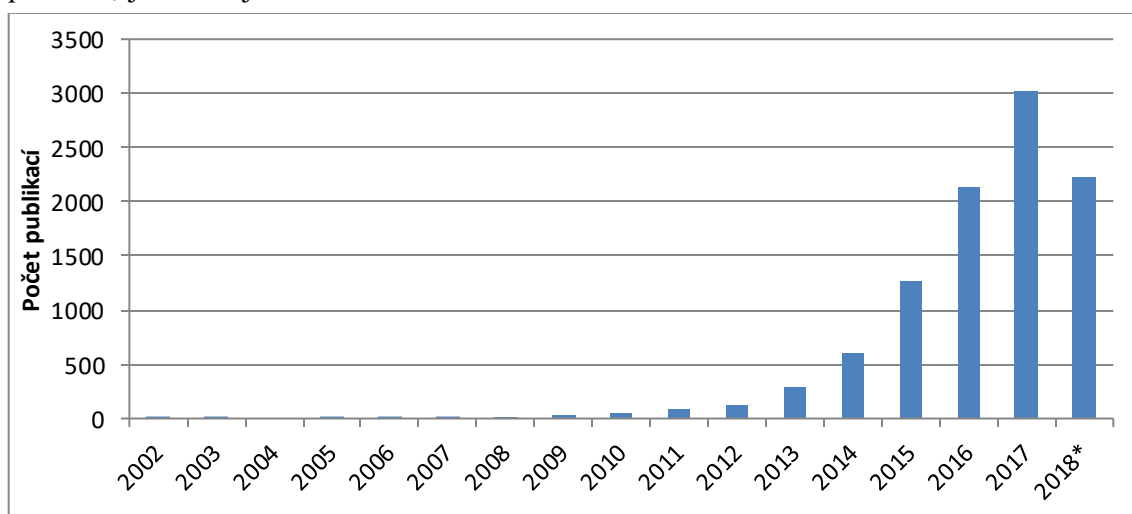
Seznam zkratek

aTc	anhydrotetracyklin
BSD	blastidicin S deaminasa
Cas	CRISPR associated protein
Cascade	CRISPR-associated complex for antiviral defense
CAT	chloramfenikol acetyltransferasa
CDPK	calcium-dependent protein kinase
CTRP	circumsporozoite protein and thrombospondin-related adhesive protein
CLAMP	claudin-like apicomplexan microneme protein
crRNA	CRISPR RNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dCas9	dead Cas9
dgRNA	dual guide RNA
ds	double strand
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FUDR	fluorodeoxyribosa
GFP	green fluorescent protein
HA	hemagglutinin
HDR	homology directed repair
hdhfr	human dihydrofolate reductase
ICAP	indispensable conserved apicomplexan protein
MBP	maltose binding protein
mRFP	monomeric red fluorescent protein
MGEs	Mobile Genetic Elements
NA	nucleic acid
NHEJ	non-homologous end joining
NLS	nucleus localisation sequence
nt	nukleotid
ORF	open reading frame
PAM	protospacer adjacent motif
PI	PAM-interacting
RAMP(s)	Repeat Associated Mysterious Protein(s)
RNAi	RNA interference
RRM	RNA recognition motif
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
ss	single strand
ssODN	single-stranded oligodeoxynucleotide
tracrRNA	trans-activating crRNA

1 Úvod

Parazitické protisty představují jednu z nejstarších hrozeb lidstva. Například malárie byla popisována již ve starověkém Egyptě, avšak její původce *Plasmodium* byl nalezen v jantarech podstatně staršího původu předcházejícího neolitickou revoluci. Vedle patogenního působení na člověka jsou rovněž významnými hospodářskými škůdci, dlouhodobě působí škody na hospodářských zvířatech, například trypanosomová nemoc nagana, způsobená druhem *Trypanosoma brucei brucei*, která má ve svých endemických oblastech rozsáhlé socioekonomické důsledky pro obyvatelstvo.

Metody genové manipulace představují praktický nástroj, jak tyto organismy lépe prozkoumat i ovlivnit. Přináší i možnosti aplikovatelného praktického využití těchto znalostí – budoucí léčby i preventivních opatření, které by mohly významně snížit zdravotní i ekonomickou zátěž, kterou tyto organismy pro lidstvo stále představují. V současnosti prochází prudkým vývojem nových poznatků, jak ilustruje Graf 1.



Graf 1: Počet publikací obsahujících klíčové slovo „CRISPR“ dostupných v databázi MEDLINE od roku 2002.

*Počet publikací dostupných v databázi k 13. 7. příslušného roku.

Převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=CRISPR>

CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice) systémy umožňují nové postupy v genové manipulaci. Mají původ v bakteriálním a archeálním systému obrany proti bakteriofágům, který je schopen specifického rozpoznávání a likvidace cizorodé DNA. Zároveň je adaptabilní a akvizicí rozpoznávaných DNA sekvencí vytváří „imunitní paměť“ známých DNA motivů. Tento systém má mnoho podob, avšak vždy je tvořen genem CRISPR, který obsahuje uložené motivy DNA, a endonukleasami Cas, které jsou výkonnou složkou systému.

V současnosti nepoužívanějším typem CRISPR/Cas systémů je typ II, který má pouze dvousložkovou strukturu. Obsahuje jediný protein Cas9, který je specificky naváděn na cílovou sekvenci pomocí sgRNA, kde zavádí ds zlomy v DNA. Dvouvláknové zlomy jsou využívány ke genové manipulaci.

1.1. Historie

Poprvé byl CRISPR popsán na Ósacké univerzitě v roce 1987 Yoshizumi Ishinem, který náhodou našel neobvyklé struktury během sekvenace genu *iap*, který je zodpovědný za izoenzymovou konverzi alkalické fosfatázy u *E. coli*, v 3' směru od sekvenovaného genu. Byly tvořeny pěti vysoce homologními sekvencemi přímých repetice palindromické struktury, oddělených spacery (Ishino et al. 1987).

Tehdy nebyla známa funkce této struktury. V roce 1993 byl CRISPR poprvé pozorován u druhu archea, konkrétně *Haloferax mediterranei* (Mojica et al. 1993). V průběhu 90. let 20. století byly tyto struktury dále nalézány při sekvenaci genomů dalších druhů bakterií a archeí (Masepohl et al. 1996; Mojica et al. 1995; Groenen et al. 1993), nicméně nebyla rozpoznána shodná povaha sekvencí, které se lišily svou polohou, délkou palindromických repetice i sekvencemi spacerů (Ruud. et al. 2002).

V roce 2004 Francisco Mojica a jeho tým objevili sekvenční podobnosti mezi těmito strukturami napříč bakteriálními i archeálními druhy a sjednotili jejich nomenklaturu pod zastřešující název CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Mojica et al. 2005). Paralelně byly objeveny geny asociované s CRISPR, nazvané pak *cas* – CRISPR associated (Ruud. et al. 2002). Díky znalosti tohoto spojení, fyzického i funkčního, byla identifikována funkce propojeného systému CRISPR a *cas* jako primitivní imunitní mechanismus chránící před bakteriofágy a parazitickou DNA, který je analogický RNAi u eukaryot. CRISPR spacerové sekvence, které jsou extrachromozomálního původu, slouží analogicky k siRNA jako naváděcí sekvence na cizorodou DNA (resp. RNA v případě siRNA) a Cas vykazuje endonukleasovou funkci odpovídající enzymu Dicer, který cílovou sekvenci rozštěpí. Přesto Cas vůči Diceru nevykazuje sekvenční podobnost (Makarova et al. 2006).

Extrachromozomální původ CRISPR spacerů je vysvětlován předchozími invazemi parazitické DNA, která byla po rozštěpení inkorporována do lokusu CRISPR jako forma imunitní paměti (Bolotin et al. 2005; Marraffini and Sontheimer 2010).

Po identifikaci struktury a funkce vyvstala možnost praktického využití přesného štěpení CRISPR v genovém inženýrství, například pro delecii či inzerci celých genů (W. Jiang et al. 2013; Y. Jiang et al. 2015), saturační mutagenézi (Oh and van Pijkeren 2014), inaktivace (Y. Jiang et al. 2015) a vnášení genů (Pinder, Salsman, and Dellaire 2015) nejprve u bakterií, následně s nutnými modifikacemi (lokalizace systému do jádra apod.) u eukaryot (Hsu et al. 2013; Gilbert et al. 2013) a nakonec i u archeí (Zebec et al. 2014; Nayak and Metcalf 2017).

Klíčovou úlohu zde sehrála zejména Jennifer Doudna a její tým, kteří významně přispěli k transformaci CRISPR/Cas systému v nástroj genového inženýrství za použití již známé formy systému patogenní bakterie *Streptococcus pyogenes* obsahující endonukleasu Cas9 (Sapranauskas et al. 2011; Wiedenheft et al. 2012; Jinek et al. 2012; Qi et al. 2013). Šlo především o úpravy endonukleasy Cas9, které umožnily použití CRISPR/Cas9 v praxi (Jinek et al. 2012).

1.2. Klasifikace CRISPR/Cas systémů

CRISPR/Cas je pod silným selekčním tlakem v důsledku dlouhodobého evolučního boje s virem, proti nimž působí. To vedlo k značné diverzifikaci struktury CRISPR/Cas lokusů. Zároveň lze vysledovat společné jmenovatele pro všechny tyto systémy – podíl MGEs (Mobile Genetic Elements) na imunitě zprostředkované CRISPR, bohatou duplikaci *cas* genů a modulární uspořádání lokusů, které vzájemně rekombinují s vysokou frekvencí, což vede k vyšší imunitní variabilitě.

Klíčové moduly systému zahrnují geny, jejichž produkty zprostředkovávají spacerovou akvizici do genomu, a vlastní efektorové geny, tedy geny zahrnující zpracování substrátové DNA před zabudováním crRNA, následně rozpoznání specifické sekvence a štěpení. Modul pro adaptaci spacerů je poměrně konzervovaný, obsahuje *cas1* endonukleasu a *cas2* strukturální podjednotku. Naopak efektorový modul má vysoce variabilní strukturu (Koonin et al. 2017).

Na základě principů výstavby efektorových modulů jsou CRISPR/Cas systémy děleny do dvou tříd, ty pak dále na celkem 6 typů, které jsou rozlišovány podle signaturních *cas* genů, které se vyskytují pouze v daném typu (viz Obrázek 1 a 2).

1.2.1. Třída 1 CRISPR/Cas systémů

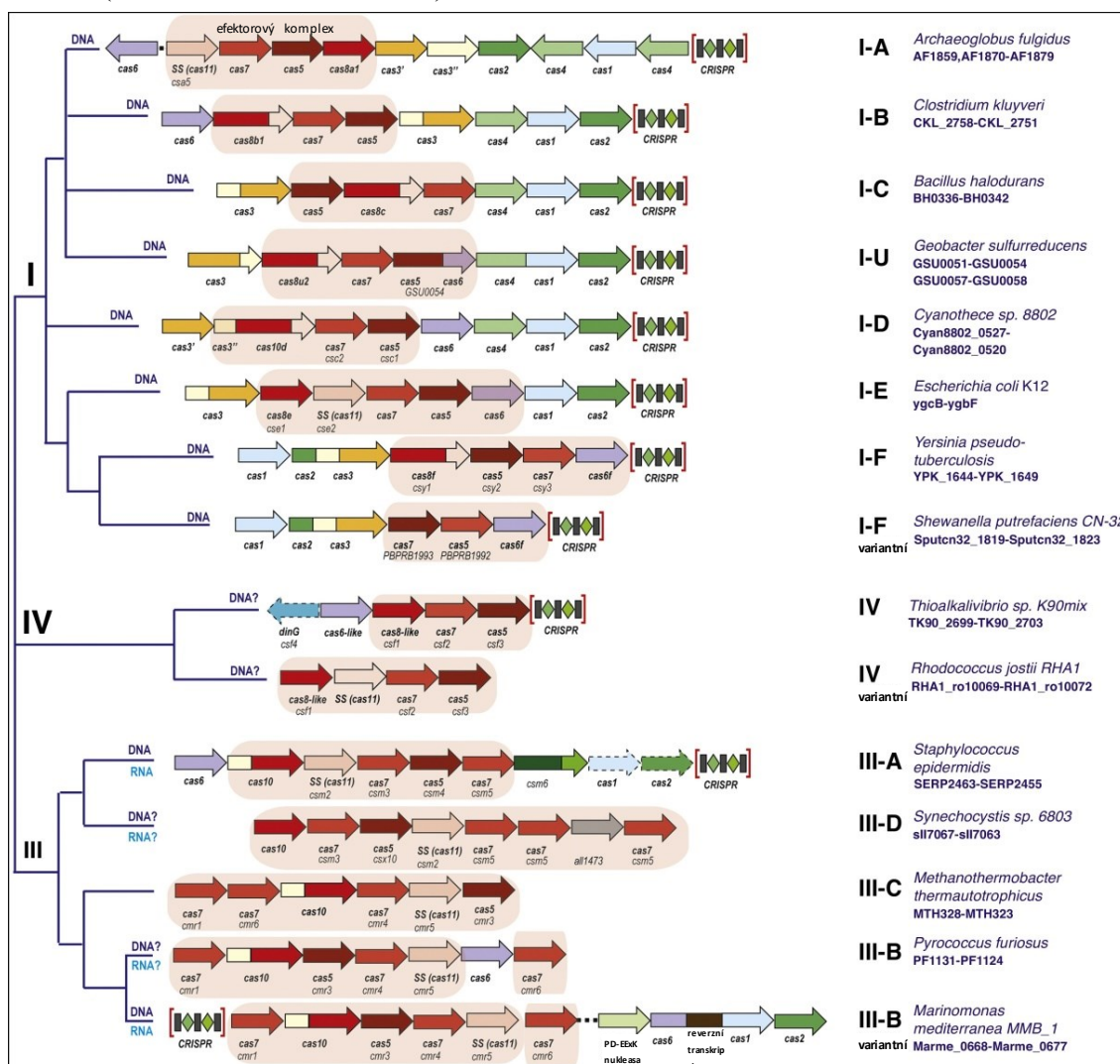
Třída 1 se vyznačuje efektorovou doménou tvořenou multiproteinovými komplexy a dělí se na typy I, III a IV. Typ I je nejrozšířenější a nejdíverzifikovanější. Využívá proteiny z proteinové nadrodiny RAMP (Repeat Associated Mysterious Protein), které pomocí svých RNA rozpoznávajících motivů (RRM – RNA recognition motif) rozpoznají a rozštěpí pre-crRNA uvnitř repetice na menší úseky zralé crRNA. Do proteinové nadrodiny RAMP patří například Cas6, Cas6e a Cas6f efektorové endonukleasy (S. Makarova et al. 2011; Oost et al. 2014). crRNA se poté váže na komplex několika proteinů Cas (Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6e¹) jménem Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense) (Sinkunas et al. 2013). Cascade se váže na cílové sekvence, kde vytvoří R-ohyb (R-loop) – třívláknová struktura DNA:RNA hybridu a komplementárního nekódujícího vlákna DNA v cílové DNA. Poté rekrutuje transaktivující Cas3 nukleasu-helikasu, jež rozplete a následně rozštěpí cílovou DNA ve vytvořeném R-ohybu (Westra et al. 2012). *Cas3* je specifický genem typu I. Dále se dělí na podskupiny A-F a to podle polohy *Cas3* v lokusu vůči ostatním genům a dále podle dalších signaturních *cas* genů, specifických pro jednotlivé kategorie (S. Makarova et al. 2011). Signaturní geny podtypu I-A jsou *cas8a1* a *cas8a2*, z nichž se většinou vyskytuje v lokusu pouze jeden. Cas3 je často rozštěpena na helikasovou doménu Cas3' a endonukleasovou doménu Cas3''. Podtyp I-B se vyznačuje signaturním *cas8b*. Podtyp I-C obsahuje signaturní *cas8c* a většinou postrádá gen pro Cas6 endonukleasu, která je funkčně nahrazena katalyticky aktivní Cas5. Podtyp I-D má jako specifický gen *cas10d*. Pro podtyp I-E jsou specifické *cse1* a *cse2* (systematicky *cas8a* a *cas11*), rovněž postrádá gen *cas4*. Podtyp I-F rovněž neobsahuje *cas4*, jeho gen pro endonukleasu *cas3* je spojen s *cas2* a jeho signaturními geny jsou *csy1* a *csy2* (systematicky *cas8f* a *cas11*) (Makarova and Koonin 2015; Makarova et al. 2015; Makarova et al. 2011).

Typ III je často přítomen u archeí, vzácněji pak u bakterií. Pravděpodobně se z fylogenetického hlediska nachází na bázi vývoje. Je pro něj signaturní gen *cas10*. Podobně jako typ I tvoří efektorový multipodjednotkový proteinový komplex. Na počátku reakce proběhne transkripce pre-crRNA, která je obdobně jako u typu I rozštěpena Cas6 uvnitř repetice ve směru 3' od spacerů. Vytvoří se tak přechodná crRNA, která tvoří ribonukleoproteinový komplex s produkty genů *cmr* (RAMP module Cas – protein obsahující RAMP modul) nebo *csm* (Cas subtype Mtube – podtyp proteinu Cas původem z *M. tuberculosis*). Uvnitř tohoto komplexu probíhá definitivní zrání crRNA formou štěpení ve směru 3' od spacerů. Komplex s navázanými zralými crRNA poté nasedne na komplementární cílovou DNA/RNA a Cas10 endonukleasa ji rozštěpí. Obě endonukleasové aktivity, RNasová i DNasová jsou důležité a *in vivo* vedou ke kotranskripčnímu štěpení cizorodé DNA i jejích produktů (Staals et al. 2013; W. Jiang et al. 2016; Pyenson and Marraffini 2017). Typ III se dále dělí na podtypy A-D, které rozlišujeme podle konstituujících proteinů efektorového komplexu. U podtypu III-A je komplex tvořen proteiny Csm2, 3, 4, 5 a 6 (systematicky a pro maturaci crRNA je nutný produkt signaturního genu *csm2*). Podtyp III-B má komplex z proteinů Cmr2, 3, 4 a 5 a Csx1 (paralog *csm6*), signaturním genem je *cmr5*. Podtyp III-C je specifický inaktivací cyklasové (cyclase-like) domény *cas10* spojenou s významnými rozdíly v sekvencích tohoto genu. III-C i III-B

¹ Názvy genů, resp. jejich produktů u *S. termophilus*, odpovídající homology v CRISPR/Cas systému *E. coli*, kde byl Cascade komplex poprvé pozorován, se nazývají *CasABCDE* proteiny (Brouns et al. 2008).

využívají stejné proteiny efektorového komplexu, Cmr. Rovněž obsahují i stejný signaturní protein – Cmr5. Naproti tomu III-D podtyp se shoduje v proteinech efektorového komplexu s III-A podtypem obsahem proteinů Csm. Signaturním genem je *csx10*, gen podobný *cas5* (Silas et al. 2017; Makarova et al. 2015; Pyenson and Marraffini 2017).

Vzácný typ IV se podobá podtypu III-B, avšak neobsahuje *cas1* ani *cas2* a často se vyskytuje vzdáleně od lokusu CRISPR. Kóduje silně zredukovaný efektorový komplex sestávající z redukované velké podjednotky *csf1*, dva geny RAMP (*csf2*, *csf3*) a někdy rovněž malou podjednotku komplexu Cascade (malý, většinou α -helikální protein) (Makarova et al. 2011). *Csf1* je signaturním genem typu IV. Typ IV se dělí na dva podtypy, přičemž základní obsahuje navíc helikasu Cfs4 z rodiny DinG a variantní podtyp obsahuje malý α -helikální protein. Pravděpodobný mechanismus funkce zahrnuje použití cizorodé RNA přímo jako crRNA (Makarova and Koonin 2015).

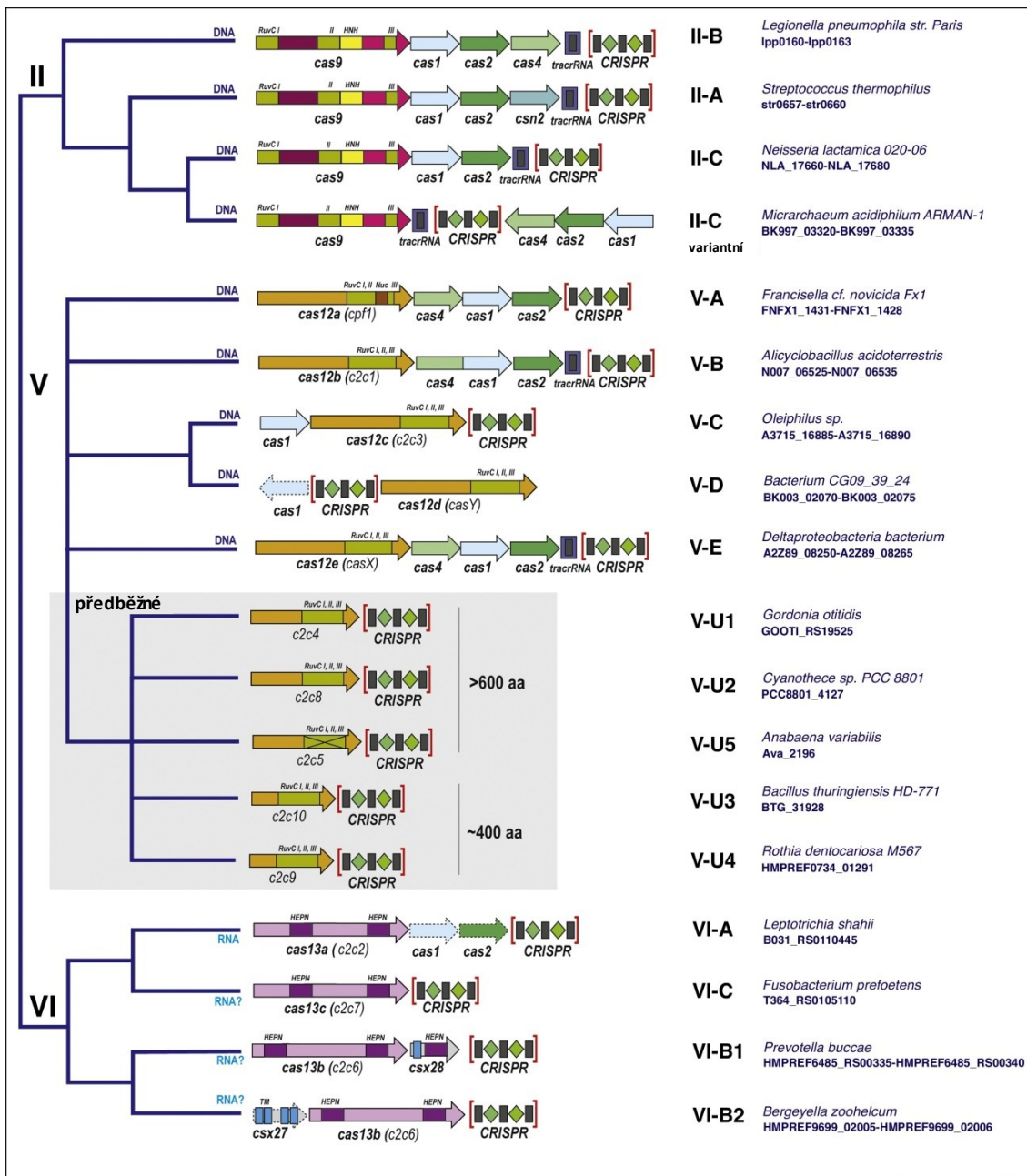


Obrázek 1: Třída 1 CRISPR/Cas systémů

Pro každý podtyp je vyznačena struktura genového lokusu i cílová molekula (DNA/RNA).

Růžově je vyznačen efektorový modul. SS, malá podjednotka Cascade komplexu (small subunit).

Upraveno podle (Koonin, Makarova, and Zhang 2017).



Obrázek 2: Třída 2 CRISPR/Cas systémů

Pro každý podtyp je vyznačena struktura genového lokusu i cílová molekula (DNA/RNA).

TM, předpovězená transmembránová doména.

Upraveno podle (Koonin, Makarova, and Zhang 2017).

1.2.2. Třída 2 CRISPR/Cas systémů

Třída 2 se liší stavbou efektorových modulů, které obsahují vždy jeden rozměrný protein tvořený více doménami. Rozdíl mezi třídou 1 a 2 ve stavbě efektorových komplexů i jejich specifického navádění pomocí RNA ilustruje obrázek 3. Dělí se na typy II, V a VI. Typ II je v současnosti nejvyužívanější v praxi pro svou jednoduchou stavbu. Jeho signaturním genem je *cas9*, který v sobě slučuje funkce interakce s crRNA i endonukleasovou aktivitu. Zpracování a maturace crRNA je zde zajištěna tracrRNA, která tvoří komplex s pre-crRNA na základě komplementarity v repetičích pre-crRNA. Tím umožňuje štěpení pre-crRNA pomocí RNasy III za přítomnosti Cas9. Gen kódující tracrRNA je součástí lokusu CRISPR/Cas typu II, gen kódující RNasu III leží vně lokusu (Jinek et al. 2012). Typ II se dělí na 3 podtypy A-C. Podtyp

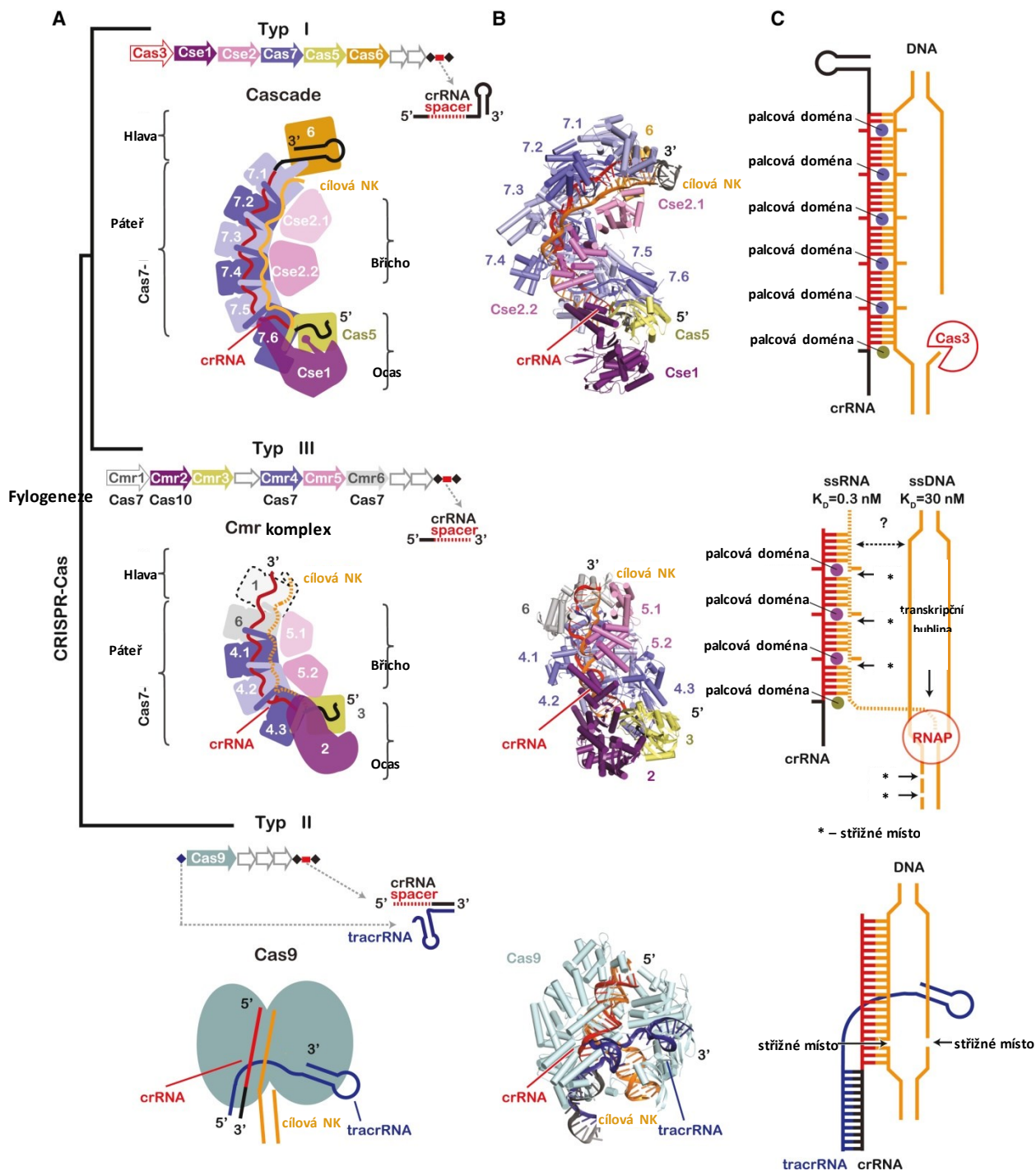
II-A obsahuje navíc k základní struktuře gen *csn2*, který je zároveň jeho signaturním genem. Ten se zřejmě podílí na integraci spacerů, avšak není nezbytný pro jejich rozpoznávání a štěpení. Na rozdíl od něj podtyp II-B obsahuje navíc oproti základní struktuře *cas4*, který se typicky vyskytuje u typu I. Navíc jsou jeho geny *cas1* a *cas2* sekvenčně bližší homologům typu I, než sesterskému podtypu II-A. Typ II-C obsahuje pouze základní strukturu CRISPR/Cas lokusu – obsahuje geny kódující proteiny Cas1, Cas2 a Cas9 a gen pro tracrRNA (Chylinski et al. 2014).

Typ V byl předpovězen původně jako varianta typu II, který však namísto *cas9* obsahoval signaturní gen *cpf1* (CRISPR-associated endonuclease in *Prevotella* and *Francisella* 1). Byla prokázána endonukleasová aktivita Cpf1 naváděné crRNA a to bez potřeby tracrRNA, což nabízí využití v genovém inženýrství. Mezitím byly objeveny další podobné systémy s efektorovými proteiny odlišných vlastností (např. vyžadují navádění dvěma RNA) – C2c1, C2c3, CasX a CasY. Jejich nomenklatura byla sjednocena a nyní jsou označovány standardně ve formě genů *cas* jako *cas12a*, *b*, *c*, *d*, *e*². Typ V se dělí na 5 podtypů A-E podle přítomného efektorového proteinu Cas12, který je zároveň i signaturním proteinem podtypu. V-A, B a E jsou modelové podtypy, které obsahují *cas1*, *cas2* a *cas4*, tedy kromě záměny *cas9* za *cas12* prakticky shodné s podtypem II-B. Podtyp V-A obsahuje efektorový protein Cas12a, II-B obsahuje Cas12b a II-E Cas12e. Podtyp V-C a V-D se výrazně liší, představují maximálně zjednodušený systém, jako jedině zcela postrádají gen *cas2*, jeho efektorový protein je Cas12c u V-C a Cas12d u V-D (Shmakov et al. 2015; Garcia-Doval and Jinek 2017; Lewis and Ke 2017; Makarova et al. 2015; Koonin et al. 2017).

Typ VI je unikátní svou specifitou výhradně vůči RNA. Byl obdobně jako typ V předpovězen na základě objevu efektorového genu *c2c2*, systematickým jménem *cas13a*, který je zároveň signaturním proteinem podtypu VI-A. Typ VI je zároveň schopný štěpení naváděného pouze jednou RNA. Po vazbě na crRNA identifikují a rozštěpí signaturní Cas13 proteiny jednovláknovou strukturu cílové RNA. Unikátní je rovněž schopnost Cas13 po aktivaci štěpit i necílové RNA. Typ VI má redukovanou strukturu, většinou obsahuje pouze CRISPR, adaptorové geny *cas1* a *cas2* a příslušný efektor kódující gen *cas13*. Dělí se na podtypy A-C podle typů proteinů Cas13: VI-A, VI-B a VI-C přináležejí v odpovídajícím pořadí geny pro Cas13a, Cas13b a Cas13c. VI-B se oproti ostatním podtypům odlišuje nepřítomností *cas1* a *2*, naproti tomu obsahuje geny *csx27* a *csx28* (*csx* je označení pro geny *cas*, které dosud nebyl zařazený do žádné genové rodiny) které mají regulační funkci pro *cas13b*³ (Cox et al. 2017; Smargon et al. 2017; Shmakov et al. 2015; Garcia-Doval and Jinek 2017; Koonin et al. 2017).

² Genovým názvům *cpf1*, *c2c1*, *c2c3*, *casX* a *casY* odpovídají nové konzistentní názvy v daném pořadí *cas12a*, *cas12b*, *cas12c*, *cas12d* a *cas12e*.

³ *csx27* jej reprimuje, *csx28* aktivuje, konkrétní způsob dosud není přesně popsán.



Obrázek 3: Zobrazení lokusů i produktů CRISPR/Cas systémů Typů I-III. Typy I a III mají podobnou stavbu spočívající v multiproteinových komplexech, na rozdíl od typu II, závisícím na Cas9 proteinu a navádění druhou RNA (tracrRNA).

a) Schéma architektury lokusů a proteinové struktury produktů CRISPR/Cas systémů, doménová struktura popsána podle tvaru těla mořského koníka je tvořena podjednotkami „hlava“, „páteř“, „břicho“ a „ocas“.

b) Prostorový model efektorových komplexů.

c) Model navádění pomocí RNA. Struktura Cas7, resp. Cmr4 se podobá pravé ruce, je tvořena podjednotkami „dlaň“, „prsty“ a „palec“. Palcová doména proniká do duplexu cílové DNA a crRNA, čímž zajišťuje sekvenčně nezávislou interakci proteinu a NA, cílení sekvence řídí crRNA.

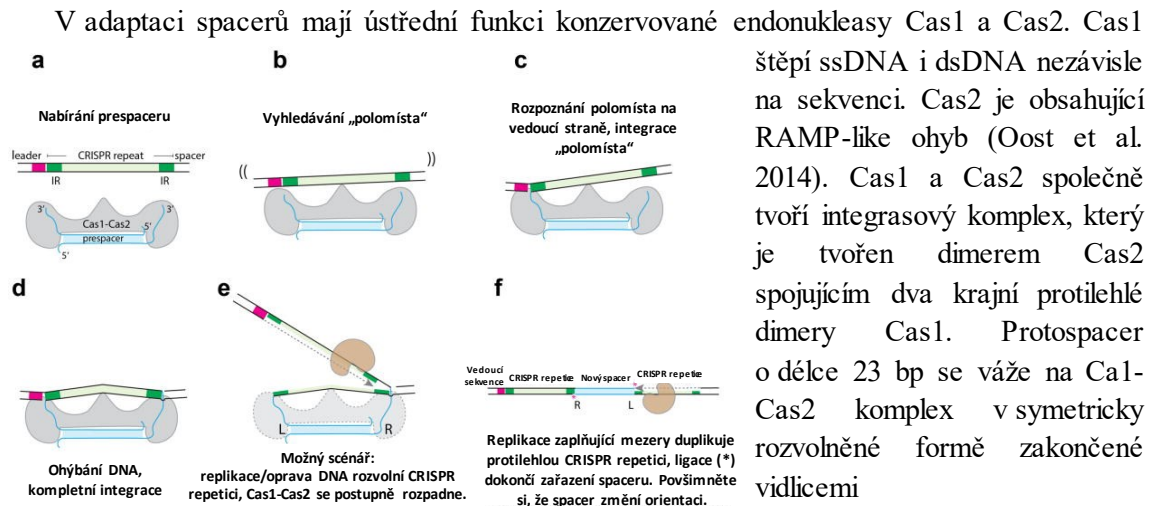
Upraveno podle (Jackson and Wiedenheft 2015).

specificky rozpoznávanou sekvencí – PAM (protospacer⁵ adjacent motif). Kanonická sekvence PAM je 5'- NGG – 3', kde N značí libovolnou bázi (Hsu et al. 2013). Ta se průměrně vyskytuje na každých 8 bp lidského genomu (Cong et al. 2013). Byly však navrženy i varianty Cas9, které měly specifitu pro jiné sekvence, např.: 5'- NGA – 3' (rozeznávané mutantními Cas9). Rozšiřováním spektra rozpoznávaných PAM se tak zvyšuje flexibilita možných cílových sekvencí (Kleinstiver et al. 2015).

2.1. Integrace spacerů

Vkládání nových spacerů obvykle probíhá orientovaně od vedoucí sekvence CRISPR lokusu, díky čemuž je uspořádání spacerů v podstatě i chronologickým záznamem o předchozích úspěšně překonaných infekcích cizorodou DNA. Systém spacerové akvizice je společný všem typům systémů CRISPR (Xiao et al. 2017).

Prvním krokem je rozpoznání a rozštěpení cizorodé DNA, který je následován rozpoznáním fragmentů obsahujících PAM a jejich úpravou na vhodnou přesnou délku. PAM jsou důležitou složkou ochrany proti zaměření vlastní DNA, neboť spacery CRISPR jsou sekvencně identické s cizorodými protospacery. Avšak protože je vyžadována nejprve vazba na PAM, je eliminována hrozba záměny za vlastní DNA, protože PAM obsahují pouze protospacery (Oost et al. 2014).



Obrázek 5: Mechanistický model spacerové integrace pomocí Cas1-Cas2

- a) Cas1-Cas2 navazuje prespacer o délce 30 bp.
- b) Nespecifické hledání „polomísta“.
- c) Cas1 se přednostně váže k polomístu sousedícím s vedoucí sekvencí.
- d) Následná vazba na spacerovou stranu CRISPR repeatu díky ohnutí DNA.
- e) Dokončení postintegračního komplexu pomocí replikace DNA, duplikace CRISPR na straně leader sekvence vůči novému spaceru. Tento krok je stále pouze spekulací.
- f) Replikace komplementárního vlákna dokončuje integraci spaceru. Uraveno podle (Xiao et al. 2017).

štěpí ssDNA i dsDNA nezávisle na sekvenci. Cas2 je obsahující RAMP-like ohyb (Oost et al. 2014). Cas1 a Cas2 společně tvoří integrasový komplex, který je tvořen dimerem Cas2 spojujícím dva krajní protilehlé dimery Cas1. Protospacer o délce 23 bp se váže na Cas1-Cas2 komplex v symetricky rozvolněné formě zakončené vidlicemi

s oligothymidinovými (3'-(T)₁₀ a 5'-(T)₆) přesahy (Wang et al. 2015). Terminální 3'-OH skupiny protospaceru následně nukleofilně napadají DNA CRISPR lokusu. Integrace přednostně probíhá u vedoucí sekvence, kdy je protospacer naváděn vedoucí sekvencí

a invertovanými repetitivy uvnitř CRISPR. Komplex Cas1-Cas2/prespacer nejprve skenuje cíl na specifická místa pro integraci⁶ náhodně, následně se přednostně naváže na CRISPR repetici na straně vedoucí sekvence a nukleofilně napadá repetici sousedící s vedoucí sekvencí za

⁵ Protospacer – sekvence odpovídající CRISPR spaceru, která se nachází v cizorodé DNA, na kterou CRISPR/Cas systém cílí. Tyto protospacery se následně inkorporují do CRISPR lokusu a stávají se spacery (Deltcheva et al. 2011).

⁶ Resp. „polomísta“, na každé místo integrace se může integrační Cas1-Cas2 komplex navázat z obou stran – od vedoucí sekvence, nebo od CRISPR repetice.

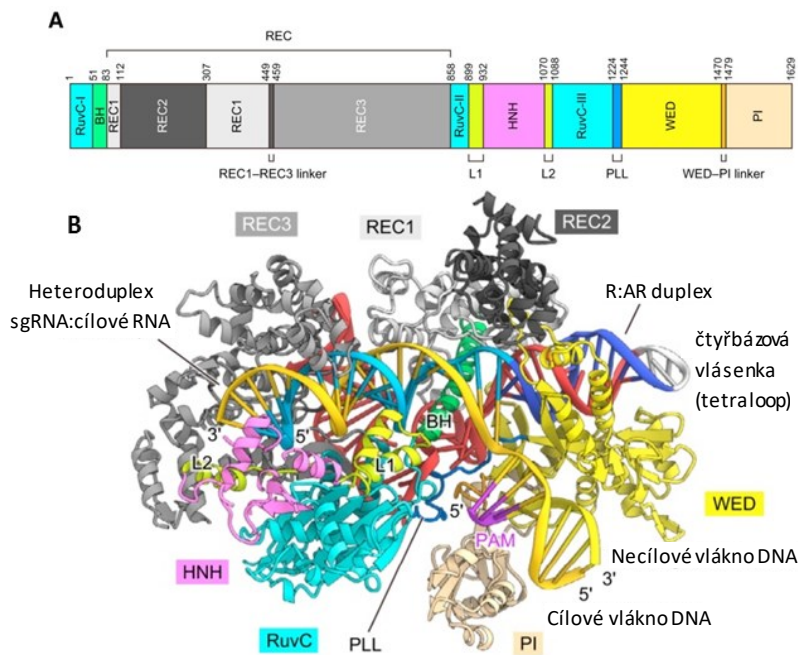
navázání 3'-OH přesahu prespaceru do cílové DNA. Následně je integrace dokončena za napojení spaceru, duplikace CRISPR repetice a rozložení postintegračního komplexu. Tyto kroky jsou již méně objasněny, pravděpodobně zahrnují doplnění chybějících nukleotidů, opravy DNA a ligace volných konců, nicméně základní představu o souslednosti a uspořádání jednotlivých kroků může poskytnout mechanistický model obrázku 5 (Xiao et al. 2017).

2.2. Cas9 endonukleasa

Cas9 je jediný efektorový protein CRISPR/Cas systému typu II. Obsahuje dvě endonukleasové domény, HNH a RuvC, přičemž vůči naváděcí sekvenci crRNA štěpí HNH doména komplementární a RuvC doména nekomplementární vlákno. Rentgenová krystalografie ukázala, že celou Cas9 prostorově tvoří dva laloky – rozpoznávací (REC – recognition) a nukleasový (NUC – nuclease). REC lalok lze dále rozdělit na 3 domény – bridge helix, REC1 a REC2. NUC lalok se skládá z domén RuvC, HNH a PAM-interagující (PAM interacting – PI). Heteroduplex sgRNA:cílové DNA je zasazen v kladně nabitým žlábkem mezi REC a NUC laloky, který přitahuje vlastní záporný náboj NA (Garcia-Doval and Jinek 2017).

REC lalok má jedinečnou strukturu, která je pravděpodobně specifická pouze pro Cas9 (Holm and Rosenström 2010). Komplex sgRNA interaguje s REC1 a bridge helix doménami REC laloku. Pro přesnou interakci je klíčový konzervovaný shluk argininů v bridge domain doméně, která interaguje s „seed regionem“ sgRNA, v případech jeho mutací výrazně klesá štěpící efektivita proteinu. REC2 se do interakcí s sgRNA a následného navádění na cílovou DNA nezapojuje, proto delece této domény zachovává asi 50% původní aktivity Cas9. Z tohoto důvodu mezi CRISPR systémy typu II je REC2 jedna z nejméně konzervativních struktur, přirozeně se například vyskytují formy Cas9 s výrazně kratšími REC2 doménami (Nishimasu et al. 2014).

PI (PAM – interacting) doména NUC laloku je strukturálně unikátní a tedy stejně jako REC lalok specifická pouze pro Cas9. PI rozpoznává PAM motiv na nekomplementárním vlákně cílové DNA. Její úloha je natolik nezastupitelná, že záměna PI domény tvorbou chimérické PI, která rozeznává jinou PAM (např. 5' – NGA – 3') vede k úplné záměně cíle štěpení, a to na sekvence sousedící s novým PAM. Rovněž delece této domény vedla k úplnému umlčení aktivity Cas9 (Nishimasu et al. 2014; Garcia-Doval and Jinek 2017). RuvC doména na rozdíl od PI vykazuje strukturální homologie s nadrodinou retrovirových integras, se kterou sdílí konzervativní RNasový H ohyb. RuvC nukleasy obsahují čtyři aminokyselinové zbytky s katalytickou aktivitou a štěpí Hollidayův spoj Mg^{2+} iontů (Gasiunas et al. 2012; Górecka et al. 2013). RuvC doména obsahuje příslušné katalytické aminokyselinové zbytky v podobné lokalizaci jako RuvC nukleasy. RuvC doména štěpí nekomplementární vlákno cílové DNA (F. Jiang and Doudna 2015; Nishimasu et al. 2014; Garcia-Doval and Jinek 2017). HNH doména sdílí podobnosti s HNH endonukleasami, které obsahují typický ohyb $\beta\beta\alpha$ -kovový atom ($\beta\beta\alpha$ -metal), známý například z endonukleasy VII fága T4 (Biertümpfel et al. 2007). HNH nukleasy se vyznačují třemi katalytickými aminokyselinovými zbytky (Biertümpfel et al. 2007). Pozice dvou ze tří katalytických zbytků aktivního centra HNH domény jsou podobné umístěním v aktivním centru endonukleasy. HNH nukleasová doména je zodpovědná za štěpení cílového úseku komplementárního vlákna DNA (Nishimasu et al. 2014; F. Jiang and Doudna 2015; Garcia-Doval and Jinek 2017).



Obrázek 6: Struktura proteinu Cas9

a) Schematické zobrazení doménového uspořádání proteinu FnCas9.

b) Stuhový model krystalické struktury komplexu FnCas9-sgRNA-DNA.

Upraveno podle (Hirano et al. 2016).

komplexů Cas9:RNA. Navázání PAM vede k částečné destabilizaci a rozvinutí přilehlé sekvence. Do rozvolněné struktury invaduje naváděcí (guide) RNA za tvorby DNA:RNA heteroduplexu, který vzniká od PAM a postupně rozplétá krok za krokem. Z důvodu iniciace rozvolňování dvoušroubovice cílové DNA je klíčový „seed region“, v němž vede jakýkoliv mismatch v komplementaritě k ukončení tvorby rozpoznávacího komplexu DNA:RNA (Sternberg et al. 2014). Po správném navázání jsou aktivovány obě nukleasové domény, které vytvoří tupě zakončený ds zlom, obvykle 3 nt od 3'- konce protospaceru. Následně zůstává Cas9 navázaný na naštěpeném DNA, pokud není recyklován jinými buněčnými faktory. To z něj činí *de facto* jednorázově použitelný protein (Sternberg et al. 2014; Oost et al. 2014).

Komplex Cas9-RNA nejprve rozpozná cizorodé DNA po náhodné kolizi, kdy se přechodně naváže. Upřednostněna je vazba na sekvenci PAM, ostatní nesespecifické vazby jsou podstatně méně stabilní. PAM je rozpoznávána dvěma smyčkami obsahujícími tryptofan na C-terminální doméně NUC laloku (Oost et al. 2014). Pouze po navázání na PAM začne Cas9 následně skenovat sousedící DNA na komplementaritu s naváděcí RNA. Nutnost primárního

rozpoznání PAM zároveň vylučuje možnost intermolekulových vazeb

2.2.1. Regulace exprese pomocí dCas9

dCas9 je katalyticky „mrtvý“ mutovaný protein, který není schopen štěpit DNA díky mutacím typu *loss of function* v obou nukleasových doménách. Přesto je stále schopen přesného cílení a v cílových sekvencích zůstává pevně navázaný. Svoji přítomností tak stericky blokuje transkripci příslušné sekvence, na které je navázaný, čímž efektivně způsobuje umlčování příslušných genů. Toto umlčení může být indukibilní, pokud je daný systém do manipulovaného organismu vložen ve vektoru pod vlivem indukibilního promotoru, např. aTc (anhydrotetracyklin) indukibilní, který se aktivuje přidáním aTc do média. Zároveň je reverzibilní, protože nenarušuje strukturu cílové DNA a po snížení exprese CRISPR/dCas9 se hladina dCas9 postupně přirozeně sníží, čímž se vrátí i exprese umlčeného genu (Zhao et al. 2017; Dai et al. 2018; Qi et al. 2013).

Možnosti využití dCas9 řízeného umlčování genů závisí na navázaných indukibilních složkách systému, ve kterém je použit, určuje tak podmínky, za nichž je gen umlčován (Dai et al. 2018).

2.3. Opravy ds zlomů DNA

U většiny eukaryotních organismů jsou ds zlomy po štěpení Cas9 opravovány homologní rekombinací (homology directed recombination – HDR) nebo nehomologní rekombinací (non-homologous end joining – NHEJ). V případě dostupnosti homologního templátu pro opravu (úsek dsDNA nebo oligonukleotid) je upřednostněna homologní rekombinace, avšak případné mutace obsažené v templátu mohou být začleněny do genomu (Mali et al. 2013; Charpentier and Marraffini 2014). Nová dráha oprav ds zlomů nazvaná mikrohomologní rekombinace (microhomology-mediated end joining – MMEJ), byla objevena mj. u *P. falciparum* a později u *T. vaginalis*. Tato dráha využívá mikrohomologní úseky na odloučených koncích o délkách 5-25 nt jako lešení, na něž následně nasedají proteiny opravného komplexu (Kirkman et al. 2014).

Prokaryota neschopná samostatné rekombinace vyžadují kotransformaci Cas9 systému s naváděcím templátem, který prostřednictvím HDR reparuje ds zlom (Song and Stieger 2017). Tento templát se používá pro řízenou mutagenézi, neboť nese na požadovaných místech změny vedoucí k mutacím v cílovém genu (viz výše) (W. Jiang et al. 2013).

3. Využití CRISPR/Cas9 systému typu II pro genové manipulace u parazitických prvků

3.1. Specifika použití systému u parazitických prvků

Parazitické prvky se vyznačují jistými komplikacemi při výzkumu – ať už z důvodu jejich náročnosti na životní podmínky dané často neobvyklým životním prostředím či složitými životními cykly, nebo odvozenosti jejich genomů komplikující samotný průběh genových manipulací (Ren and Gupta 2017).

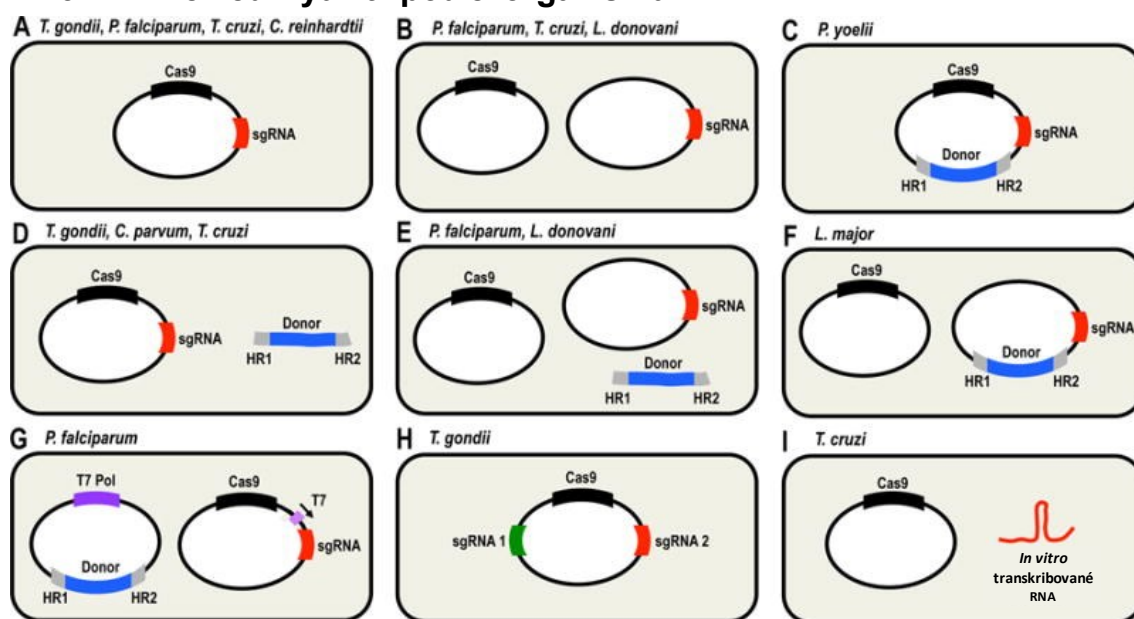
Například u rodu *Plasmodium* je komplikujícím faktorem haploidní krevní stádium, kde inaktivace genu často vede ke smrti nebo extrémně snížené životaschopnosti. Tento problém je možné obejít různými formami podmíněné genové inaktivace, nebo umlčování, který zachovává bazální nutnou hladinu exprese daného genu, avšak metodika je komplikovanější a výsledky jsou méně přesné. Výrazně snížené fitness organismů s umlčováním nezbytných genů rovněž vede k extrémnímu zpomalení růstu, což komplikuje jejich na selekčních médiích (Koning-Ward et al. 2015). Problematické prodloužení generační doby se projevuje mj. i u *T. cruzi* (Burle-Caldas et al. 2015). U *T. gondii* dochází k častému zařazování vneseného plasmidu do genomu pomocí NHEJ, kterou zajišťuje Ku80. Mutantní kmen $\Delta Ku80$, u něž je funkce Ku80, způsobující náhodné integrace plasmidů prostřednictvím NHEJ, narušena, obchází tento mechanismus, a drtivá většina mutací pak pochází z HDR. Zároveň však narušení funkce údržby chromatinu proteinem Ku80 vede ke zvýšené citlivosti na stres a zvýšená je i frekvence ds zlomů (Julien and Dominique 2011).

Mnoho protistů se rovněž výrazně odlišuje svým codon usage bias⁷ od ostatních organismů, (Gustafsson et al. 2004). Omezení vlivu codon usage bias je možné dosáhnout overexpresí tRNA, které jsou u daného druhu méně zastoupeny, ať už zvýšením aktivity promotoru řídicího transkripci sníženě syntetizovaných tRNA, nebo inzercí plasmidu kódujícího konkrétní tRNA, který hradí jejich nedostatek za přirozeného stavu a umožňuje tak syntézu proteinů se zcela odlišnou kodónovou skladbou. Například „RIG plasmid“ obsahuje geny pro tRNA tří

⁷ Codon usage bias je stav nerovnoměrného využívání synonymních kodónů pro jednu aminokyselinu. Konkrétní bias je typický pro jednotlivé fylogenetické skupiny (Athey et al. 2017).

aminokyselin⁸ (Baca and Hol 2000). Náročnější postup přizpůsobuje požadovaný exprimovaný protein codon bias transformovaného organismu. Optimalizací využití kodónů se výrazně zvýší exprese proteinu, aniž by vyvstávala nutnost kompenzace prostřednictvím transfekce dalších kompenzačních konstruktů jako v případě plasmidů s tRNA. Kodónová optimalizace může zvýšit expresi proteinu o řád až dva, v extrémních případech může dojít ke zvýšení exprese až 10^4 - 10^5 krát (Gustafsson et al. 2004).

3.2. Přehled využití podle organismů



Obrázek 7: Schematické zobrazení metod používaných pro adaptaci systémů CRISPR/Cas vůči různým parazitickým prvokům.

A) Jednovektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA. B) Dvojvektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA. C) Jednovektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA, navíc s lineárním DNA donorem. D) Jednovektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA, navíc s lineárním DNA donorem. E) Dvojvektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA, navíc s lineárním DNA donorem. F) Dvojvektorová strategie pro koexpresi Cas9 a sgRNA ve dvou různých vektorech, kdy vektor pro sgRNA obsahuje i DNA donor. G) Dvojvektorová strategie pro koexpresi T7 RNA polymerasy (T7 Pol, vlevo), Cas9 a sgRNA (vpravo). DNA donor se nachází ve vektoru nesoucím T7 Pol a transkripce sgRNA je řízena T7 promotorem. H) Jednovektorová strategie pro koexpresi Cas9 a dvou různých sgRNA. I) Jednovektorová strategie pro expresi Cas9 a následnou inserci sgRNA připravenou *in vitro*. Nad každým schématem je název organismu, u něž byla strategie použita. HR1 a HR2 jsou homologní regiony přítomné v kazetě DNA donoru pro navození homologní rekombinace.

Upraveno podle (Lander et al. 2016).

3.2.1. *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium spp. je jako intracelulární parazit nesnadným organismem pro tvorbu transgenických linií, zároveň postrádá mechanismus pro NHEJ. Jediný způsob pro integraci transgenů je tak prostřednictvím HDR. První práce zabývající se *Cryptosporidium parvum* byla publikována v roce 2015. Byl vytvořen plasmid nesoucí kazetu sgRNA pod U6 promotorem a Cas9 s NLS a značkou pod promotorem a 5'-UTR pro aldolasu pocházející z *Cryptosporidium*. Funkce systému byla otestována na enzymově neaktivní nanoluciferase⁹ (Dead Nluc), která obsahovala stop-kodón vložený v kódující sekvenci. Pro štěpení DeadNluc pomocí Cas9 byl

⁸ Kodóny AGA a AGG pro arginin (R), AUA pro isoleucin (I) a GGA pro glycin (G).

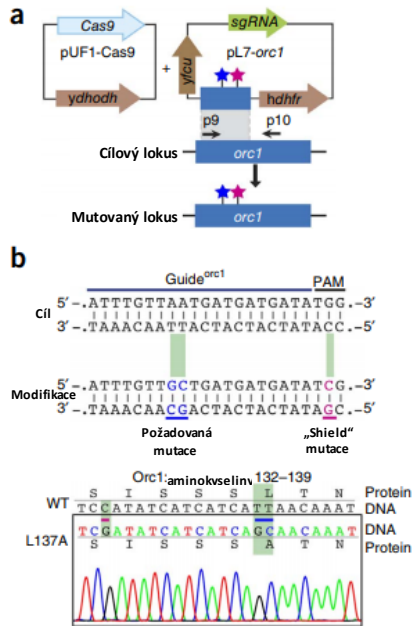
⁹ Nanoluciferasa je nově vyvinutý luciferasový gen pocházející z hlubokomořské krevety *Oplophorus gracilirostris*, která produkuje silnější bioluminiscenci než luciferasa ze světlušek (Vinayak et al. 2015).

dodán 125 bp dlouhý ds templát pro HDR, který navrátil funkci proteinu díky odstranění aberantního stop-kodónu záměnou tripletu TAA za TAT. Zároveň změna v cílové sekvenci Cas9 brání opětovnému štěpení. Došlo tak k obnovení aktivity luciferasy. Rovněž byla provedena inaktivace thymidin kinasy, která byla za pomoci dvou sgRNA (jedna na začátku ORF, druhá na jeho konci) deletována a nahrazena insertovaným genem pro luciferasu s neomycinovou rezistencí pro značení (Vinayak et al. 2015).

Ze stejné laboratoře vzešel další článek v roce 2017, který standardizuje tvorbu a udržení transgenních forem *Cryptosporidium*, a to za pomoci plasmidu obsahujícího sgRNA, opravnou kazetu obsahující templát s Nluc-Neo (luciferasa a resistance na neomycin) markerem. Opravná kazeta je ohraničena sekvencemi homologními k požadovaným místům pro homologní rekombinaci (Pawlowic et al. 2017).

3.2.2. *Plasmodium spp.*

První práce týkající se *Plasmodium spp.*, zde konkrétně *P. falciparum*, byla publikována v roce 2014. Zde použila Ghorbalova skupina dva vektory, první vektor nesoucí *cas9* (pUF1-Cas9), druhý sgRNA a DNA templát pro HDR opravy obsahující markerový gen pro rezistenci *hdhfr* (human dihydrofolate reductase) pod promotorem U6 (pL7), vzhledem k faktu, že *P. falciparum* stejně jako *Cryptosporidium spp.* postrádá kanonickou dráhu pro NHEJ (Ghorbal et al. 2014). Tento dvojvektorový systém byl kotransfekován do buněk parazitů a zde narušil funkci předem vnesených episomálních *egfp* (enhanced *gfp*) a *kahrp* (knob-associated histidine-rich protein). Autoři se pokusili vektor pL7 vnést jak v cirkulární, tak i v lineární podobě (poprvé u *P. falciparum*). Obě formy byly podobně efektivní při transformaci, ovšem výhodou lineární formy je replikací udržované vysoké číslo kopií plasmidu, což vyřazuje nutnost negativní selekce proti parazitům, které v sobě plasmid udržovali (Pfander et al. 2011). Parazité s inaktivovanými geny *egfp* a *kahrp* byli vyselektováni na rezistenci udělenou vloženým genem *hdhfr* proti antifolátu WR99210. Pro otestování možností jednonukleotidových mutací bez použití markeru byla rovněž vytvořena „shield“ mutace pro gen *orc1* (origin recognition complex subunit 1 – podjednotka 1 komplexu rozpoznávajícího replikační počátek). Do templátové DNA byla zavedena požadovaná mutace společně s „shield“ mutací, která je umístěna v úseku rozpoznávaném Cas9 a brání rozpoznání sekvence Cas9, čímž efektivně chrání gen od dalšího štěpení (Ghorbal et al. 2014).



Obrázek 8: Bezmarkerová řízená nukleotidová editace u *P. falciparum*.

a) Schéma zobrazující dvouplasmidovou strategii pro nukleotidovou záměnu, zde v genu *orc1*. Protein Cas9 je exprimován v episomu pUF1-Cas9 pod selekcí na rezistenci k DSM1, která je přinášena genem *ydhodh*. Episom pL7-*orc1* je selektován pomocí genu *hdhfr* pro rezistenci k WR99210 a nese naváděcí *sgRNA_{orc1}* i templátovou DNA pro řízenou mutaci (modrý obdélník). DNA templát nese jak požadovanou mutaci (modrá hvězdička), tak i „shield“ mutaci (purpurová hvězdička).

b) Nahore: cílová 20 bp dlouhá naváděcí sekvence rozpoznaná *sgRNA_{orc1}:Cas9* a PAM. Modifikovaný lokus obsahuje zvýrazněné úseky požadované mutace (modře) v podobě substituce L137A a „shield“ mutace (purpurově). Za účelem substituce L137A v *orc1* může sloužit jako „shield“ i požadovaná mutace, neboť se nachází v naváděcí sekvenci. Druhá „shield“ mutace byla dodána pro zvýšení spolehlivosti. Dole: chromatogramy zobrazující analýzu sekvencí u linií 3D7^{WT} a 3D7^{*orc1*-L137A}. Požadované mutace nukleotidů a korespondující záměny aminokyselin jsou zvýrazněny.

Upraveno podle (Ghorbal et al. 2014).

Na tuto práci navazuje tzv. „suicide-rescue“ systém pro bezmarkerovou inaktivaci a vnášení genů u krevních stádií *P. falciparum*, používající dva vektory (Lu et al. 2016). Bezmarkerové systémy nevnašejí do cílové linie markerový gen pro rezistenci, čímž mj. umožňují vícenásobné použití stejného selekčního markeru pro několik po sobě následujících nezávislých manipulací. „Suicide-rescue“ systém se skládá z jednoho vektoru nesoucího *cas9* i *sgRNA* s jedním selekčním markerem *bsd* (blasticidin S deaminasa) pod endogenními promotory („suicide“ plasmid) a druhého, který obsahuje pouze donorovou DNA pro HDR, gen *AmpR* pro rezistenci k ampicilinu a replikační počátek („rescue“). Suicide plasmid neobsahuje *ori* (origin of replication – replikační počátek) a není schopen replikace, proto se po několika generacích sám vyřadí z populace poté, co splnil svůj účel. Buňky jsou vyselektovány na základě rezistence udělené suicide plasmidem na blasticidin. Tento systém byl použit k inaktivaci neesenciálního genu pro histon-lysin N-metyltransferasu (*pfset2*) a k inserci fúzního genu *gfp-ruc* (green fluorescent protein-*renilla* transferase) do lokusu *Pf47*. Buňky byly vyselektovány na základě rezistence udělené suicide plasmidem. Ověření inaktivace *pfset2* proběhlo pomocí PCR a sekvenace, zatímco u inserce *gfp-ruc* proběhlo pomocí fluorescenční mikroskopie. Tento systém obchází komplikace přinášené vícenásobnými genovými manipulacemi s *P. falciparum* pro omezený počet selekčních markerů a inkompatibilitám některých látek, na nichž selekce probíhá. Zároveň starší systémy omezují velikost vkládaného templátu pro HDR přítomností dalších prvků na plasmidu (Ghorbal et al. 2014). Tento systém podle svých tvůrců vyžaduje méně selekčních markerů a umožňuje inserce rozsáhlejších genů.

Obdobný bezmarkerový systém u krevních stádií *P. falciparum* vytvořila Mogollonova skupina (Mogollon et al. 2016). Cílem bylo rovněž vytvořit transgenní řadu parazitů, která bude nést reportérový gen bez genů pro rezistenci, což usnadní další manipulace s genomem parazitů. Byl vytvořen dvouplasmidový systém, zde však jeden plasmid nesl *cas9* se selekčním markerem *bsd*, druhý obsahoval sgRNA a templátové DNA s fúzním selekčním markerem, složeným z pozitivně selekčního markeru *hdhfr* a z negativně selekčního markeru *vfcu* (yeast cytosine deaminase/uridyl fosforibosyl transferase). Po transfekci obou plasmidů po 3 týdnech souběžné pozitivní selekce na obě rezistence zůstane zachována pouze transformovaná frakce. Poté jsou kultury ponechány 2-4 dny bez selektujících látek. Nakonec proběhne kolo negativní selekce, která odstraní z populace plasmid nesoucí sgRNA a DNA templát. Pomocí tohoto postupu byl do parazitů vložen reportérový gen GFP, a to pod regulaci tří různých endogenních promotorů – *cam* (calmodulin), *gapdh* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa) a *hsp70* (70 kilodalton heat shock protein). Všechny transgenní linie exprimovaly GFP, což se projevilo fluorescencí, rovněž vykazaly i stejnou populační kinetiku i stejnou citlivost k selekčním látkám v porovnání s původní linií, avšak mezi transgenními liniemi se GFP@*hsp70* vyznačovala nejsilnější fluorescencí.

V roce 2017 byl navržen další protokol pro tvorbu bezmarkerové transgenní linie *P. falciparum* (Kneupfer et al. 2017). Byl vytvořen dvouplasmidový systém, jeden plasmid nesoucí *Cas9* a fúzní selekční marker složený z pozitivně selekčního markeru *hdhfr* a z negativně selekčního markeru *vfcu*. Druhý plasmid je lineární rescue plasmid nesoucí genové kazety pro dimerní DiCre-rekombinasi pod promotory *hsp86* a *bip*. Neobsahuje však selekční marker, čímž jsou umožněny bezmarkerové zásahy. Tento plasmid se integruje do chromozomu, zatímco *Cas9* nesoucí plasmid je po realizaci své funkce vyřazen z kultury analogicky jako v Mogollonově experimentu (Mogollon et al. 2016). DiCre rekombinasi byla insertována do dvou lokusů, *p230p* and *pfs47*, kde může působit místně specifické rekombinace za účasti sekvencí ohraničených *loxP* sekvencemi (Collins et al. 2013).

Byla rovněž vypracována nová metoda pro inzerci selekčních markerových genů pro rezistenci již bez použití plasmidů či klonování templátů pro HDR u *P. falciparum* (Crawford et al. 2017). Jediný plasmid obsahuje nukleárně lokalizovaný *Cas9* označovaný HIS tagem (polyhistidinové značení), fúzovaný s MBP (maltose binding protein) pro zvýšení rozpustnosti. Plasmid je obsažen v expresním vektoru, z něž je izolován jeho produkt, *Cas9*, pro *in vitro* transfekci. Pro cílení *Cas9* byla použita syntetická dsRNA (dual guide RNA) tvořená crRNA a tracrRNA. Templát pro HDR je rovněž syntetický, 200 nt dlouhý ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide). Směs sgRNA a *Cas9* byla transfekována do krvinek infikovaných *P. falciparum* ve stádiu prstenu. Pro otestování konceptu byl použit gen pro pumpu Na⁺ iontů PfATP4 (ATPasa 4). ssODN templát obsahoval dvounukleotidovou změnu vedoucí po opravě k substituci L350H (kromě dalších silent mutací). Pro zabránění opakovaného štěpení byly dodány do ssODN čtyři tiché mutace v blízkosti PAM motivu, čímž došlo ke změně rozpoznávané sekvence po indukované mutaci a tak bylo dosaženo inhibice dalšího rozpoznávání. Mutace přinesla cílovým parazitům rezistenci k dihydroisochinolonovému antimalariku SJ733, jak ukázala esej inhibice růstu.

V roce 2018 vznikla práce popisující tvorbu *Cas9* transgenní *P. yoelii*, parazita hlodavců (Qian et al. 2018). Zavádí do genomu *cas9*, čímž usnadňuje tvorbu dalších CRISPR/*Cas9* konstruktů v této linii, která tak bude vyžadovat méně komponent. Zejména díky značné uvolněné velikosti *cas9* (4,2 kb) tak budou nové konstrukty moci obsahovat delší sekvence. Byl použit jeden plasmid (pYC), který obsahuje dvě kopie *cas9* s NLS, sgRNA, donorový templát DNA i selekčně markerový gen *hdhfr*. První *cas9* sekvence, značena Flag tagem, je efektoem a způsobuje ds zlom vedoucí k integraci druhého *cas9*, značeného Myc tagem, do genomu. Insece *Cas9* byla zaměřena do genu pro serine repeat antigen 1 (SERA1), k jeho integraci byly přeneseny 5'-UTR a 3'-UTR genu SERA1 do polohy v pYC plasmidu přesně sousedící s *Cas9*.

Expresí integrovaného Cas9 byla následně ověřena pomocí anti-Myc protilátek na imunofluorescenční eseji. Funkce endogenní Cas9 byla otestována na dalších jednotlivých genech - *cdpk3* a *ctrp*. Pro oba tyto geny byly zkonstruovány pYC plasmidy obsahující příslušná sgRNA. Pomocí PCR genotypizace bylo potvrzeno úspěšné narušení funkce obou genů, stvrzující úspěch metody.

3.2.3. *Toxoplasma gondii*

Klíčovým pokrokem v možnostech výzkumu *T.gondii* bylo vytvoření kmene $\Delta Ku80$, který má inaktivovaný gen Ku80 pro NHEJ, což vede k místně specifickým integracím insertovaných sekvencí díky HDR (Fox et al. 2009; Burle-Caldas et al. 2015).

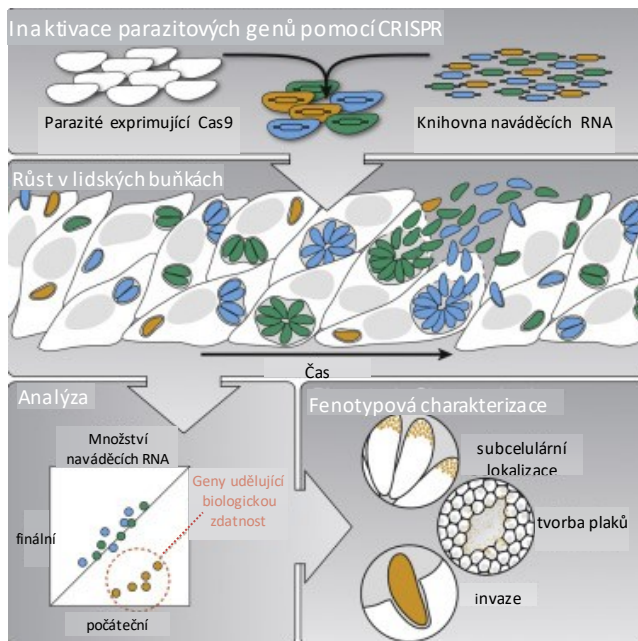
Historicky první práce o genové manipulaci patogenního eukaryotního organismu pomocí systému CRISPR/Cas9 vznikla o *T. gondii*. Byl zde vytvořen plasmid, nesoucí fúzní konstrukt proteinu Cas9 s jadernou lokalizační sekvencí (NLS), spojený se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), CAS9-NLS-GFP, pod promotorem SAG1, a sgRNA pod promotorem U6 z *T. gondii*. SgRNA cílila na exon 5 genu UPRT (uracil fosforibosyl transferasa), přímo sousedící s PAM v 5' směru, který má sekvenci NGG. Narušení funkce genu vedlo k rezistenci na fluorodeoxyribosu (FUDR). Za účelem změření frekvence výskytu CRISPR/Cas9 řízené genové inaktivace byl vnesen sgRNA CRISPR plasmid elektroporací. Díky vizualizaci pomocí fluorescence GFP byli 24 h po elektroporaci nalezeni transfektanti (cca 20-30 % buněk). 48 h po elektroporaci pak byla zhodnocena frekvence výskytu genové inaktivace pomocí plakových esejí na citlivost k FUDR. Asi 10 % transfektantů vykazovalo rezistenci na FUDR. Byly nalezeny delece a inserce v regionu UPRT. Za kontrolu místní specifity štěpení byla na UPRT cílící sgRNA nahrazena sgRNA specifická pro lokus ROP18 (rhoptry protein 18), které přinesly buňky pozitivní na fluorescenci zprostředkovanou GFP, avšak postrádající rezistenci k FUDR. Pro další ověření specifity cílení byly následně vytvořeny dvě sgRNA specifické pro UPRT obsahující různé dvounukleotidové odchylky od přesné UPRT-specifické sgRNA. V případě nepřesných sgRNA byl normální podíl transfektantů, ovšem z nich bylo 200-3000krát méně FUDR rezistentních buněk ve srovnání s přesným UPRT-specifickým sgRNA. Oprava vzniklých zlomů proběhla prostřednictvím homologní rekombinace řízené a značené pomocí kotransfekce templátu obsahující gen *dhfr*, který byl ohraničený úseky homologními sekvencí bezprostředně sousedící se sekvencí, na niž cílila sgRNA. Tento způsob reparace zlomů prokázal efektivitu systému i v kmenech s aktivním genem Ku80 (Shen et al. 2014).

Ve stejném roce byla publikována další studie, která zkoumala opravné mechanismy DNA působící při tvorbě mutantních buněčných linií. Byl použit jednoplasmidový systém nesoucí sgRNA a fúzní protein Cas9-FLAG-NLS¹⁰, oba pod regulací promotorů U6, resp. TUB1 pocházejících z *T. gondii*. Těmito konstrukty byly následně transformovány buňky za účelem vyvolání HDR nebo NHEJ po štěpení cílové sekvence nejprve v lokusu SAG1 (surface protein 1). Byly použity dvě buněčné linie parazitů – RH a $\Delta Ku80$. Bez selekčního tlaku bylo dosaženo inaktivace u cca 20 % buněk RH linie, zatímco u $\Delta Ku80$ linie byla úspěšnost desetkrát nižší. Toto vedlo k závěru, že pro úspěšnou opravu po porušení genové struktury je klíčová NHEJ, jehož mechanismus je v $\Delta Ku80$ linii porušen. Následně byl pro kvantifikaci frekvence HDR v linii $\Delta Ku80$ zaměřen lokus PKG (protein kinase G), jehož produkt je inhibován látkou C2 (trisubstituted pyrrole Compound 2). Při selekci na rezistenci k C2 jsou životaschopné pouze buňky s mutací v lokusu vedoucí ke změně reakčního centra genového produktu. Do části buněk DNA byl vložen 90 bp dlouhý templát pro rekombinaci homologní ke štěpené sekvenci. Tento templát nesl mutaci vedoucí k substituci T761Q v reakčním centru genového produktu PKG. Po

¹⁰ FLAG je oktapeptidová značka primární struktury DYKDDDDK (D = aspartát, Y = tyrosin, K = lysin) (Hopp et al. 1988).

jednom lytickém cyklu byla provedena plaková esej za přítomnosti nebo absence C2. Pouze buňky, které byly transfekovány plasmidem i teplotou, projevily rezistenci k C2, což značilo proběhlou homologní rekombinaci. V linii *AKu80* byla detekována HDR až v 15-30 % populace. (Sidik et al. 2014).

CRISPR/Cas9 systém byl následně použit Saeijovou skupinou pro první celogenomový screen u skupiny Apicomplexa, kterým odhalila pomocí inaktivací jejich esenciální geny (Sidik et al. 2016). Buňky byly nejprve infikovány plasmidem exprimujícím Cas9 s chloramfenikol acetyltransferasou (CAT) jako selekčním markerem. Část plasmidů místo markerového proteinu nesla gen pro „návnadovou“ nefunkční sgRNA, neboť absence sgRNA při expresi Cas9 znemožňovala izolaci transformovaných buněk kvůli toxicitě Cas9. Schopnost transformovaného Cas9 narušit geny v buněčné linii byla otestována na genu postradatelném, ale snadno v kultuře udržitelném – SAG1 (Kim and Boothroyd 1995). Po třech dnech byla pozorována ztráta exprese SAG1 u 70 % Cas9-pozitivních buněk a narušení genu bylo pozorováno až v 97 %. Následně byla vytvořena knihovna sgRNA, obsahující 10 naváděcích RNA cílících na každý jednotlivý z 8158 předpovězených genů kódujících proteiny. Tato byla zaklonována do expresního vektoru. U buněk, které přežily transformaci, byl tento vektor integrován do genomu v 40 %, což umožnilo kontrolu přítomnosti i kvantity sgRNA pomocí next-generation sekvenování. Po třetím lytickém cyklu po transfekci knihovny sgRNA byly geny vyhodnoceny z hlediska jejich příspěvku k biologické zdatnosti (resp. poklesu v případě jejich inaktivace) pomocí „gene set enrichment analysis“¹¹, jak ilustruje obrázek 9. Ta ukázala, že esenciální metabolické geny a geny pro tvorbu komponent apikoplastu jsou relativně málo



Obrázek 9: Schéma celogenomového screeningu na příspěvek k biologické zdatnosti protein kódujících genů *T. gondii*. Parazité jsou transfekovány plasmidem nesoucím Cas9 a knihovnou sgRNA cílících na různé protein kódující geny. Po kultivaci v lidských fibroblastech je provedena analýza množství daných sgRNA (a tedy korespondující množství živých buněk) v populaci, z níž je vyhodnocen vliv jednotlivých genů na biologickou zdatnost. Následně jsou skupiny genů s vysokým vlivem na fitness dále charakterizovány z hlediska funkce a neseného fenotypu.

Upraveno podle (Sidik et al. 2016)

zastoupené, naopak geny specifické pro sekreční organely – mikronemy, roptrie a densní granula – byly výrazně více zastoupené, což může značit jejich nahraditelnost. Z cca 200 genů výrazně se podílejících na fitness bylo dále zkoumáno 28 genů, které postrádaly známou funkci a jsou přítomny pouze u Apicomplex. Byly nazvány „indispensable conserved apicomplexan proteins“ (ICAPs). Po označení proteinů za účelem lokalizace byly nalezeny v mnoha kompartmentech – mikronemy (ICAP1, 12), mitochondrie (ICAP2, 3, 6, 8, 9, 11, 14 a 15), jádérko (ICAP7) a konoid (ICAP16) (Sidik et al. 2016).

Ve stejném roce vznikla práce užívající CRISPR/Cas9 systém k analýze nekanonických CDPK (kalcium-dependentních proteinkinas) (Long et al. 2016). V *T. gondii* se nachází celkem 14 genů kódujících

¹¹ Analýza vyhodnocující data o expresi na úrovni genových tříd. Ty jsou dále tříděny z hlediska exprese v rámci menších a více relevantních skupin (Subramanian et al. 2005).

CDPK. Z nich se 8 nekanonických odlišuje několika rysy navíc oproti kanonickému doménovému uspořádání, například N-koncovými extensemi, variabilním počtem motivů „EF-hand“ a dalšími doménami (např. pleckstrin-homologní doména). Celkem bylo vytvořeno 24 mutantních řad na základě dvou genetických pozadí, linií RH Δ ku80 a Pru Δ ku80. Pro konkrétní CDPK byly zkonstruovány jednoplasmidové systémy obsahující Cas9 a krátké oligonukleotidy specifické pro konkrétní CDPK jako sgRNA, přičemž pro každý plasmid obsahoval 2 sgRNA, jeden cílí na začátek ORF, druhý na jeho konec. Transformované kmeny byly následně podrobeny plakové, kompetiční a replikační eseji *in vitro* a byla otestována virulence prostřednictvím infekce myši jednotlivými inaktivovanými liniemi. Kromě již známých esenciálních CDPK1 a CDPK7 byl odhalen jen omezený vliv nekanonických CDPK na fitness, neboť po jejich inaktivaci nedochází k významně snížené tvorbě plaků v hostitelských fibroblastech ani tvorbě tkáňových cyst v nakažených zvířatech, s výjimkou mírného snížení v případě inaktivace CDPK6. Ostatní CDPK neměly znatelný vliv na fitness *in vitro* ani na myších modelech (Long et al. 2016).

Možnost přenosu již existujícího konstruktů použitého pro genové modifikace u *T. gondii* a jeho použití pro příbuzný organismus, zde *Neospora candidum*, prokázala další studie ze Saeijovy laboratoře (Arranz-Solis et al. 2018). Pomocí pU6 plasmidu obsahujícího Cas9 s NLS pod TgTUB1 promotorem a sgRNA pod U6 promotorem *T. gondii*. Byly použity dva plasmidy s různými sgRNA – 20 nt dlouhé sekvence z genů *GFP* a *NcGRA7* (v případě *NcGRA7* dvě sgRNA z obou konců ORF). Těmito plasmidy byly následně transformovány kultury *N. candidum*. Po 7 dnech byla pozorována disrupce genu *GFP* způsobená ztrátou fluorescence. Delece *NcGRA7* proběhla prostřednictvím Cas9 indukovaných zlomů na obou koncích jeho ORF. Jako templát pro opravu ds zlomů byl použit plasmid *LoxP-mCherry-DHFR*¹². 24 h po transformaci byla zahájena selekce pyrimethaminem, po níž přežily pouze transformanty. PCR následně potvrdilo přítomnost rozsáhlého insertu v *GRA7* lokusu. Tento pokus tedy úspěšně potvrdil možnost použití CRISPR/Cas9 systému vytvořeného pro jeden druh ke genové manipulaci druhu příbuzného (Arranz-Solis et al. 2018).

CRISPR/Cas9 byl rovněž využit k vytvoření standardizovaného protokolu pro C-terminální značkování proteinů pomocí BirA, nespecifickou biotinyl protein ligasu pocházející z *E. coli*. Metoda spočívá v tvorbě fúzního GOI (Gene of Interest) a BirA (Long et al. 2018). V sekvenci do 200 bp po stop kodónu GOI je nutné nalézt 20nt sekvenci pro sgRNA následovanou PAM motivem. Tuto sgRNA je následně jako součást primeru pomocí PCR do plasmidu obsahujícího Cas9. „Tagging“ (značkovácí) plasmid má strukturu pLinker-BirA-HXGPRT-LoxP. Cas9 i tagging plasmidem jsou transformovány buňky parazitů. Po naštěpení cílového místa Cas9 je jako templát opravy ds zlomu použit tagging plasmid. Takto dojde k zařazení BirA pomocí loxP-Cre řízené rekombinace (viz výše) do genomu za GOI. Potvrzení integrace BirA kazety v transformantech zajišťuje PCR, resp. western blot. Pro selekci a potvrzení funkčního fúzního proteinu jsou následně značkové produkty GOI změřeny hmotnostní spektrometrií, kde je optimálně nalezen kmen exprimující C-terminálně biotinylovaný produkt GOI. BirA nespecificky biotinyluje v dosahu značení menším než 10 nm, celkově vytvoří „otisk“ proximálních proteinů v okruhu cca 30 nm (Long et al. 2018).

3.2.4. *Trichomonas vaginalis*

V práci Janssena a jeho skupiny z roku 2018 bylo dosaženo CRISPRem řízené úpravy genu pro nanoluciferasu a inaktivace dvou endogenních genů spojených s inzercí genu pro rezistenci

¹² Plasmid obsahující rezistenční marker DHFR spojený s fluorescenčním proteinem mCherry, jenž je na obou koncích napojen na loxP, které umožňují vynětí celého úseku za přítomnosti Cre rekombinasy.

(Janssen et al. 2018). Byly zkonstruovány dva plasmidy, expresní vektor pMN (pMasterNeo) nesoucí fúzní gen Cas9 s FKBP-DD (FKBP destabilization domain) N-terminálně umístěnou doménou. Tato doména navozuje v nepřítomnosti stabilizujícího ligandu Shield-1 degradaci příslušného proteinu. FKBP-DD zmírňuje toxicitu Cas9 (Peng et al. 2014) výrazným snížením, ne však úplnou eliminací jeho exprese. Cas9 rovněž nese NLS a HA tag. Druhý plasmid, rovněž pMN, obsahoval syntetický konstrukt obsahující 20 bp dlouhý „seed region“ genu pro snRNA U6 a 76 bp dlouhou konzervovanou sekvenci pro cílení Cas9 a interakce s gRNA, sousedící ve směru 5' s 360 bp dlouhým 5' UTR regionem genu U6 a ve směru 3' s 37 bp dlouhým 3' UTR regionem U6. První nukleotid „seed regionu“ U6 je vždy adenosin. Do parazitů byla elektroporací nebo nukleofekcí vložena nanoluciferasa označená HA značkou, která obsahovala předčasný stop-kodón. gRNA pro *nluc* (nanoluciferasa) byla vložena přímo do plasmidu obsahující fúzní konstrukt *fkbp-Cas9* s genem pro rezistenci k puromycinu, tudíž byl tento systém pouze jednoplasmidový. Plasmidy byly do parazitů nukleofekovány na rozdíl od standardní transformace elektroporací, což vedlo ke zvýšení účinnosti transfekce až dvacetkrát oproti elektroporaci. Pro CRISPR-řízenou mutaci v nanoluciferase byl použit 125 bp dlouhý syntetický oligonukleotid jako templát HDR. Templát zavedl dvě bodové mutace, které odstranily předčasný stop-kodón záměnou za tyrosin a proximální glycin substituovaly za alanin, což vedlo k obnově funkce nanoluciferasy. Systém byl dále použit k inaktivaci pomocí CRISPRem řízené HDR endogenního, ovšem neesenciálního genu – *ferredoxinu-1* (*fd-1*). Byla použita gRNA zaměřující 5'-konec genu. Jako templát byla použita 2800 bp dlouhá sekvence obsahující gen pro rezistenci k neomycinu (*NeoR*) ohraničený 1000 bp 5'a 3' UTR regiony *ferredoxinu-1*. Populace parazitů po pozitivní selekci na rezistenci obsahovala nefunkční gen *fd-1*. Ověření inaktivace proběhlo pomocí PCR a imunoblotu, kde *fd-1*-specifické protilátky neprokázaly přítomnost genového produktu ferredoxinu. Další zkouškou pro CRISPR/Cas9 systém byla inaktivace genu o jedné kopii *mif*¹³. Inaktivace *mif* proběhla analogicky pomocí HDR s kazetou obsahující gen *NeoR* ohraničený 1000 bp 5'a 3' UTR regiony ohraničující *mif*. Selekcí na rezistenci opět ponechala pouze organismy obsahující inaktivovaný gen, přičemž inaktivace byla ověřena přítomností *NeoR* sekvence v PCR produktu a zároveň nepřítomností *mif* proteinu během imunoblotu, kdy *mif*-specifické protilátky neprokázaly jeho přítomnost (Janssen et al. 2018).

3.2.5. *Trypanosoma* spp.

Poprvé byla provedena studie CRISPR/Cas9 systému u *T. cruzi* v roce 2015. CRISPR/Cas9 systém byl použit k vytvoření buněčné linie s konstitutivní expresí *egfp* a *nls-cas9* (Peng et al. 2014) pomocí dvou separátních pTrex plasmidů pod endogenním ribosomálním promotorem P35S, každý nesoucí požadovaný inzerovaný gen spolu s genem pro rezistenci, *egfp* spolu s neomycintransferasou (*npt*) a *cas9* s genem pro rezistenci k blasticidinu (Bla R). Po pozitivní selekci kmenů na rezistenci k neomycinu, resp. blasticidinu, zůstanou v populaci pouze transformovaní paraziti. Při transfekci sgRNA specifické pro *egfp* se efektivně snížila exprese *egfp* cca v 50-60 % buněk. Použití více druhů sgRNA ani zvýšení jeho koncentrace toho procenta nijak významně nezvedlo. Po rozlišení populací na ty, které na sgRNA odpovídají disrupcí *egfp* a na neodpovídající, a jejich následné srovnávací analýze pomocí ELISA, byly zjištěny výrazně nižší hladiny Cas9 u neodpovídajících buněk. To naznačuje, že nižší účinnost genové inaktivace mohla být zapříčiněna nižšími či nestabilními hladinami proteinu Cas9 v části populací. U *T. cruzi* byla rovněž pozorována alternativní dráha oprav ds zlomů MMEJ

¹³ Gen homologní k lidskému MIF (macrophage migration inhibitory factor), Ovlivňuje hostitelovu fyziologii, zvyšuje proliferaci buněk prostaty, jejich zánětlivou reakci a zvyšuje riziko vzniku a rozvoje rakoviny prostaty (Twu et al. 2014).

v nepřítomnosti DNA templátu, neboť trypanosomy postrádají NHEJ dráhu. Během sekvenování genu *egfp* z populace neodpovídající na dodání sgrRNA byla pozorována konstantní delece 33 bp v místě zacílení sgrRNA. Delece se přesně neshodovaly v poloze, ovšem všechny se nacházely mezi dvěma 10 bp dlouhými homologními sekvencemi lemujícími sestřihové místo. Tento vzor odpovídá delecím po opravě ds zlomů MMEJ.

Inaktivace endogenních genů byla vyzkoušena na příkladu genu o mnoha kopiích, α -tubulinu, přičemž následkem dodání příslušného zaměřujícího sgrRNA byly deformované onkotické buňky s mnoha bičíky. Byla rovněž pozorována toxicita Cas9 projevující se sníženou rychlostí růstu při stabilní expresi Cas9.

V práci Noelle Lander byl systém CRISPR/Cas9 dále použit k endogennímu C-terminálnímu značení produktů genů *TcFCaBP* (Flagellar calcium-binding protein) a *TcVPI* (vacuolar proton pyrophosphatase) o známé lokalizaci, jejichž produkty jsou lokalizovány v bičíku, resp. v acidokalcisomech, a *TcMCU* (mitochondrial calcium uniporter) a *TcIP3R* (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor), jejichž lokalizace byla dosud neznámá či nejistá (Lander et al. 2016). Do plasmidů pTREX byly vloženy sgrRNA a *cas9*. Plasmid byl kotransfekován s HDR templátovou DNA, pro 3xHA značku sekvenci amplifikovanou z vektoru pMOTag-HX1-4H, pro značku 3xc-Myc amplifikát z vektoru pMOTag23M. Tyto amplifikáty rovněž obsahují selekční markerové geny pro rezistenci proti hygromycinu, resp. puromycinu. Po pozitivní selekci rezistentních buněk byly pomocí western blotu rozlišeny cílové označené proteiny v porovnání s wt proteiny. Následně byly tyto značky použity k lokalizaci proteinů *TcFCaBP* a *TcVPI* v buňce pomocí imunofluorescence. *TcFCaBP*-3xHA a *TcFCaBP*-3xc-Myc kolokalizovaly s protilátkami proti wt *TcFCaBP* v bičíku, stejně jako značené varianty *TcVPI* kolokalizovaly s protilátkami s wt variantou v acidokalcisomu. Značovaný *TcMCU* kolokalizoval s napětově ovládaným aniontovým kanálem (VDAC – voltage-dependent anion channel) na vnitřní membráně mitochondrie, jak bylo předpokládáno na základě lokalizací jeho ortologů u savců (De Stefani et al. 2011) či *T. brucei* (Huang, Vercesi, and Docampo 2013). Značený *TcIP3R* je lokalizován v acidokalcisomech, jak již bylo pozorováno u *T. brucei* (Huang et al. 2013).

Na toto téma navázala práce generalizující protokol pro endogenní C-terminální značení proteinů u *T. cruzi* na základě předchozích experimentů (Lander et al. 2017). Využívá jednoplasmidové strategie s plasmidem pTREX-n nesoucím Cas9 a gen pro rezistenci k neomycinu. Do něj je po amplifikaci zaklonována i zvolená sgrRNA. Dále je amplifikován požadovaný DNA templát pro homologní rekombinaci, jenž nese jak selekční marker na rezistenci k puromycinu či hygromycinu, tak i značení, buď 3xHA (hemagglutinin), nebo 3xc-Myc. Plasmid a kazeta s templátovou DNA jsou poté transfekovány do epimastigotů, kteří projdou 5 týdnů kultivace pod selekcí na antibiotikovou rezistenci nesenou plasmidem i DNA templátem. Značení požadovaného proteinu u rezistentních klonů je nakonec ověřeno pomocí PCR a Western blotu (Lander et al. 2017).

Dalším zapojením genu *TcMCU* v mitochondriálním iontovém transportu se zabývala další studie stejné laboratoře. Pozoroval důsledky inaktivací *TcMCU* a jeho paraloga *TcMCUb* na buněčnou fyziologii (Chiurillo et al. 2017). *TcMCU* je součástí mitochondriálního komplexu pro uniport Ca^{2+} iontů tvořící kanálovou část aparátu. O *TcMCUb* se spekuluje, že představuje hlavní negativní regulační prvek Ca^{2+} uniportu, to však dosud není potvrzeno dostatkem důkazů. Inaktivace těchto dvou genů byla provedena u epimastigotů a metacyklických trypanomastigotů *T. cruzi*. V případě *TcMCU* systém sestával z pTREX plasmidu nesoucího Cas9 s NLS a značený fúzí s *gfp* a chimerického sgrRNA a z pGEM-T easy plasmidu nesoucího donorovou DNA pro HDR tvořenou genem *bsd* lemovaným 3' a 5' UTR *TcMCU* navozujícími homologii. *TcMCUb*

byl inaktivován pomocí analogického pTREX plasmidu s *Cas9* a sgRNA a pGEM plasmidu s donorovým DNA obsahujícím *bsd*. Kmeny obsahující inaktivované geny byly vyselektovány na rezistenci k blastidinu. Byly testovány na schopnosti vychytávání Ca^{2+} pomocí jeho vizualizace calcium green-5N probe v digitoninem permeabilizovaných epimastigotech. V *TcMCU-KO* a *TcMCUb-KO* liniích nebyly mitochondrie schopny Ca^{2+} vychytat. Byl měřen důsledek této poruchy iontové homeostázy na membránový potenciál mitochondrií ($\Delta\psi_m$) permeabilizovaných epimastigotů, avšak nebyla prokázána jeho významná změna. *TcMCU* je neesenciální pro stádia epimastigota v komplexním médiu, při metacyklogenezi (diferenciaci) i při invazi a replikaci trypomastigotů v hostiteli, avšak *TcMCU-KO* zpomaluje exponenciální růst epimastigotů. *TcMCUb* je nutný pro optimální růst epimastigotů v komplexním médiu, při metacyklogenezi i pro invazi trypomastigotů do hostitele.

Nejnovější práce se pokouší o modifikace předchozích systémů ke zvýšení efektivity oproti dvěma dosud užívaným systémům CRISPR/Cas9, z nichž první vytvářela nulové mutanty v esenciálních genech za účelem pozorování postupné ztráty aktivity genového produktu, přestože trpěl nízkou efektivitou a toxickým efektem Cas9 projevujícím se ve zpomaleném růstu kultur. Druhá obecná metoda využívala na plasmidech nesené sgRNA a fúzní *cas9:gfp*, která rychle provede cílené změny, a to bez toxických účinků. Vyžaduje však komplikované sestavení sgRNA konstruktů, vkládání do vektorů a následná selekce buněk vektor obsahujících. Nově vytvořený systém kombinuje výhody obou přístupů – Cas9 značený *gfp*, která umožňuje rychlou selekci transformovaných buněk díky cytometrické metodě průtokového fluorescenčního sortingu a transfekce sgRNA transkribovaných *in vitro*, které takto umožňují odezvu systému takřka okamžitě po transfekci, a dokonce i současnou transfekci několika druhů sgRNA najednou (Romagnoli et al. 2018). K ověření metody byl použit pTREX-n plasmid obsahující *Cas9* značený *gfp* a transfekovaná sgRNA cílí na *gfp*, v dalších krocích na endogenní GP72, α -tubulin and β -tubulin. Ds zlomy byly opraveny pomocí pro *T. cruzi* typickou MMEJ, generující delece, které vedly k inaktivaci genů. *Gfp* byl inaktivován již druhý den v 80 % parazitů, frekvence inaktivace dosáhla 95 % po 5 dnech. Endogenní geny se projevovaly již dříve pozorovanými fenotypovými změnami typickými pro porušení funkce příslušných genů – GP72-KO odpadnutím bičíku od buňky (Cooper et al. 1993), α -tubulin-KO ztrátou přirozeného tvaru buněk a jejich přeměnou v mnohojaderné, mnohobíčíkaté buňky (Peng et al. 2014) a β -tubulin-KO podobnými, ale mírnějšími projevy jako při ztrátě funkce α -tubulinu. Genetický základ fenotypových změn byl potvrzen pomocí PCR a sekvenace.

4. Závěr

CRISPR/Cas9 systémy za svou dosud krátkou existenci rychle překonaly starší systémy pro genové manipulace stran jednoduchosti i versatility použití a staly se poměrně standardním nástrojem výzkumu nejen parazitických protistů.

Přestože má použití CRISPR/Cas9 systémů svá omezení, zejména u parazitických prvoků, v současnosti již existují optimalizované protokoly pro některé druhy s ohledem např. na jejich citlivost k toxicitě Cas9, kodónovém bias a metody oprav ds zlomů. Ačkoliv je používán u protistů pouze od roku 2014 (objev CRISPR/Cas9 2012), byl použit v mnoha pracích pro vnášení exogenní DNA, funkční analýzu genů jejich inaktivaci či umlčování, regulaci genové exprese, C-terminální značení proteinů či celogenomové screeniny. Jeho využití bude nadále jak ve funkční genomice základního výzkumu, tak ve výzkumu aplikovaném, kde může přispět k vývoji nových řad chemoterapeutik či vakcín, které by snížily parazitickými protisty zapříčiněnou míru morbidity i letality.

5. Použitá literatura

- Arranz-Solís, David, Javier Regidor-Cerrillo, Sebastian Lourido, Luis Miguel Ortega-Mora, and Jeroen P J Saeij. 2018. “Toxoplasma CRISPR/Cas9 Constructs Are Functional for Gene Disruption in *Neospora Caninum*.” *International Journal for Parasitology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.002>.
- Athey, John, Aikaterini Alexaki, Ekaterina Osipova, Alexandre Rostovtsev, Luis V Santana-Quintero, Upendra Katneni, Vahan Simonyan, and Chava Kimchi-Sarfaty. 2017. “A New and Updated Resource for Codon Usage Tables.” *BMC Bioinformatics* 18: 391.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1793-7>.
- Baca, Arthur M, and Wim G J Hol. 2000. “Overcoming Codon Bias: A Method for High-Level Overexpression of Plasmodium and Other AT-Rich Parasite Genes in *Escherichia Coli*.” *International Journal for Parasitology* 30 (2): 113–18. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00019-9).
- Biertümpfel, Christian, Wei Yang, and Dietrich Suck. 2007. “Crystal Structure of T4 Endonuclease VII Resolving a Holliday Junction.” *Nature* 449 (7162): 616–20.
<https://doi.org/10.1038/nature06152>.
- Bolotin, Alexander, Benoit Quinquis, Alexei Sorokin, and S Dusko Ehrlich. 2005. “Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin.” *Microbiology* 151 (8): 2551–61.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- Brouns, Stan J J, Matthijs M Jore, Magnus Lundgren, Edze R Westra, Rik J H Slijkhuis, Ambrosius P L Snijders, Mark J Dickman, Kira S Makarova, Eugene V Koonin, and John van der Oost. 2008. “Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes.” *Science* 321 (5891): 960–64. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.
- Burle-Caldas, Gabriela de Assis, Viviane Grazielle-Silva, Leticia Adejani Laibida, Wanderson Duarte DaRocha, and Santuza Maria Ribeiro Teixeira. 2015. “Expanding the Tool Box for Genetic Manipulation of *Trypanosoma Cruzi*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 203 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.10.004>.
- Charpentier, Emmanuelle, and Luciano A Marraffini. 2014. “Harnessing CRISPR-Cas9 Immunity for Genetic Engineering.” *Current Opinion in Microbiology* 19: 114–19.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.07.001>.
- Chiurillo, Miguel A, Noelia Lander, Mayara S Bertolini, Melissa Storey, Anibal E Vercesi, and Roberto Docampo. 2017. “Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth and Infectivity of *Trypanosoma Cruzi*.” *MBio* 8 (3): e00574-17.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00574-17>.
- Chylinski, Krzysztof, Kira S Makarova, Emmanuelle Charpentier, and Eugene V Koonin. 2014. “Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems.” *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>.
- Collins, Christine R, Sujaan Das, Eleanor H Wong, Nicole Andenmatten, Robert Stallmach, Fiona Hackett, Jean-Paul Herman, Sylke Müller, Markus Meissner, and Michael J Blackman. 2013. “Robust Inducible Cre Recombinase Activity in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* Enables Efficient Gene Deletion within a Single Asexual Erythrocytic Growth Cycle.” *Molecular Microbiology* 88 (4): 687–701.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12206>.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D

- Hsu, et al. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819–23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- Cooper, R, A R de Jesus, and G A Cross. 1993. "Deletion of an Immunodominant Trypanosoma Cruzi Surface Glycoprotein Disrupts Flagellum-Cell Adhesion." *The Journal of Cell Biology* 122 (1): 149–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.149>.
- Cox, David B T, Jonathan S Gootenberg, Omar O Abudayyeh, Brian Franklin, Max J Kellner, Julia Joung, and Feng Zhang. 2017. "RNA Editing with CRISPR-Cas13." *Science* 358 (6366): 1019–27. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>.
- Crawford, Emily D, Jenai Quan, Jeremy A Horst, Daniel Ebert, Wesley Wu, and Joseph L DeRisi. 2017. "Plasmid-Free CRISPR/Cas9 Genome Editing in Plasmodium Falciparum Confirms Mutations Conferring Resistance to the Dihydroisoquinolone Clinical Candidate SJ733." *Plos One* 12 (5): e0178163–e0178163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178163>.
- Dai, Xiaofeng, Xiao Chen, Qiuwu Fang, Jia Li, and Zhonghu Bai. 2018. "Inducible CRISPR Genome-Editing Tool: Classifications and Future Trends." *Critical Reviews in Biotechnology* 38 (4): 573–86. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1378999>.
- Deltcheva, Elitza, Krzysztof Chylinski, Cynthia M Sharma, Karine Gonzales, Yanjie Chao, Zaid A Pirzada, Maria R Eckert, Jörg Vogel, and Emmanuelle Charpentier. 2011. "CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III." *Nature* 471 (7340): 602–7. <https://doi.org/10.1038/nature09886>.
- Deveau, Hélène, Rodolphe Barrangou, Josiane E Garneau, Jessica Labonté, Christophe Fremaux, Patrick Boyaval, Dennis A Romero, Philippe Horvath, and Sylvain Moineau. 2008. "Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in Streptococcus Thermophilus." *Journal of Bacteriology* 190 (4): 1390–1400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>.
- Fox, Barbara A, Jessica G Ristuccia, Jason P Gigley, and David J Bzik. 2009. "Efficient Gene Replacements in Toxoplasma Gondii Strains Deficient for Nonhomologous End Joining." *Eukaryotic Cell* 8 (4): 520–29. <https://doi.org/10.1128/EC.00357-08>.
- Garcia-Doval, Carmela, and Martin Jinek. 2017. "Molecular Architectures and Mechanisms of Class 2 CRISPR-Associated Nucleases." *Current Opinion in Structural Biology* 47: 157–66. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.015>.
- Gasiunas, Giedrius, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2012. "Cas9-crRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39): E2579–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Ghorbal, Mehdi, Molly Gorman, Cameron Ross Macpherson, Rafael Miyazawa Martins, Artur Scherf, and Jose-Juan Lopez-Rubio. 2014. "Genome Editing in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Biotechnology* 32 (8): 819–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2925>.
- Gilbert, Luke A, Matthew H Larson, Leonardo Morsut, Zairan Liu, Gloria A Brar, Sandra E Torres, Noam Stern-Ginossar, et al. 2013. "CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes." *Cell* 154 (2): 442–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>.
- Górecka, Karolina M, Weronika Komorowska, and Marcin Nowotny. 2013. "Crystal Structure of RuvC Resolvase in Complex with Holliday Junction Substrate." *Nucleic Acids*

- Research* 41 (21): 9945–55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt769>.
- Groenen, P M, A E Bunschoten, D van Soolingen, and J D van Embden. 1993. “Nature of DNA Polymorphism in the Direct Repeat Cluster of Mycobacterium Tuberculosis; Application for Strain Differentiation by a Novel Typing Method.” *Molecular Microbiology* 10 (5): 1057–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934856>.
- Gustafsson, Claes, Sridhar Govindarajan, and Jeremy Minshull. 2004. “Codon Bias and Heterologous Protein Expression.” *Trends in Biotechnology* 22 (7): 346–53. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>.
- Holm, Liisa, and Päivi Rosenström. 2010. “Dali Server: Conservation Mapping in 3D.” *Nucleic Acids Research* 38 (Web Server issue): W545–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq366>.
- Hopp, Thomas P, Kathryn S Prickett, Virginia L Price, Randell T Libby, Carl J March, Douglas Pat Cerretti, David L Urdal, and Paul J Conlon. 1988. “A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification.” *Nature Biotechnology* 6 (10): 1204–10. <https://doi.org/10.1038/nbt1088-1204>.
- Hsu, Patrick D, David A Scott, Joshua A Weinstein, F Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yinqing Li, et al. 2013. “DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases.” *Nature Biotechnology* 31 (9): 827–32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Huang, Guozhong, Paula J Bartlett, Andrew P Thomas, Silvia N J Moreno, and Roberto Docampo. 2013. “Acidocalcisomes of Trypanosoma Brucei Have an Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor That Is Required for Growth and Infectivity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (5): 1887–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216955110>.
- Huang, Guozhong, Anibal E Vercesi, and Roberto Docampo. 2013. “Essential Regulation of Cell Bioenergetics in Trypanosoma Brucei by the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *Nature Communications* 4: 2865. <https://doi.org/10.1038/ncomms3865>.
- Ishino, Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, and A Nakata. 1987. “Nucleotide Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product.” *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213968/>.
- Jackson, Ryan N, and Blake Wiedenheft. 2015. “A Conserved Structural Chassis for Mounting Versatile CRISPR RNA-Guided Immune Responses.” *Molecular Cell* 58 (5): 722–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.023>.
- Janssen, Brian D, Yi-Pei Chen, Brenda M Molgora, Shuqi E Wang, Augusto Simoes-Barbosa, and Patricia J Johnson. 2018. “CRISPR/Cas9-Mediated Gene Modification and Gene Knock out in the Human-Infective Parasite Trichomonas Vaginalis.” *Scientific Reports* 8 (1): 270. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18442-3>.
- Jiang, Fuguo, and Jennifer A Doudna. 2015. “The Structural Biology of CRISPR-Cas Systems.” *Current Opinion in Structural Biology* 30: 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>.
- Jiang, Wenyan, David Bikard, David Cox, Feng Zhang, and Luciano A Marraffini. 2013. “RNA-Guided Editing of Bacterial Genomes Using CRISPR-Cas Systems.” *Nature Biotechnology* 31 (3): 233–39. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>.
- Jiang, Wenyan, Poulami Samai, and Luciano A. Marraffini. 2016. “Degradation of Phage Transcripts by CRISPR-Associated RNases Enables Type III CRISPR-Cas Immunity.” *Cell* 164 (4): 710–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.053>.

- Jiang, Yu, Biao Chen, Chunlan Duan, Bingbing Sun, Junjie Yang, and Sheng Yang. 2015. "Multigene Editing in the Escherichia Coli Genome via the CRISPR-Cas9 System." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (7): 2506–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Julien, Limenitakis, and Soldati-Favre Dominique. 2011. "Functional Genetics in Apicomplexa: Potentials and Limits." *FEBS Letters* 585 (11): 1579–88. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.002>.
- Kim, K, and J.c. Boothroyd. 1995. "Regular Article: Toxoplasma Gondii: Stable Complementation of Sag1 (P30) Mutants Using SAG1 Transfection and Fluorescence-Activated Cell Sorting." *Experimental Parasitology* 80: 46–53. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1006>.
- Kirkman, Laura A, Elizabeth A Lawrence, and Kirk W Deitsch. 2014. "Malaria Parasites Utilize Both Homologous Recombination and Alternative End Joining Pathways to Maintain Genome Integrity." *Nucleic Acids Research* 42 (1): 370–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt881>.
- Kleinstiver, Benjamin P, Michelle S Prew, Shengdar Q Tsai, Ved Topkar, Nhu T Nguyen, Zongli Zheng, Andrew P W Gonzales, et al. 2015. "Engineered CRISPR-Cas9 Nucleases with Altered PAM Specificities." *Nature* 523 (7561): 481–85. <https://doi.org/10.1038/nature14592>.
- Knuepfer, Ellen, Marta Napiorkowska, Christiaan van Ooij, and Anthony A Holder. 2017. "Generating Conditional Gene Knockouts in Plasmodium – a Toolkit to Produce Stable DiCre Recombinase-Expressing Parasite Lines Using CRISPR/Cas9." *Scientific Reports* 7 (1): 3881. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03984-3>.
- Koning-Ward, Tania F de, Paul R Gilson, and Brendan S Crabb. 2015. "Advances in Molecular Genetic Systems in Malaria." *Nature Reviews Microbiology* 13 (6): 373–87. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3450>.
- Koonin, Eugene V, Kira S Makarova, and Feng Zhang. 2017. "Diversity, Classification and Evolution of CRISPR-Cas Systems." *Current Opinion in Microbiology* 37: 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>.
- Lander, Noelia, Miguel A Chiurillo, and Roberto Docampo. 2016. "Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 63 (5): 679–90. <https://doi.org/10.1111/jeu.12338>.
- Lander, Noelia, Miguel A Chiurillo, Melissa Storey, Anibal E Vercesi, and Roberto Docampo. 2016. "CRISPR/Cas9-Mediated Endogenous C-Terminal Tagging of Trypanosoma Cruzi Genes Reveals the Acidocalcisome Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 291 (49): 25505–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749655>.
- Lander, Noelia, Miguel A Chiurillo, Anibal E Vercesi, and Roberto Docampo. 2017. "Endogenous C-Terminal Tagging by CRISPR/Cas9 in Trypanosoma Cruzi." *Bio-Protocol* 7 (10). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2299>.
- Larson, Matthew H, Luke A Gilbert, Xiaowo Wang, Wendell A Lim, Jonathan S Weissman,

- and Lei S Qi. 2013. “CRISPR Interference (CRISPRi) for Sequence-Specific Control of Gene Expression.” *Nature Protocols* 8 (11): 2180–96. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>.
- Lewis, Kevin M, and Ailong Ke. 2017. “Building the Class 2 CRISPR-Cas Arsenal.” *Molecular Cell* 65 (3): 377–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.024>.
- Long, Shaojun, Kevin Brown, and L Sibley. 2018. “CRISPR-Mediated Tagging with BirA Allows Proximity Labeling in *Toxoplasma Gondii*.” *BIO-PROTOCOL* 8 (6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2768>.
- Long, Shaojun, Qiuling Wang, and L David Sibley. 2016. “Analysis of Noncanonical Calcium-Dependent Protein Kinases in *Toxoplasma Gondii* by Targeted Gene Deletion Using CRISPR/Cas9.” *Infection and Immunity* 84 (5): 1262–73. <https://doi.org/10.1128/IAI.01173-15>.
- Lu, Junnan, Ying Tong, Jiaqiang Pan, Yijun Yang, Quan Liu, Xuefang Tan, Siting Zhao, Li Qin, and Xiaoping Chen. 2016. “A Redesigned CRISPR/Cas9 System for Marker-Free Genome Editing in *Plasmodium Falciparum*.” *Parasites & Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1487-4>.
- Makarova, Kira S, L Aravind, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. 2011. “Unification of Cas Protein Families and a Simple Scenario for the Origin and Evolution of CRISPR-Cas Systems.” *Biology Direct* 6 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-38>.
- Makarova, Kira S, Nick V Grishin, Svetlana A Shabalina, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. 2006. “A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action.” *Biology Direct* 1: 7. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>.
- Makarova, Kira S, and Eugene V Koonin. 2015. “Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1311: 47–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4.
- Makarova, Kira S, Yuri I Wolf, Omer S Alkhnbashi, Fabrizio Costa, Shiraz A Shah, Sita J Saunders, Rodolphe Barrangou, et al. 2015. “An Updated Evolutionary Classification of CRISPR–Cas Systems.” *Nature Reviews. Microbiology* 13 (11): 722–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E DiCarlo, Julie E Norville, and George M Church. 2013. “RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.” *Science* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Marraffini, Luciano A, and Erik J Sontheimer. 2010. “CRISPR Interference: RNA-Directed Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea.” *Nature Reviews. Genetics* 11 (3): 181–90. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>.
- Masepohl, B, K Görlitz, and H Böhme. 1996. “Long Tandemly Repeated Repetitive (LTRR) Sequences in the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena* Sp. PCC 7120.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1307 (1): 26–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652664>.
- Mogollon, Catherin Marin, Fiona J A van Pul, Takashi Imai, Jai Ramesar, Séverine Chevalley-Maurel, Guido M de Roo, Sabrina A J Veld, et al. 2016. “Rapid Generation of Marker-Free *P. Falciparum* Fluorescent Reporter Lines Using Modified CRISPR/Cas9 Constructs and Selection Protocol.” *PLoS ONE* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168362>.

- Mojica, F J, C Ferrer, G Juez, and F Rodríguez-Valera. 1995. “Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the Archaea *Haloferax Mediterranei* and *Haloferax Volcanii* and Could Be Involved in Replicon Partitioning.” *Molecular Microbiology* 17 (1): 85–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476211>.
- Mojica, F J M, G Juez, and F Rodríguez-Valera. 1993. “Transcription at Different Salinities of *Haloferax Mediterranei* Sequences Adjacent to Partially Modified PstI Sites.” *Molecular Microbiology* 9 (3): 613–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>.
- Mojica, Francisco J M, César Díez-Villaseñor, Jesús García-Martínez, and Elena Soria. 2005. “Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements.” *Journal of Molecular Evolution* 60 (2): 174–82. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- Nayak, Dipti D, and William W Metcalf. 2017. “Cas9-Mediated Genome Editing in the Methanogenic Archaeon *Methanosarcina Acetivorans*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (11): 2976–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618596114>.
- Nishimasu, Hiroshi, F Ann Ran, Patrick D. Hsu, Silvana Konermann, Soraya I. Shehata, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Feng Zhang, and Osamu Nureki. 2014. “Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA.” *Cell* 156 (5): 935–49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>.
- Oh, Jee-Hwan, and Jan-Peter van Pijkeren. 2014. “CRISPR–Cas9-Assisted Recombineering in *Lactobacillus Reuteri*.” *Nucleic Acids Research* 42 (17): e131–e131. <https://doi.org/10.1093/nar/gku623>.
- Oost, John van der, Edze R Westra, Ryan N Jackson, and Blake Wiedenheft. 2014. “Unravelling the Structural and Mechanistic Basis of CRISPR–Cas Systems.” *Nature Reviews Microbiology* 12 (7): 479–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3279>.
- Pawlowic, Mattie, Sumiti Vinayak, Adam Sateriale, F. Brooks Carrie, and Boris Striepen. 2017. “Generating and Maintaining Transgenic *Cryptosporidium Parvum* Parasites.” *Current Protocols in Microbiology* 46 (1): 20B.2.1-20B.2.32. <https://doi.org/10.1002/cpmc.33>.
- Peng, Duo, Samarchith P Kurup, Phil Y Yao, Todd A Minning, and Rick L Tarleton. 2014. “CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma Cruzi*.” *MBio* 6 (1): e02097-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>.
- Pfander, Claudia, Burcu Anar, Frank Schwach, Thomas D Otto, Mathieu Brochet, Katrin Volkmann, Michael A Quail, et al. 2011. “A Scalable Pipeline for Highly Effective Genetic Modification of a Malaria Parasite.” *Nature Methods* 8 (12): 1078–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1742>.
- Pinder, Jordan, Jayme Salsman, and Graham Dellaire. 2015. “Nuclear Domain ‘Knock-in’ Screen for the Evaluation and Identification of Small Molecule Enhancers of CRISPR-Based Genome Editing.” *Nucleic Acids Research* 43 (19): 9379–92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv993>.
- Pyenson, Nora C, and Luciano A Marraffini. 2017. “Type III CRISPR-Cas Systems: When DNA Cleavage Just Isn’t Enough.” *Current Opinion in Microbiology* 37: 150–54. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.003>.
- Qi, Lei S, Matthew H Larson, Luke A Gilbert, Jennifer A Doudna, Jonathan S Weissman, Adam P Arkin, and Wendell A Lim. 2013. “Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression.” *Cell* 152 (5): 1173–83.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.

- Qian, Pengge, Xu Wang, Zhenke Yang, Zhenkui Li, Han Gao, Xin-zhuan Su, Huiting Cui, and Jing Yuan. 2018. “A Cas9 Transgenic Plasmodium Yoelii Parasite for Efficient Gene Editing.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 222: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.04.003>.
- Ren, Bingjian, and Nishith Gupta. 2017. “Taming Parasites by Tailoring Them.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00292>.
- Romagnoli, Bruno A A, Gisele F A Picchi, Priscila M Hiraiwa, Beatriz S Borges, Lysangela R Alves, and Samuel Goldenberg. 2018. “Improvements in the CRISPR/Cas9 System for High Efficiency Gene Disruption in Trypanosoma Cruzi.” *Acta Tropica* 178: 190–95. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.013>.
- Ruud., Jansen, Embden Jan. D A van, Gaastra Wim., and Schouls Leo. M. 2002. “Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes.” *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.
- S. Makarova, Kira, Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. “Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems.” *Nature Reviews. Microbiology* 9 (6): 467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Sapranaukas, Rimantas, Giedrius Gasiunas, Christophe Fremaux, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2011. “The Streptococcus Thermophilus CRISPR/Cas System Provides Immunity in Escherichia Coli.” *Nucleic Acids Research* 39 (21): 9275–82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>.
- Shen, Bang, Kevin M Brown, Tobie D Lee, and L David Sibley. 2014. “Efficient Gene Disruption in Diverse Strains of Toxoplasma Gondii Using CRISPR/CAS9.” *MBio* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>.
- Shmakov, Sergey, Omar O. Abudayyeh, Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Jonathan S. Gootenberg, Ekaterina Semenova, Leonid Minakhin, et al. 2015. “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems.” *Molecular Cell* 60 (3): 385–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.
- Sidik, Saima M, Caroline G Hackett, Fanny Tran, Nicholas J Westwood, and Sebastian Lourido. 2014. “Efficient Genome Engineering of Toxoplasma Gondii Using CRISPR/Cas9.” *PLoS ONE* 9 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100450>.
- Sidik, Saima M, Diego Huet, Suresh M Ganesan, My-Hang Huynh, Tim Wang, Armiyaw S Nasamu, Prathapan Thiru, et al. 2016. “A Genome-Wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes.” *Cell* 166 (6): 1423–1435.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019>.
- Silas, Sukrit, Patricia Lucas-Elio, Simon A Jackson, Alejandra Aroca-Crevillén, Loren L Hansen, Peter C Fineran, Andrew Z Fire, and Antonio Sánchez-Amat. 2017. “Type III CRISPR-Cas Systems Can Provide Redundancy to Counteract Viral Escape from Type I Systems.” *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27601>.
- Sinkunas, Tomas, Giedrius Gasiunas, Sakharam P Waghmare, Mark J Dickman, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2013. “In Vitro Reconstitution of Cascade-mediated CRISPR Immunity in Streptococcus Thermophilus.” *The EMBO Journal* 32 (3): 385–94. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.352>.
- Smargon, Aaron A, David B T Cox, Neena K Pyzocha, Kaijie Zheng, Ian M Slaymaker,

- Jonathan S Gootenberg, Omar A Abudayyeh, et al. 2017. “Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28.” *Molecular Cell* 65 (4): 618–630.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.023>.
- Song, Fei, and Knut Stieger. 2017. “Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks.” *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 7: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.02.006>.
- Staals, Raymond H J, Yoshihiro Agari, Saori Maki-Yonekura, Yifan Zhu, David W Taylor, Esther van Duijn, Arjan Barendregt, et al. 2013. “Structure and Activity of the RNA-Targeting Type III-B CRISPR-Cas Complex of *Thermus Thermophilus*.” *Molecular Cell* 52 (1): 135–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.013>.
- Stefani, Diego De, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Ildikò Szabò, and Rosario Rizzuto. 2011. “A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *Nature* 476 (7360): 336–40. <https://doi.org/10.1038/nature10230>.
- Sternberg, Samuel H, Sy Redding, Martin Jinek, Eric C Greene, and Jennifer A Doudna. 2014. “DNA Interrogation by the CRISPR RNA-Guided Endonuclease Cas9.” *Nature* 507 (7490): 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>.
- Subramanian, Aravind, Pablo Tamayo, Vamsi K Mootha, Sayan Mukherjee, Benjamin L Ebert, Michael A Gillette, Amanda Paulovich, et al. 2005. “Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (43): 15545–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.
- Twu, Olivia, Daniele Dessì, Anh Vu, Frances Mercer, Grant C Stevens, Natalia de Miguel, Paola Rappelli, et al. 2014. “*Trichomonas Vaginalis* Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Prostate Cell Growth, Invasiveness, and Inflammatory Responses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (22): 8179–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321884111>.
- Vinayak, Sumiti, Mattie C Pawlowic, Adam Sateriale, Carrie F Brooks, Caleb J Studstill, Yael Bar-Peled, Michael J Cipriano, and Boris Striepen. 2015. “Genetic Modification of the Diarrhoeal Pathogen *Cryptosporidium Parvum*.” *Nature* 523 (7561): 477–80. <https://doi.org/10.1038/nature14651>.
- Wang, Jiuyu, Jiazhi Li, Hongtu Zhao, Gang Sheng, Min Wang, Maolu Yin, and Yanli Wang. 2015. “Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems.” *Cell* 163 (4): 840–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.008>.
- Westra, Edze R., Paul B. G van Erp, Tim Künne, Shi Pey Wong, Raymond H. J Staals, Christel L. C Seegers, Sander Bollen, et al. 2012. “CRISPR Immunity Relies on the Consecutive Binding and Degradation of Negatively Supercoiled Invader DNA by Cascade and Cas3.” *Molecular Cell* 46 (5): 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.018>.
- Wiedenheft, Blake, Samuel H Sternberg, and Jennifer A Doudna. 2012. “RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea.” *Nature* 482 (7385): 331–38. <https://doi.org/10.1038/nature10886>.
- Xiao, Yibei, Sherwin Ng, Ki Hyun Nam, and Ailong Ke. 2017. “How Type II CRISPR-Cas Establish Immunity through Cas1-Cas2-Mediated Spacer Integration.” *Nature* 550 (7674): 137–+. <https://doi.org/10.1038/nature24020>.

- Zebec, Ziga, Andrea Manica, Jing Zhang, Malcolm F White, and Christa Schleper. 2014. "CRISPR-Mediated Targeted mRNA Degradation in the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *Nucleic Acids Research* 42 (8): 5280–88. <https://doi.org/10.1093/nar/gku161>.
- Zhao, Changlong, Xueqin Shu, and Baolin Sun. 2017. "Construction of a Gene Knockdown System Based on Catalytically Inactive ('Dead') Cas9 (DCas9) in *Staphylococcus Aureus*." *Applied and Environmental Microbiology* 83 (12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00291-17>.