

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Vendula Horáčková

Inducibilní expresní systémy a jejich využití ve studiu parazitických organismů

Inducible expression systems and their use in the study of parasitic organisms

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Luboš Voleman, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze dne 10. května 2019

Podpis.....

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Pavlu Doležalovi za cenné rady a připomínky při psaní této práce. Velký dík si zaslouží Luboš Voleman, který prokázal nemalou trpělivost, když se mne snažil naučit pracovním postupům a zásadám práce v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala všem členům Laboratoře transportu proteinů a biogeneze organel za vlídné přijetí a příjemnou pracovní atmosféru. Poděkování patří i mé rodině, která to se mnou celé tři roky mého studia vydržela.

Abstrakt

Inducibilní expresní systémy jsou systémy, které umožňují ‚zapínat‘ a ‚vypínat‘ expresi genu zájmu, a jsou tedy užitečným nástrojem pro studium funkce genů. Existují desítky různých inducibilních expresních systémů, které se navzájem liší úrovní, na které k indukci dochází, dobou indukce, možnostmi využití atd. V této práci budou popsány tři typy inducibilních expresních systémů, na kterých budou demonstrovány obecné rysy systémů regulovaných na úrovni transkripce. Jsou to systémy založené na regulaci *lac* operonu *Escherichia coli*, dále systémy využívající regulačních elementů transpozonu Tn10 *E. coli*, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči tetracyklinu, a nakonec systémy regulované agonisty receptoru pro steroidní hormon ekdyson, který je klíčovým regulátorem vývoje hmyzu. Práce obsahuje i kapitolu o využití inducibilních expresních systémů u parazitických organismů.

Klíčová slova: expresní systémy, exprese proteinů, *lac* operon, receptor pro ekdyson, parazitické prvoci

Abstract

Inducible expression systems are systems with ability to switch expression of genes of interest on and off. Therefore, they are useful molecular tools for analysis of gene function. Nowadays, there are tens of various inducible expression systems available that differ from each other in level of regulation of gene expression, time of induction, possibilities of use, etc. This work is focused on three of them to illustrate common features of the inducible expression systems which regulate gene expression at the level of transcription. Firstly, systems based on regulation of lactose operon of *Escherichia coli* are mentioned. Secondly, systems which use regulatory elements of tetracycline resistance-encoding transposon Tn10 of *E. coli* are described. Third chapter is focused on systems regulated by agonists of ecdysone receptor. In the last chapter cases of use of inducible expression systems in the study of parasitic organisms are summarized.

Key words: expression systems, protein expression, lactose operon, ecdysone receptor, parasitic protists

Seznam zkratek

AF activation function

AID auxin inducible degron

CaMV cauliflower mosaic virus

CMV cytomegalovirus

CRP cyclic AMP receptor protein

dd destabilizační doména

DHFR dihydrofolát reduktáza

DiCre dimerizable Cre

EcR ecdysone receptor

EcRE ecdysone response element

EF-Tu elongation factor thermo unstable

E/GRE ecdysone/glucocorticoid response element

FKBP12 FK506-binding protein 12

FRB FKBP12-rapamycin associated protein binding domain

GS-E gene switch ecdysone

HSR heat-shock response

IPTG isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid

KAP1 KRAB-associated protein-1

KRAB Krüppel-associated box

LAP *lac* activator protein

MFS Major facilitator superfamily

NLS nuclear localization signal

PARP procyclic acidic repetitive protein

PTS phosphosugar transferase system

RNAP RNA polymeráza

rtTA reverse Tc-controlled transactivator

RXR retinoid-X receptor

SCF Skp, Cullin, F-box containing complex

SELEX systematic evolution of ligands by exponential enrichment

SV40 simian virus 40

TATi trans-activator trap identified

Tc tetracyklin

TIR1 transport inhibitor response

TMG methyl- β -D-thiogalaktopyranosid

TMP trimethoprim

TRAD Tet repressor and putative activating domains

tTA Tc-controlled trans-activator

tTS tetracycline controlled transcriptional silencer

UAS upstream activation sequence

USP ultraspiracle

UTR untranslated region

VP16 virion protein 16

WHO World Health Organization

Obsah

1 Úvod	1
2 lac operon u <i>Escherichia coli</i>	2
2.1 Přírozená funkce operonu.....	2
2.2 Regulace lac operonu.....	3
2.3 Indukce lac operonu.....	3
2.4 Modifikace a využití LacI-lacO systému.....	6
2.5 Další induktory.....	7
2.6 Autoindukce.....	7
2.7 Využití lac systému u eukaryot.....	8
3 Tetracyklinem regulované inducibilní systémy	9
3.1 Působení tetracyklinů a resistance vůči nim.....	9
3.2 Regulace exprese TetA a TetR (Tn10).....	10
3.3 Modifikace a využití systému TetR-tetO.....	13
3.4 Tet transaktivátory.....	13
3.4.1 TetOFF systém.....	13
3.4.2 TetON systém.....	13
3.4.3 KRAB TetON (tTs).....	14
3.4.4 Kombinovaný TetON systém.....	14
3.4.5 Autoregulační smyčka.....	14
4 Receptor pro ekdyson a jeho využití pro inducibilní expresi transgenů	15
4.1 Ekdyson a jeho role v regulaci genové exprese.....	15
4.2 Využití EcR pro inducibilní expresi.....	16
4.2.1 VgEcR-RXR systém.....	17
4.2.2 EcR receptor Bombyx mori a chimérické receptory.....	18
4.2.3 Využití u jiných skupin organismů.....	19
4.2.4 Látky užívané k indukci EcR-RXR a příbuzných systémů.....	19
5 Inducibilní expresní systémy používané u parazitických organismů	20
5.1 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni transkripce.....	21
5.2 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni stability mRNA.....	22
5.3 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni translace.....	23
5.4 Inducibilní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni stability proteinu.....	24
5.5 Inducibilní systémy u parazitických protist: DiCre rekombináza.....	26
6 Závěr	29
7 Literatura	30

1 Úvod

Inducibilní expresní systémy jsou systémy pro manipulaci s genovou expresí nacházející využití v mnoha oblastech výzkumu i v biotechnologické výrobě. Teoreticky lze jejich prostřednictvím jednoduchým zásahem (přidáním chemické látky, změnou teploty apod.) měnit množství genového produktu v buňkách živého organismu, ať už jde o tvora jednobuněčného či mnohobuněčného. Klíčovou vlastností inducibilních expresních systémů je, jak už název napovídá, inducibilita, tedy schopnost změny exprese po indukci. Míru inducibility systému je možné vyjádřit jako poměr exprese (případně aktivity) produktu daného genu ve stavu indukovaném ku expresi ve stavu před indukci, tj. kolikrát se po indukci zvýšila exprese genu oproti původnímu stavu. Dalším důležitým parametrem je bazální exprese, tedy exprese před indukci. Obecně platí, že čím je bazální exprese nižší, tím lépe, ačkoliv ne vždy je nulová exprese produktu v neindukovaném stavu bezpodmínečně nutná. Neméně důležitou skutečností, která je určující pro využití daného inducibilního systému, je povaha indukující látky. Její toxicita, možný pleiotropní efekt na buňky, schopnost pronikat do buněk a tkání, doba trvání působení a v neposlední řadě i cena – to všechno je nutno brát v potaz při výběru vhodného inducibilního systému.

Všechny inducibilní expresní systémy, ať už sebevíc sofistikované, využívají mechanismů regulace genové exprese, které přirozeně probíhají v buňkách našich či jiných organismů. V tomto duchu lze inducibilní expresní systémy rozdělit podle toho, na jaké úrovni regulace genové exprese působí. Systémy regulované na úrovni transkripce jsou povětšinou založené na transkripčních faktorech – represorech a aktivátorech transkripce, jejichž schopnost interagovat s regulačními sekvencemi na molekule DNA se mění v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti konkrétního stimulu. Tím mohou být nejrůznější organické látky, ale i teplotní šok, osmotický stres, záření určité vlnové délky či interakce s jiným proteinem. Další možností je například regulace transkripce pomocí inducibilních RNA polymeráz. Regulaci na úrovni stability mRNA lze zajistit pomocí RNA interference či nejrůznějších regulovatelných ribozymů, které mRNA naštěpí tak, že oddělí od transkriptu 5' či 3' nepřekládanou oblast, a tím urychlí její degradaci. Translaci je možné regulovat specifickou vazbou proteinů na motiv tvořící vlásenky v rámci regulované mRNA. Eventuálně lze manipulovat s množstvím konkrétního proteinu v buňce pomocí fúze vybraného genu se sekvencí destabilizační domény, která po dokončení translace způsobí degradaci proteinu, jestliže není přítomen její inhibitor.

Cílem této práce je na příkladech tří inducibilních systémů naznačit cestu, jak se z proteinů regulujících procesy v buňkách jedné skupiny organismů staly díky úsilí mnoha lidí komponenty

komplexních expresních systémů se širokým spektrem aplikací. Ačkoliv jsou všechny tři vybrané systémy regulovány na úrovni transkripce, hrají v organismu svého původu velmi odlišné role. Jeden slouží k regulaci exprese enzymů alternativní metabolické dráhy, druhý umožňuje resistenci vůči působení antibiotika a třetí řídí vývoj mnohobuněčného organismu. Poslední kapitola této práce je věnována využití inducibilních expresních systémů u parazitických prvoků. Budou zde stručně popsány mechanismy regulace inducibilních systémů, které byly u těchto organismů aplikovány, a také bude uveden přehled publikovaných použití daných systémů u konkrétních druhů parazitů.

2 lac operon u *Escherichia coli*

2.1 Přirozená funkce operonu

Systém regulace genové exprese strukturních genů pomocí genů regulačních založený na přítomnosti či nepřítomnosti určitého metabolitu popsali Jacob a Monod (1961) na modelu *lac* operonu *Escherichia coli*. Na základě výsledků do té doby známých experimentů navrhli mechanismus, jakým by na molekulární úrovni mohlo docházet k jevu známému již od počátku 20. století - tzv. „enzymatické adaptaci“, tedy produkci určitých enzymů mikroorganismy pouze v přítomnosti jejich substrátů (Jacob&Monod, 1961). *lac* operon obsahuje geny, jejichž produkty se účastní metabolismu laktózy (Jacob&Monod, 1961). Jedná se o β -galaktozidázu (LacZ), *lac* permeázu (LacY) a thiogalaktosid transacetylázu (LacA). *lac* permeáza je transmembránový protein využívající transportu protonů po elektrochemickém gradientu k symportu D-galaktopyranosidů proti koncentračnímu gradientu do nitra buňky (Guan&Kaback, 2006). β -galaktozidáza (LacZ) má dvě enzymatické aktivity – katalyzuje hydrolýzu laktózy na glukózu a galaktózu, ale také změnu $\beta(1\rightarrow4)$ vazby mezi glukózou a galaktózou na $\beta(1\rightarrow6)$. Produktem druhé zmíněné reakce je allolaktóza, která je schopná indukovat expresi *lac* operonu (Lester, 1952; Jobe&Bourgeois, 1972; Müller-Hill et al., 1964). Posledním enzymem *lac* operonu je LacA neboli thiogalaktosid transacetyláza, jejíž role není stále úplně jasná (Roderick, 2005). Přirozené substráty tohoto enzymu známy nejsou, ale bylo zjištěno, že enzym katalyzuje přenos acetylového zbytku z molekuly acetyl-CoA na analogy galaktózy isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) a methyl- β -D-thiogalaktopyranosid (TMG), které po této modifikaci již nemohou indukovat expresi *lac* operonu ani nejsou transportovány *lac* permeázou. Není-li LacA funkční, dochází k hromadění zmíněných molekul, což způsobuje zpomalení růstu. Z tohoto důvodu se předpokládá, že má LacA detoxifikační funkci a umožňuje export nehydrolyzovatelných molekul neznámým mechanismem ven z buňky. (Herzenberg, 1961; Wilson&Kashket, 1969; Roderick, 2005; Andrews&Lin, 1976).

2.2 Regulace *lac* operonu

Regulační oblast *lac* operonu obsahuje promotor rozeznávaný RNA polymerázou a operátor (Obr.1). Do regulační oblasti lze zahrnout také gen *lacI* (pod promotorem P_I), jehož produktem je represor. Ten se v podobě tetrameru váže právě do oblasti operátoru na molekule DNA a účinně brání RNA polymeráze opustit promotor a zahájit transkripci *lacZYA* mRNA (Obr. 2A) (Gilbert&Maxam, 1973; Lee&Goldfarb, 1991). Vedle zmíněného operátoru (O1) existují však ještě další dvě místa, do kterých se LacI váže (Pfahl et al., 1979). První z těchto sekundárních vazebných míst, O2, se nachází uvnitř sekvence genu *lacZ* blízko prvnímu operátoru O1 a afinita represoru k této sekvenci je 25 - 31krát nižší, než je tomu u O1 (Reznikoff et al., 1974). Druhý z nich, O3, leží na konci genu *lacI* a afinita represoru k němu je ještě nižší, cca 100krát nižší než u O1 (Pfahl et al., 1979). Navzdory této skutečnosti jsou sekundární vazebná místa O2 a O3 velmi důležitá z hlediska umlčení exprese, které je prokazatelně efektivnější, pokud jsou tyto „pseudo-operátory“ přítomny (Besse et al., 1986). Důvodem je struktura tetrameru LacI, který nese hned dvě DNA vazebné domény (McKay et al., 1982). U superspiralizovaných molekul DNA proto může docházet k ohybu dvoušroubovice, vazbě represoru na dva operátory zároveň a vzniku útvaru nazývanému „*lac* repression loop“ (Obr. 2B), jenž je stabilnější než prostý komplex represor-operátor (Borowiec et al., 1987; Eismann&Müller-Hill, 1990; Brenowitz et al., 1991).

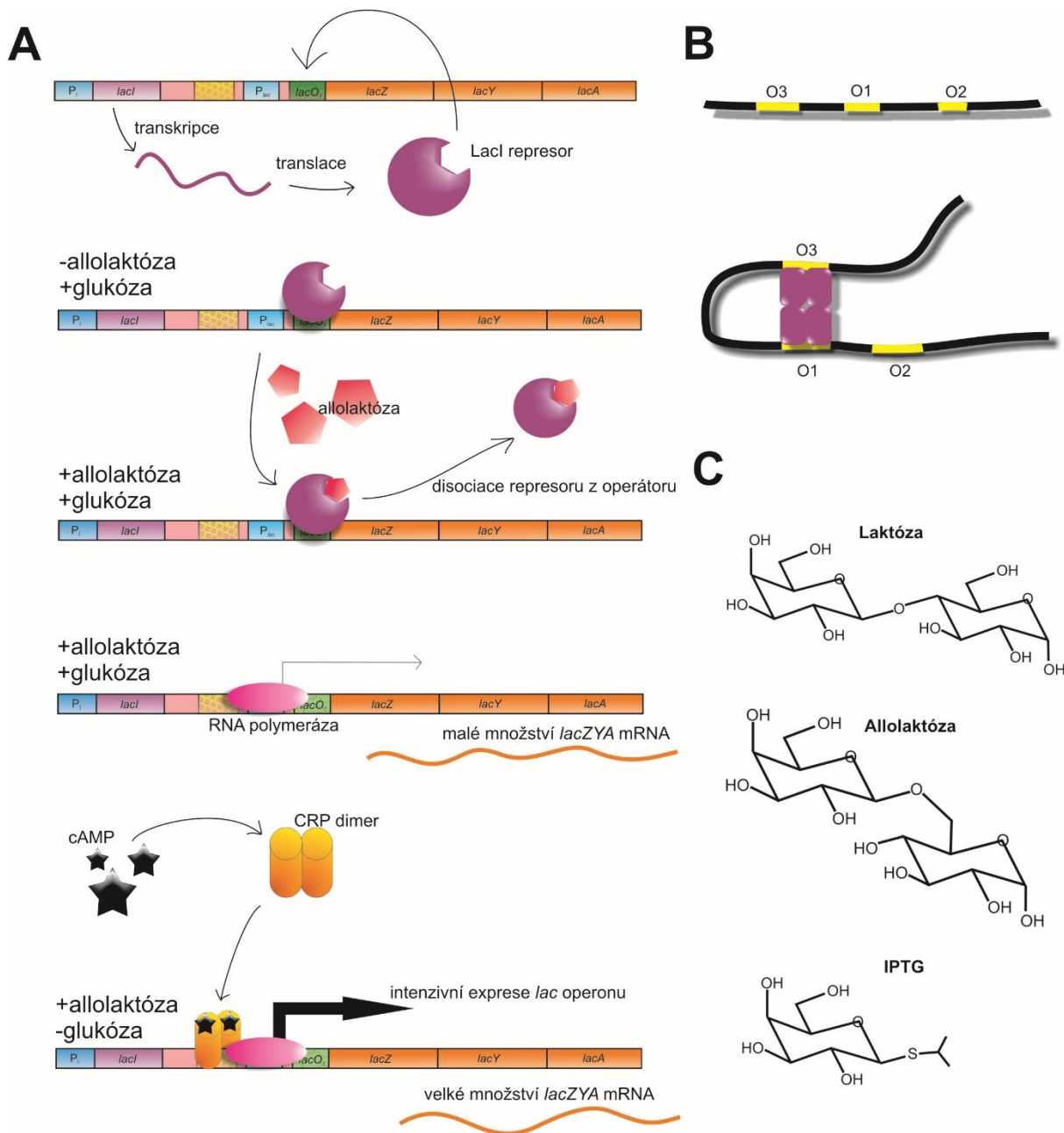


Obr. 1: Schéma *lac* operonu *E. coli*. Žlutý obdelník značí místo pro vazbu CRP proteinu. Dle Wilson et al., 2007; Borowiec et al., 1987, upraveno.

2.3 Indukce *lac* operonu

Pokud je v médiu přítomna laktóza, je v omezené míře transportována *lac* permeázou do buňky, kde je následně β -galaktozidázou hydrolyzována. Oba enzymy se totiž v buňce vyskytují v malém množství, i když není indukována exprese *lac* operonu (Jobe&Bourgeois, 1972). β -galaktozidáza dává vznik allolaktóze, která i ve velmi nízké koncentraci spustí expresi *lac* operonu (Jobe&Bourgeois, 1972). Po navázání allolaktózy na LacI je komplex represor-operátor destabilizován a je možné zahájit transkripci (Barkley et al., 1975). K expresi operonu však nedochází v případě, kdy je kromě laktózy (resp. allolaktózy) přítomna i glukóza (Kolb et al., 1993). Tento „glukózový efekt“ je případem katabolické represe, kdy přítomnost glukózy či produktů jejího metabolismu ovlivňuje expresi inducibilních operonů (Magasanik, 1961; Epps&Gale, 1942). Přítomnost glukózy totiž způsobí defosforylaci proteinů systému PTS (phosphosugar transferase

system), který, je-li fosforylován, slouží jako aktivátor adenylát cyklázy – glukóza tedy nepřímo inhibuje tvorbu cAMP v buňce (Deutscher et al., 2006; Makman&Sutherland, 1965). cAMP tvoří komplex s CRP (Cyclic AMP receptor protein), jenž se váže do regulační oblasti *lac* operonu (Obr. 2A) (Majors, 1975). Dimer CRP proteinu interaguje s C-terminální doménou α -podjednotky bakteriální RNA polymerázy (α CTD I nebo II) a tímto způsobem zvýší afinitu RNA polymerázy k oblasti promotoru a podpoří vznik uzavřeného komplexu RNAP-promotor a iniciaci transkripce *lac* operonu (Busby&Ebright, 1999) .



Obr. 2: A Regulace exprese *lac* operonu. B Schematické znázornění represní smyčky („lac repression loop“) vytvořené na molekule DNA díky interakci tetrameru LacI (fialově) s operátory. C Struktura molekul indukujících expresi *lac* operonu. Dle Wilson et al., 2007; Borowiec et al., 1987, upraveno.

2.4 Modifikace a využití LacI-*lacO* systému

Regulační oblasti *lac* operonu jsou hojně používány pro expresi cizorodých proteinů v *E. coli* (Rosano&Ceccarelli, 2014). Pro takovéto účely se však většinou využívá mutantního *lac* promotoru izolovaného z kmene UV5, který byl odolný vůči katabolické represi, a i v přítomnosti glukózy produkoval srovnatelné množství β -galaktozidázy jako v její nepřítomnosti (Silverstone et al., 1970). Tento promotor se vyskytuje na chromosomu kmene *E. coli* BL21(DE3), který je nejvíce používaným bakteriálním kmenem pro expresi rekombinantních proteinů (Rosano&Ceccarelli, 2014). Plní zde funkci inducibilního promotoru pro expresi T7 RNA polymerázy, jež je do bakteriálního chromosomu vložena v podobě profága λ -DE3. V přítomnosti indukující molekuly bakteriální RNA polymeráza transkribuje gen pro T7 RNA polymerázu, která následně rozpoznává sekvenci T7 promotoru a zahájí transkripci rekombinantního proteinu nacházejícího se za promotorem (Studier&Moffatt, 1986).

Dalším vylepšením tohoto systému byly fúze *lacUV5* promotoru, který je sám o sobě relativně slabý, s promotory silnějšími. Fúze s promotorem tryptofanového operonu dala vznik *tac* promotoru, který poskytuje expresi vyšší než oba zmíněné promotory (de Boer et al., 1983). Úspěch tohoto fúzního promotoru spočívá podle De Boer a kolektivu (1983) ve skutečnosti, že *lacUV5* obsahuje „-10“ konsensus sekvenci (Pribnowův box), ale nikoliv konsensus „-35“ oblast, která je naopak součástí *trp* promotoru. Jejich spojením tak dochází ke vzniku velmi silného promotoru. Ještě silnější jsou promotory *tic* a *trc*, které vznikly zvětšením vzdálenosti mezi „-35“ a „-10“ oblastí *tac* promotoru z původních 16 párů bazí na 18 (*tic*) a 17 (*trc*) (Brosius et al., 1985).

Mezi fúzní *lac* promotory lze zahrnout i T7/*lac* promotor, jenž vznikl spojením T7 promotoru s *lac* operátorem, který, je-li ve vhodné vzdálenosti (15 či 21 párů bazí od počátku transkripce), umožňuje prostřednictvím vazby LacI represoru blokovat polymerační aktivitu T7 RNA polymerázy (Dubendorf et al, 1991). T7/*lac* promotor je přítomen na některých vektorech ze série plasmidů pET (Novagen, 1999).

lacI na bakteriálním chromosomu má velmi slabý promotor, z čehož plyne nízká exprese LacI represoru. Pokud se rekombinantní gen zájmu s *lac* promotorem nachází na multikopiovém plasmidu, může se stát, že malé množství molekul represoru nebude stačit k „umlčení“ exprese, a to povede k expresi genu zájmu i v neindukovaném stavu (Müller-Hill et al., 1968; Rosano&Ceccarelli, 2014). Tomu lze zabránit použitím kmene bakterií, který nese mutaci v promotoru *lacI* genu nazvanou *lacI^q*, která umožňuje počet molekul represoru na buňku výrazně zvýšit (Müller-Hill et al., 1968; Calos, 1978).

2.5 Další induktory

Expres z *lac* promotoru může být indukována nejen laktózou (resp. allolaktózou) ale i pro tyto účely běžně používanými analogy galaktózy – isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG) a methyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (TMG) (Obr. 1C) (Herzenberg, 1959). Tyto pro bakterie nemetabolizovatelné látky jsou stejně jako laktóza transportovány LacY permeázou a modifikovány LacA transacetylázou (Herzenberg, 1961). V některých případech je žádanou vlastností expresních systémů možnost manipulace s množstvím produkovaného proteinu použitím různých koncentrací indukující molekuly. Pokud tedy není cílem maximální indukce exprese produktu, ale odstupňovaná odpověď dle množství indukující molekuly, je vhodné použít kmeny *E. coli* s mutantní LacY permeázou, u kterých vstupuje IPTG nebo TMG do buňky pouze pomocí pasivního transportu (Jensen et al., 1993; Marbach&Bettenbrock, 2012; Marschall et al., 2017).

Ne u všech systémů založených na *lac* regulaci je nutné pro indukci exprese do média přidávat indukující molekuly jako je IPTG či laktóza. Možnost regulace pouhým zvýšením teploty nabízí termosenzitivní mutant *lac* represoru, kterého poprvé popsali Bukrinsky a kolektiv (1988) pod označením *lacIts*. Tento represor umožňuje indukovat transkripci z *trc* promotoru zvýšením teploty z 30 na 42 °C (Adari et al., 1995). Při této teplotě však dochází ke spuštění HSR (heat-shock response) a aktivaci proteáz degradujících denaturované proteiny, což nejsou právě ideální podmínky pro expresi rekombinantních proteinů (Schumann, 2016). Pro omezení tohoto efektu za zvýšených teplot lze použít kmeny bakterií s defektním σ^{32} faktorem (σ faktor řídící HSR u bakterií) či kmeny s mutovanými geny pro proteázy *lon* a *clpA* (Gottesman, 1990).

2.6 Autoindukce

Další možností optimalizace exprese, zejména pro buňku toxických rekombinantních proteinů, je využití autoindukce. Expres v autoindukčním médiu je založena na diauxickém růstu bakteriální kultury, tedy takovém, vyznačujícím se dvěma exponenciálními fázemi růstu (Monod, 1949). Taková média obvykle obsahují dva zdroje energie a uhlíku – glukózu a (v případě *lac* promotorů) laktózu. Na počátku glukóza blokuje expresi *lac* permeázy a tím i transport laktózy do buňky, a proto není ihned zahájena expres potenciálně škodlivého proteinu z *lac* promotoru a bakteriální kultura tak může narůst do optimální optické denzity. Když je glukóza spotřebována, začne transport laktózy do buňky a zahájí se expres rekombinantního proteinu z *lac* promotoru (Kolb et al., 1993; Studier, 2005). Pokud je pro zvýšení výtěžku proteinu užívána T7 RNA polymeráza, která je schopna modulovat proteosyntézu tak, že protein zájmu umístěný pod regulovatelným T7

promotorem tvoří i více než 50 % veškerých proteinů buňky, je možné, že se růst bakteriální kultury po její aktivaci velmi zpomalí z důvodu nedostatku energie. Proto je vhodné dodat do autoindukčního média další zdroj uhlíku a energie, který podpoří růst i v době indukce. Takovým zdrojem může být glycerol, který může množství získaného proteinu i zdvojnásobit (Studier, 2005; Studier&Moffatt, 1986).

2.7 Využití *lac* systému u eukaryot

Hu a Davidson (1987) jako první aplikovali *lac* expresní systém na savčí buňky. Pro účinnou regulaci transkripce však bylo třeba upravit sekvenci LacI. Autoři zjistili, že 90 % LacI se v savčích buňkách nachází v cytoplasmě a pouhých 10 % se dostává do jádra (Hu&Davidson, 1987). Téměř výhradně jadernou lokalizaci (z 98 %), vyšší schopnost umlčení transkripce a vyšší citlivost k IPTG (ve srovnání s původním LacI) vykazoval Lac represor s přidáním jaderným lokalizačním signálem (NLS) viru SV40 připojeným na C-konec represoru přes linker tří aminokyselin (Fieck et al., 1992). Labow a kolektiv (1990) vytvořili jaderně lokalizovaný LacI obsahující VP16 aktivační doménu (tj. 100 aminokyselin z C-konce virion proteinu 16) herpes simplex viru a SV40 NLS na N-konci a tento fúzní protein nazvali LAP348. Tento transaktivátor byl schopen vazbou na repetici 14 či 21 *lac* operátorů umístěných do virového promotoru zvýšit expresi reportérového genu oproti bazálnímu stavu i více než 1000krát (Labow et al., 1990). Zajímavou formou LacI je tzv. LAP267, u kterého byla VP16 aktivační doména vložena za 267. aminokyselinu původního LacI. Toto umístění způsobilo citlivost transaktivátoru ke zvýšené teplotě a jeho aktivitu za nízkých koncentrací IPTG (Baim et al., 1991). Expresi prostřednictvím LAP267 tak může být indukována buď přidáním IPTG (do 5mM) nebo snížením teploty na 32°C. Naopak expresi lze utlumit jak odstraněním IPTG či zvýšením jeho koncentrace nad 5mM, tak i zvýšením teploty na 39 °C (Baim et al., 1991).

Pozoruhodný experiment umožňující sledování indukce exprese na živých zvířatech byl proveden Cronin a kolektivem (2001). Autoři pracovali s linií myši mutantních v lokusu *albino*, jehož produktem je enzym tyrozináza produkující prekurzor melaninu. Z této linie myši, které se vyznačují absencí pigmentu, byla vytvořena transgenní zvířata vykazující stabilní expresi LacI represoru. Transgenní myši byly kříženy s pigmentovanými jedinci nesoucími gen pro tyrozinázu regulovaný endogenním promotorem, do kterého byly vloženy tři *lac* operátory. Křížením vzniklé dvojité transgenní myši obsahovaly jak represor, tak gen pro tyrozinázu, jejíž exprese byla vazbou represoru blokována – myši tedy byly bílé. Pokud jim bylo podáváno ve vodě na pití 10mM IPTG, u myši se objevila pigmentace (Cronin et al., 2001).

Navzdory tomu, že systémy založené na *lac* regulaci jsou u eukaryot schopné značně zvýšit expresi oproti neindukovanému stavu, indukce (resp. umlčení v případě LAP transaktivátorů) je zde v porovnání s bakteriálními systémy velmi pomalá a vyžaduje koncentrace IPTG, které mohou mít cytotoxický efekt (Hu&Davidson, 1987; Figge et al, 1988; Gossen et al., 1994; Yarranton, 1992).

3 Tetracyklinem regulované inducibilní systémy

3.1 Působení tetracyklinů a resistance vůči nim

Tetracykliny jsou širokospektrá antibiotika působící jak na bakterie, tak na některá eukaryota (Chopra&Roberts, 2001). Antibakteriální působení tetracyklinů spočívá v zablokování proteosyntézy interakcí s rRNA 30S ribozomální podjednotky. Brání tak vzniku peptidové vazby mezi již existujícím peptidem a nově přichozí aminoacyl tRNA tak, že po spárování kodónu s odpovídajícím antikodonem a hydrolyze GTP na EF-Tu faktoru neumožní rotaci aminoacyl tRNA do A místa a místo toho způsobí její vymrštění ven z ribosomu (Brodersen et al., 2000). *In vitro* experimenty ukázaly, že se tetracyklin, byť s menší afinitou, váže i na eukaryotické (80S) ribozomy, avšak neinhibuje proteosyntézu (Budkevich et al, 2008). Delší dobu trvající léčba savců tetracykliny však může ovlivnit syntézu proteinů v mitochondriích, což se projevuje zejména u rychle proliferujících tkání (van der Bogert&Kroon, 1981).

Jsou známy čtyři základní mechanismy umožňující bakteriím odolávat působení tetracyklinů. Nejčastějším způsobem je zabránění akumulace antibiotika v buňce pomocí efluxních přenašečů a dále také odstraňování tetracyklinu z jeho vazebného místa na ribosomu pomocí speciálních ochranných proteinů. Méně časté jsou pak monooxygenázy, jež modifikují tetracyklin a tím podporují jeho degradaci, a mutace v 16S rRNA, na kterou se antibiotikum váže (Nguyen, 2014). Z pohledu této práce jsou významné zejména efluxní proteiny, jejichž geny mohou být jak na chromosomu, tak na plasmidech (Guillaume et al., 2004). Expres těchto resistenci umožňujících proteinů však není pro buňku za normálních okolností, tj. v nepřítomnosti antibiotika, příliš výhodná, a proto je třeba ji regulovat (Lee&Edlin, 1985; Eckert&Beck, 1989). Zatímco u gram-pozitivních bakterií je exprese efluxních přenašečů pravděpodobně regulována pomocí atenuace translace, u gram-negativních bakterií k regulaci dochází na úrovni transkripce (Chopra&Roberts, 2001).

Dobře prostudovaným příkladem je regulace exprese přenašeče TetA nalezeného na *Tn10* u *E. coli*. *Tn10* je složený transpozon obsahující několik genů – přenašeč TetA, represor TetR, Na⁺ dependentní glutamát permeázu JemA, protein neznámé funkce JemB a represor operonů rezistence k těžkým kovům JemC (Chalmers et al., 2000). TetA je přenašečem ve vnitřní membráně gram-

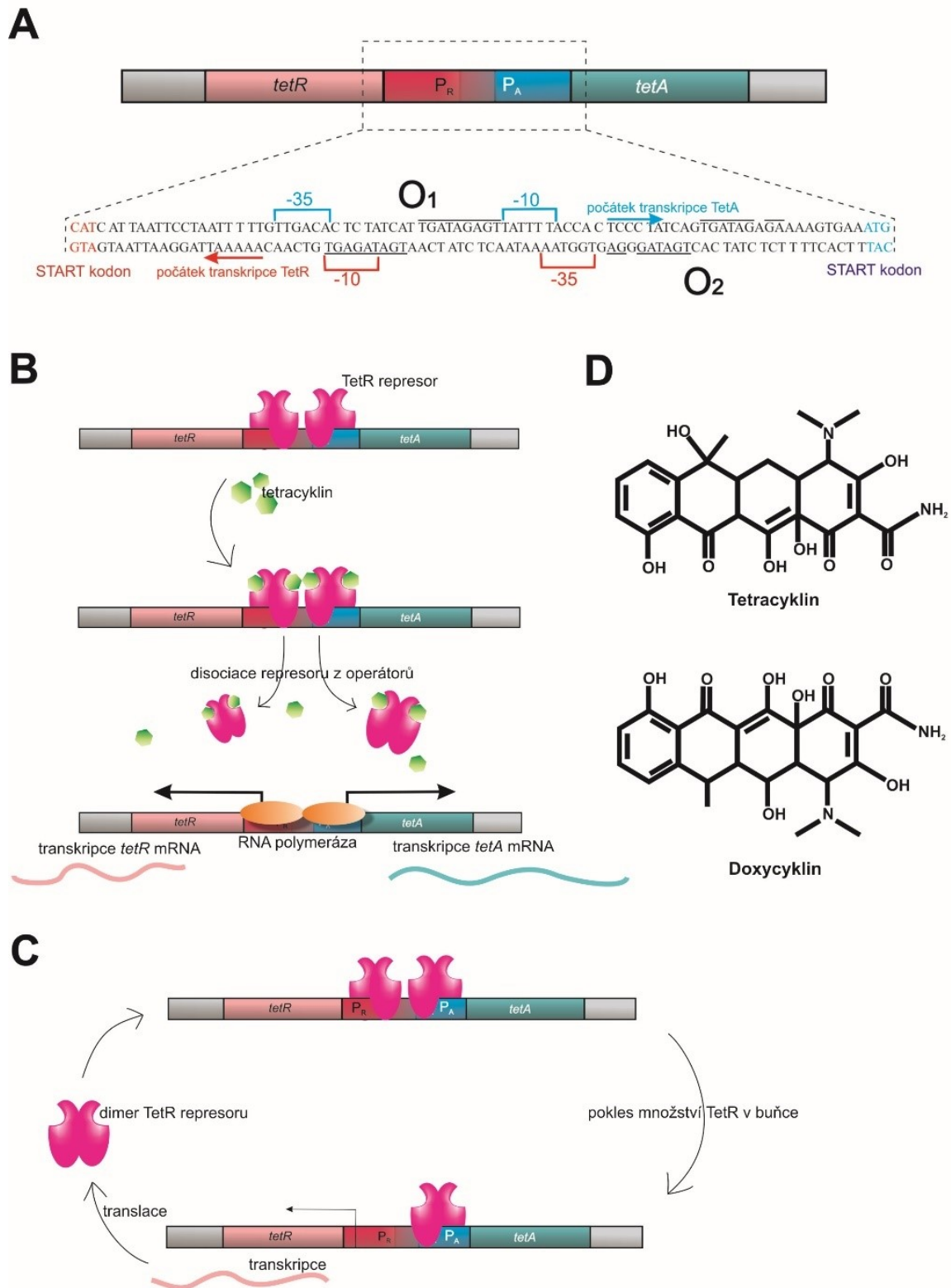
negativních bakterií, který stejně jako LacY permeáza patří do Major facilitator superfamily (MFS) – rodiny transportních proteinů obsahujících 12 α -helixů procházejících membránou (Marger&Saier, 1993). Tetracyklin koordinovaný s hořečnatým kationtem je pomocí TetA transportován ven do periplasmatického prostoru využívaje přitom transportu protonů v opačném směru (tedy antiportem) (Yamaguchi et al., 1990).

3.2 Regulace exprese TetA a TetR (Tn10)

Tet regulon se skládá z genů TetA a TetR, jejichž transkripce je navzájem opačně orientována (Obr. 3A). Regulační oblast těchto genů se nachází mezi nimi (Wray et al., 1981). Zde byly v rámci sekvence 81 párů bazí, které TetA a TetR oddělují, identifikovány dva operátory (O_1 a O_2) a promotory pro oba geny (Bertrand et al., 1983). Promotor TetA (P_A) je velmi silným promotorem (více než dvakrát silnější než *lac* promotor bez působení katabolické represe) a je téměř shodný s konsensus „-35“ a „-10“ sekvencemi u *E. coli* (Bertrand et al., 1984). V téže regulační oblasti byly nalezeny i dva překrývající se promotory pro TetR (P_{R1} a P_{R2}), vyznačující se jen slabou homologií s „-35“ a „-10“ konsensus sekvencemi a vykazující dohromady nižší expresi jimi řízených genů než P_A (Hillen et al., 1984; Bertrand et al., 1984). Vzhledem k rozdílným výsledkům různých metod analýzy počátku transkripce, není jasné, nakolik se jednotlivé promotory P_{R1} a P_{R2} skutečně uplatňují při transkripci *in vivo* a zda objevení P_{R1} jako promotoru TetR nebylo jen artefaktem *in vitro* transkripce (Hillen et al., 1984; Gülland&Hillen, 1992).

V nepřítomnosti tetracyklinu se Tet represor v podobě dimerů váže na operátory O_1 a O_2 vzdálené od sebe 10 párů bazí (tj. váží celkem 4 molekuly TetR), přičemž má vyšší afinitu k O_2 , tedy operátoru blíže genu *tetA* (Wray&Reznikoff, 1983). Zároveň, pokud je represorem obsazen O_1 dochází k represi obou genů, zatímco pokud je obsazen jen O_2 , sníží se pouze exprese TetA (Meier et al., 1988). Z toho Hillen a Berens (1994) vyvozují, že jde o jakousi pojistku proti aktivaci exprese TetA přenašeče za situace mírného poklesu množství TetR (Obr. 3C). Oba operátory jsou tvořeny palindromickou sekvencí, se kterou represor interaguje pomocí helix-turn-helix motivu (Isacson&Bertrand, 1985). Pokud je přítomen tetracyklin, váže se, koordinován s dvoumocným kationtem, do oblasti „core“ represoru. Následná změna konformace se projeví oddálením DNA vazebných α -helixů podjednotek dimeru a toto uspořádání jim nedovolí nadále interagovat s B konformací DNA. Disociací represoru z oblasti promotorů se uvolní prostor pro interakci s RNA polymerázou a může být iniciována transkripce *tetA* i *tetR* (Obr. 3B) (Kisker et al., 1995).

Důležitou okolností tetracyklinem indukovaných expresí je skutečnost, že čím vyšší je množství TetR v buňce, ať už zásluhou vícekopiového plasmidu či silného promotoru, tím více tetracyklinu je potřeba pro uvolnění represe (Bertrand et al., 1984).



Obr. 3: A Schéma regulační oblasti genů *tetR* a *tetA*. Černé podtržení značí sekvenci operátorů. Modře je vyznačena struktura promotoru *tetA*, červeně *tetR*. B Regulace exprese genů *tetR* a *tetA*. C Regulace množství molekul TetR represoru. D Struktura molekul tetracyklinu a doxycyklinu. Dle Bertrand et al., 1983; Wray et al., 1983; Hillen&Berens, 1994, upraveno.

3.3 Modifikace a využití systému TetR-*tetO*

Na rozdíl od již zmíněného LacI-*lacO* systémů expresní systémy regulovatelné tetracykliny se ve větší míře používají i u eukaryotických buněk a jsou např. jedním z nejslibnějších kandidátů na využití v genové terapii člověka (Gossen et al., 1994; Stieger et al., 2009). Poprvé byla tetracyklinem indukována exprese reportérového genu u buněk tabáku vložním *tet* operátoru do sekvence silného CaMV 35S RNA promotoru (Frohberg et al., 1991). Následně byl tento systém testován na celých transgenních rostlinách (Gatz et al., 1991) a kvasince *Schizosaccharomyces pombe* (Faryar&Gatz, 1992). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo potvrzeno, že lze tetracyklinem regulovat nejen transkripci RNA polymerázou II, ale i RNA polymerázou III, jež je zodpovědná za transkripci molekul tRNA, které často obsahují interní promotory (Dingermann et al., 1992; Geiduschek&Tocchini-Valentini, 1988).

3.4 Tet transaktivátory

3.4.1 TetOFF systém

Fúzí Tet represoru s C-terminální aktivační doménou VP16 byl vytvořen transaktivátor, který se v nepřítomnosti tetracyklinu váže na *tetO* sekvenci ležící uvnitř minimálního promotoru odvozeného od promotoru IE lidského cytomegaloviru, ze které transaktivátor stimuluje zahájení transkripce. Linie HeLa buněk stabilně produkující tento transaktivátor byly schopné exprese reportérového genu pod zmíněným promotorem, avšak po přidání i jen malého množství tetracyklinu exprese reportéru výrazně poklesla (Gossen&Bujard, 1992). Tentýž systém transaktivátoru v kombinaci s CMV promotorem byl aplikován i na transgenní myši, u kterých byla inducibilita exprese reportérového genu potvrzena v několika testovaných tkáních (Furth et al., 1994).

3.4.2 TetON systém

Nevýhodou TetOFF systému je právě z jeho podstaty vyplývající nutnost podávat experimentálním zvířatům dlouhodobě tetracykliny, aby exprese transgenu zůstala vypnutá, a naopak pokud je záměrem expresi indukovat, je třeba z těla zvířete veškerý tetracyklin (resp. doxycyklin) odstranit, což může být časově náročné (Gossen et al., 1995). Protože kontinuální užívání antibiotika může být problémem, jak pro udržení linie transgenních zvířat, tak pro případné využití v lidské terapii, Gossen a kolektiv (1995) připravili mutací čtyř aminokyselin Tet represoru nový transaktivátor rtTA s opačnou funkcí, než byla pozorována u tTA, tedy indukci exprese reportéru po přidání doxycyklinu.

3.4.3 KRAB TetON (tTs)

Významnou modifikací Tet represoru byla jeho fúze s KRAB doménou lidského zinc finger proteinu Kox1 (Deuschle et al., 1995). KRAB-zinc finger proteiny jsou transkripční regulátory vyšších obratlovců obsahující C-terminální zinc finger motiv a N-terminální KRAB doménu a jsou mimo jiné zodpovědné za transkripční umlčení transponovatelných elementů (Ecco et al., 2017). KRAB je u eukaryot vysoce konzervovaný motiv složený ze dvou amfipatických α -helixů, který, je-li součástí proteinu s DNA vazebnou doménou, funguje jako represor transkripce (Margolin et al., 1994). TetR-KRAB transrepresor (tTS) je schopen v nepřítomnosti tetracyklinu umlčet transkripci vazbou na *tetO* umístěné upstream od P_{CMV} nezávisle na jejich orientaci, a to i pokud jsou vzdáleny tisíce bází od počátku transkripce (Deuschle et al., 1995). Jakým mechanismem KRAB doména transkripci ovlivňuje není dosud plně objasněno. Represe pravděpodobně vzniká součinností mnoha proteinů (např. histon deacetyláz a DNA methyl transferáz) tvořících komplexy na scaffold proteinu KAP1 interagujícím s KRAB doménou (Schultz et al., 2001; Sripathy et al., 2006; Ecco et al., 2017). Výhoda inducibilních systémů založených na fúzi s KRAB doménami spočívá ve využití komplexního obranného aparátu buněk vzniklého v dlouhé koevoluci s transponovatelnými elementy pro účely manipulace s expresí libovolného transgenu (Ecco et al., 2017).

3.4.4 Kombinovaný TetON systém

Spojením aktivit rtTA a tTS^{KID} (KRAB doména pochází z krysího Kid-1 zinc finger proteinu) vznikl nový inducibilní systém, využívající silných stránek obou výše zmíněných TetON systémů – efektivní aktivaci transkripce z P_{CMV} promotoru pomocí VP16 domény rtTA transaktivátoru za přítomnosti doxycyklinu, a naopak snížení basální exprese v neindukovaném stavu díky KRAB doméně transrepresoru (Freundlieb et al., 1999).

3.4.5 Autoregulační smyčka

Haberman a kolektiv (1998) vytvořili TetOFF systém schopný autoregulace exprese tTA transaktivátoru neseného rekombinantním adeno-asociovaným virovým vektorem a testovali jej na HeLa buňkách i *in vivo* na krysách. Jak reportérový gen, tak gen transaktivátoru jsou zde pod kontrolou minimálního CMV promotoru a sedmi kopií tet operátoru, proto v nepřítomnosti tetracyklinu dochází ke zvyšování exprese transaktivátoru, který funguje jako aktivátor transkripce sebe sama a také reportérového genu, zatímco po přidání antibiotika se přestane transkribovat transaktivátor a po jeho degradaci vymizí i exprese reportéru (Haberman et al., 1998). Autoregulační TetOFF a ostatní výše zmíněné Tet systémy byly využity pro regulaci exprese různých genových

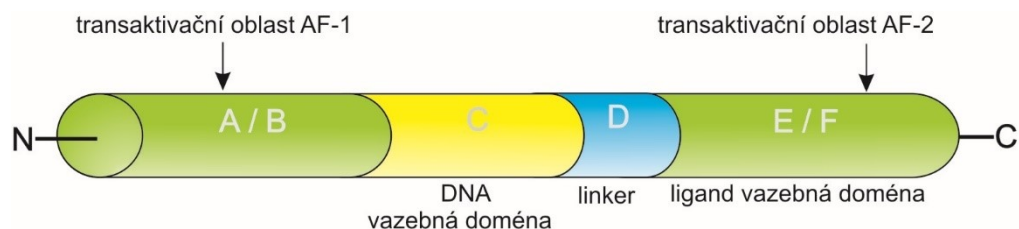
produktů u různých typů tkání a byly aplikovány na zvířecí modely včetně primátů (Stieger et al., 2009).

4 Receptor pro ekdyson a jeho využití pro indukibilní expresi transgenů

4.1 Ekdyson a jeho role v regulaci genové exprese

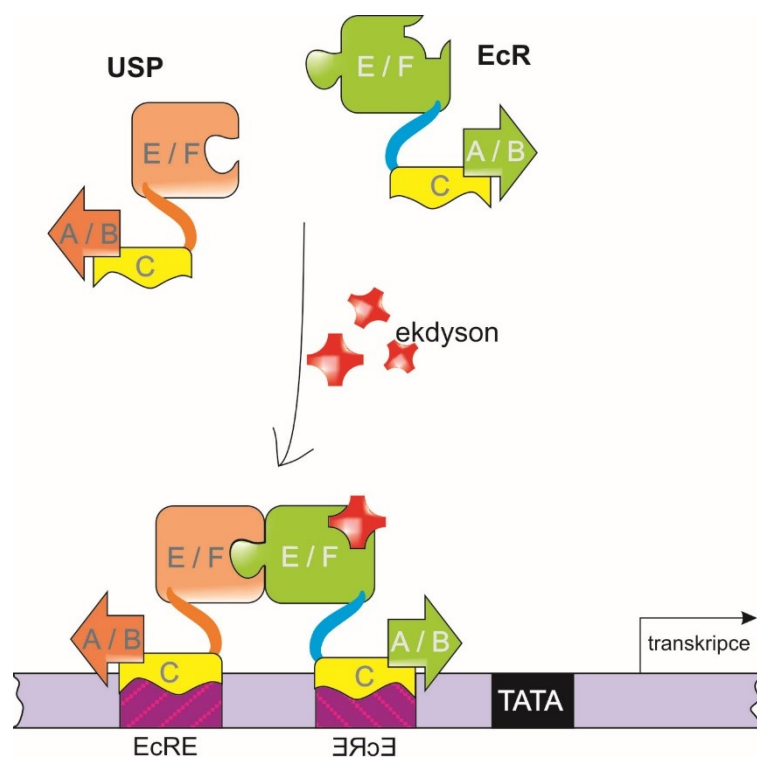
Steroidní hormon ekdyson je klíčovým regulátorem vývoje hmyzu. V průběhu larválního stádia je buňkami v hmyzím mozku uvolňován prothoracikotropní hormon, který je jedním z hlavních stimulů pro produkci ekdysonu prothorakální žlázou (Kodrík, 2014). Ekdyson je následně uvolňován do hemolymfy, kde jej monooxygenáza P450 přemění na 20-hydroxyekdyson, jenž prostřednictvím vazby na jaderné receptory spouští řadu procesů spojených se svlékáním a metamorfózou (Petryk et al., 2003). Hlavním jaderným receptorem pro 20-hydroxyekdyson je heterodimer proteinů EcR (ecdysone receptor) a USP (ultraspiracle) (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992).

Jaderné receptory steroidních hormonů mají multidoménovou strukturu – obsahují N-terminální doménu s transaktivační oblastí nazývanou AF-1, vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu a s ní flexibilním linkerem spojenou ligand vazebnou doménu na C-konci proteinu, která obsahuje druhou transaktivační oblast AF-2 (Obr. 4) (Griekspoor et al., 2007). Ligand vazebná doména je tvořena 12 α -helixy, které svým uspořádáním vytváří hydrofobní kapsu, do které se ligand váže. Po jeho navázání dojde k výrazné konformační změně a vzniku prostoru pro interakci s koaktivátory, které se na receptor váží prostřednictvím krátkého LXXLL motivu (Wurtz et al., 1996; Heery et al., 1997). Tyto koregulátory přispívají svou aktivitou k remodelaci chromatinu a iniciaci transkripce (Griekspoor et al., 2007).



Obr. 4: Schematické znázornění multidoménové struktury jaderných receptorů steroidních hormonů. Dle Griekspoor et al., 2007, upraveno.

Proces aktivace exprese ekdysonem kontrolovaných genů probíhá pravděpodobně následujícím způsobem. V jádře lokalizované EcR a USP nejprve interakcí konzervovaných oblastí nacházejících se na ligand vazebné doméně utvoří EcR-USP dimer, což je nutné pro vazbu jak ligandu, tak DNA. Receptor pomocí DNA vazebných domén specificky rozpoznává krátké invertované repetice šest párů bazí dlouhých elementů na molekule DNA. Interakcí s těmito EcRE (ecdysone response element) se receptor v přítomnosti ligandu podílí na aktivaci transkripce, v jeho nepřítomnosti naopak může hrát roli represoru (Obr. 5). Receptor navázaný na DNA pak slouží jako platforma pro nejružnější komplexy koaktivátorů, respektive korepresorů v případě, že ligand přítomen není (Thomas et al., 1993; Yao et al., 1992; 1993; Buszczak&Se Graves, 1998; Riddiford et al., 2000).



Obr. 5: Zjednodušené schéma indukce exprese ekdysonem regulovaných genů (např. hsp27). Ve struktuře promotoru je zvýrazněn TATA box. Dle Graham, 2002, upraveno.

4.2 Využití EcR pro inducibilní expresi

Ekdyson a další ekdysteroidy nejsou produkovány pouze hmyzem, ale i řadou dalších organismů a patologicky se vyskytují i v těle člověka. Nicméně za normálních okolností savci tyto hormony neprodukují. Díky tomu, že steroidní hormony savců nejsou schopné aktivovat hmyzí receptory pro ekdyson, jsou tyto receptory vhodné pro regulaci exprese transgenů v savčích buňkách (Bajguz et al., 2015; Lansoud-Soukate et al., 1990; Graham, 2002). Inducibilní expresní systémy založené na indukci steroidními hormony mají oproti zmíněným tetracyklinem indukovaným

systémům řadu výhod. Kromě snazšího pronikání steroidních hormonů do buněk a tkání a nízké toxicity někteří autoři pozorovali i nižší bazální expresi a vyšší inducibilitu systému (No et al., 1996).

Christopherson a kolektiv (1992) použili EcR z *Drosophila melanogaster* pro inducibilní expresi reportérového genu pod virovým promotorem se čtyřmi kopiemi EcRE v kultuře lidských buněk. Bylo zjištěno, že na rozdíl od buněk hmyzu v savčích buňkách ekdyson ani 20-hydroxyekdyson expresi prostřednictvím EcR neindukují. Nicméně indukce lze dosáhnout použitím jejich analogu – muristeronu A. Autoři testovali i různé fúzní EcR receptory, z nichž nejlepších výsledků dosáhl protein obsahující transaktivační doménu VP16 herpes simplex viru, DNA vazebnou doménu glukokortikoidního receptoru a ligand vazebnou doménu EcR. Dále bylo experimentálně ověřeno, že DNA vazebnou doménu EcR lze nahradit DNA vazebnou doménou bakteriálního represoru a získat tak receptor, který specificky váže příslušné bakteriální regulační elementy na DNA a zároveň je schopný aktivovat transkripci (Christopherson et al., 1992). Konzervovaná multidoménová struktura jaderných steroidních receptorů tak umožňuje vytvářet rekombinantní receptory žádaných vlastností.

4.2.1 VgEcR-RXR systém

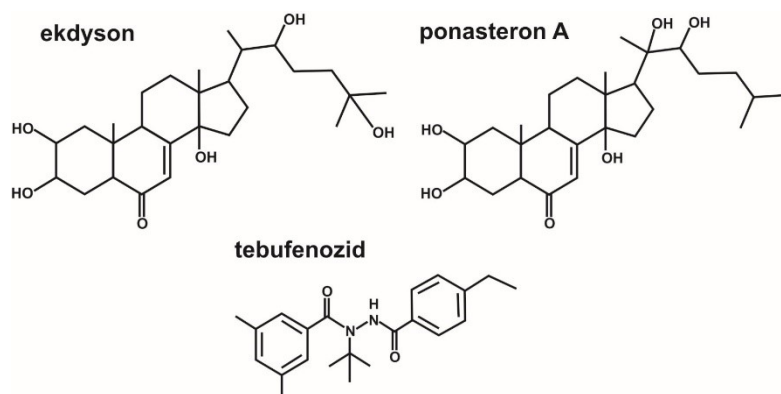
Jak již bylo zmíněno, ekdyson aktivuje v hmyzích buňkách expresi díky vazbě na heterodimer EcR-USP a zdá se, že i v případě použití u savčích buněk je přítomnost obou podjednotek heterodimeru s výhodou (Yao et al., 1992; 1993). EcR je však schopný tvořit heterodimer nejen s USP, ale i s jeho savčím homologem RXR (retinoid-X receptor) (Thomas et al., 1993). No a kolektiv (1996) úspěšně indukovali expresi reportérového genu u dvojité transgenních myši vykazujících stabilní expresi VpEcR (tj. EcR receptor s VP16 transaktivační doménou) a RXR v T-lymfocytech. Protože by EcRE motiv používaný v konstruktech pro inducibilní exprese mohl být v savčích buňkách rozeznán jiným receptorem, než je žádoucí, byla mutována DNA vazebná doména VpEcR receptoru tak, aby více připomínala DNA vazebnou doménu glukokortikoidního receptoru. Výsledný receptor, označovaný jako VgEcR, pak specificky rozeznával nový motiv nazývaný E/GRE (No et al., 1996). Wang a kolektiv (1998) využili tento systém pro inducibilní expresi p53 v buněčné linii lidského nádoru plic, která daný protein vůbec neprodukuje. Autoři pozorovali, že zvýšená exprese p53 vedla k nevratnému zastavení růstu rakovinných buněk a senescenci. Dále bylo zjištěno, že absence p53 může být příčinou odolnosti rakovinných buněk k některým druhům chemoterapie (Wang et al., 1998).

4.2.2 EcR receptor *Bombyx mori* a chimérické receptory

Ačkoliv buňky savců RXR receptor většinou přirozeně produkují, u některých typů buněk je jeho exprese slabá. Proto bylo nutné vnášet do buněk na vektoru nejen rekombinantní EcR, ale i RXR pod silným promotorem, neboť EcR vyžaduje velké množství RXR receptorů, aby mohl po přidání ligandu aktivovat expresi (Thomas et al., 1993). Zvýšená exprese RXR však způsobuje, že se tento receptor sám váže na modifikované EcRE sekvence a aktivuje transkripci i v neindukovaném stavu, dokonce i když EcR není vůbec přítomen, což má za následek zvýšenou bazální expresi (Hoppe et al., 2000). Alternativní řešení našli Suhr a kolektiv (1998), kteří zjistili, že EcR receptor bource morušového (*Bombyx mori*) vykazuje vyšší schopnost tvořit heterodimery s RXR a pro heterodimerizaci i indukci exprese mu stačí i relativně malé množství tohoto proteinu. Kombinací částí EcR receptorů obou zmíněných druhů byl vytvořen chimérický receptor DB-EcR nesoucí VP16 transaktivační doménu a DNA vazebnou doménu VgEcR. Tyto domény zajistí specifické rozeznání E/GRE motivu a účinnou aktivaci transkripce, zatímco efektivní dimerizaci umožní ligand vazebná doména EcR *Bombyx mori* (Hoppe et al., 2000). Ukázkou úspěšné aplikace jiného chimérického EcR receptoru je RHeoSwitch systém. Jeho hlavními komponentami jsou fúzní EcR receptor vzniklý spojením ligand vazebné domény EcR receptoru *Choristoneura occidentalis* s DNA vazebnou doménou transkripčního faktoru Gal4 *Saccharomyces cerevisiae* a jeho dimerizační partner – RXR protein s VP16 transaktivační doménou. Gal4-EcR receptor se tak váže na UAS element, což je sekvence rozeznávaná Gal4, a pokud je přítomen ligand, dojde k tvorbě heterodimeru s VP16-RXR a iniciaci transkripce (Karns et al., 2001). Dále je možné i použití EcR receptoru, který vedle jeho vlastní ligand vazebné domény obsahuje i VP16 transaktivační doménu a DNA vazebnou i homodimerizační doménu z Gal4. Tento chimérický receptor nazývaný GvEcR netvoří heterodimery, ale aktivuje expresi jako homodimer (Esengil et al., 2007; Lee et al., 2016).

4.2.3 Využití u jiných skupin organismů

Ačkoliv byly systémy založené na indukci ekdysteroidy primárně určeny pro regulaci genové exprese u savců s možným budoucím uplatněním v genové terapii člověka, později byly úspěšně aplikovány i u jiných organismů, včetně rostlin a hub (Tavva et al., 2006; Gamboa-Meléndez&Judelson, 2015). Dai a kolektiv (2005) použili u hmyzích buněk zmíněný Gal4-EcR receptor v kombinaci s RXR nesoucím aktivační domény k regulované expresi difterického toxinu, který má velmi silné cytotoxické účinky i v malých množstvích, a na tomto příkladu demonstrovali velmi nízkou hodnotu bazální exprese v neindukovaném stavu, které je tento systém schopen dosáhnout. Praktické využití EcR-USP systému našli Ito-Harashima a kolektiv (2017), kteří vytvořili kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* produkující EcR a USP receptory tří různých druhů hmyzu a protein taiman, což je koaktivátor steroidních receptorů u *D. melanogaster*. Tyto kmeny nesoucí zároveň vektor pro EcR-USP regulovanou expresi reportérového genu by, jak autoři navrhují, mohly sloužit pro levnou a snadnou detekci agonistů EcR receptorů, a tedy k testování potenciálních insekticidů (Ito-Harashima et al., 2017).



Obr. 6: Struktura vybraných agonistů receptoru pro ekdyson. Dle Bajguz et al., 2015, upraveno.

4.2.4 Látky užívané k indukci EcR-RXR a příbuzných systémů

Analogy ekdysonu používané pro inducibilní expresi se většinou získávají z rostlin, které je přirozeně produkují, mimo jiného i na obranu proti hmyzu. Vedle muristeronu A lze k indukci exprese pomocí EcR použít i další phytoekdysteroidy, například ponasteron A či C. K tomuto účelu se používají i nesteroidní agonisté EcR receptoru – dibenzoylhydraziny tebufenozid, methoxyfenozid či GS-E (Obr. 6) (Bajguz et al., 2015; Saez et al., 2000; Graham, 2002). Co se týče systémů založených též na použití RXR receptoru, inducibilitu lze v takovém případě zvýšit přidáním přirozeného ligandu RXR receptoru – kyseliny 9-*cis*-retinové či jiných, syntetických ligandů ve směsi s ligandem pro EcR.

Kvůli možnému pleiotropnímu účinku se však nedoporučuje jejich dlouhodobá aplikace u savčích buněk (Saez et al., 2000; Boehm et al., 1995).

5 Inducibilní expresní systémy používané u parazitických organismů

Ročně umírají na následky onemocnění způsobených parazitickými prvky stovky tisíc lidí (WHO, 2018). Pro účinnou léčbu těchto onemocnění je nutné hledat terapeutika, která zasáhnou a pomohou specificky eliminovat právě dané parazitické organismy a zároveň co nejméně poškodí jejich hostitele, což vyžaduje znalost biologických procesů obou zúčastněných. Vedle omezení zdravotních rizik a ekonomických ztrát však může studium procesů probíhajících v buňkách parazitických prvků vést i k poznání zcela unikátních mechanismů (Benne et al., 1986). Ačkoliv jsou jednobuněční parazité často extrémně adaptováni na specifické podmínky těl svých hostitelů a jejich kultivace *in vitro* je mnohdy náročná, některé z nich se podařilo nejen dlouhodobě kultivovat mimo hostitele ale také úspěšně transformovat vložením cizorodé DNA (Meissner et al., 2007).

Dnes je dostupná řada možností, jak manipulovat s genovou expresí parazitických prvků včetně několika inducibilních expresních systémů, které budou stručně popsány v této kapitole. Příklady použití těchto expresních systémů jsou shrnuty v tabulce na konci kapitoly (Tab.1). Budou zmíněny i systémy, které *de facto* nepatří mezi expresní systémy v běžném smyslu – systém regulace na úrovni stability proteinu (pomocí destabilizačních domén a auxinem indukovatelné degradace) a inducibilní Cre rekombinace.

Aplikace inducibilních expresních systémů běžně používaných u bakteriálních či eukaryotických modelových organismů (*E. coli*, *S. cerevisiae* atd.) na jednobuněčné parazity je často problematická zejména proto, že o mechanismech genové exprese parazitických protist se ví stále velmi málo a ani příbuznost parazitických druhů nemusí být zárukou toho, že proces zjištěný u jednoho organismu bude stejně funkční i druhého, což platí například pro dráhu RNA interference (Meissner&Soldati, 2005; Baum et al., 2009; DaRocha et al., 2004). Řešením může být využití inducibilních systémů založených na rozdílné genové expresi některých genů u různých stádií parazitických organismů, tedy použití endogenních regulačních elementů pro ‚zapínání a vypínání‘ exprese vybraného genového produktu, ovšem za podmínky, že je znám způsob, jak *in vitro* indukovat přechod do jiného stádia (Ghedin et al., 1998; Hehl et al., 2000; Combe et al., 2009). Nevýhoda tohoto přístupu tkví kromě jiného také v tom, že většinou není znám přesný mechanismus, jakým k této stádium-specifické aktivaci genové exprese dochází. Oproti tomu, systémy založené na dobře prostudovaných regulačních elementech bakteriálního či virového původu bývají velmi specifické, ale pro jejich aplikaci na vybraný organismus je nezbytná znalost například struktury

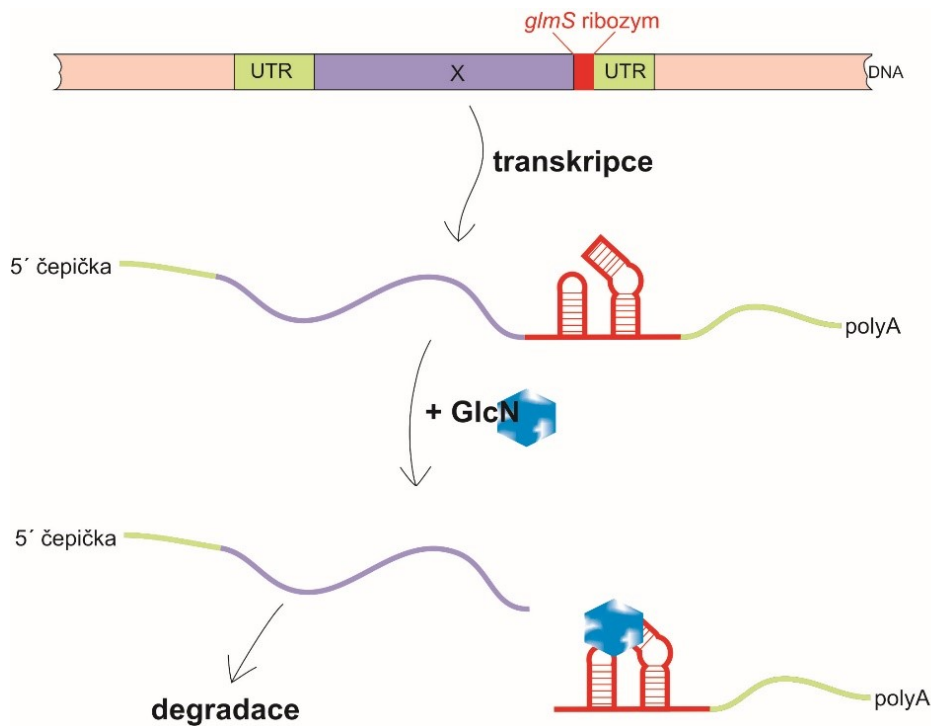
promotorů, mechanismů posttranskripčních modifikací, degradace proteinů atd. u konkrétního organismu. Případně je vhodné nejprve otestovat různá složení a uspořádání konkrétního inducibilního konstruktů za použití reportérových genů (Sun et al., 2000; 2005; Wirtz&Clayton,1995).

5.1 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni transkripce

Nejčastěji používané u parazitických organismů jsou právě systémy založené na regulaci transkripce pomocí interakce TetR represoru s operátorem a u některých organismů je to možnost zatím jediná, co se inducibilní exprese týče (Meissner&Soldati, 2005; Ortiz&Johnson, 2003). U *Trypanosoma brucei* byly použity i další systémy založené na represorem regulovatelných bakteriálních operonech – *lac* operonu *E. coli*, *p-cym* a *p-cmt* operonu *Pseudomonas putida* a *van* operonu *Caulobacter crescentus*, které je všechny možné kombinovat právě s tetracyklinem regulovatelnou expresí genů a získat tak dva různé, nezávisle regulovatelné genové produkty v jedné buňce (Tschopp et al., 2011; Mullick et al., 2006; Sunter, 2016; Gitzinger et al., 2011; Li et al., 2017). U rodů *Toxoplasma* a *Plasmodium* se používají také transaktivátory vzniklé fúzí TetR represoru s transkripci aktivující doménou specifickou pro Apikomplexa (TRAD, TATi) (Meissner et al., 2002; Pino et al., 2012; Meissner et al., 2005; Ehlgen et al., 2012). Kromě toho, že k expresi za použití transaktivátorů dochází v nepřítomnosti tetracyklinu (resp. anhydrotetracyklinu), je oproti původnímu systému rozdíl i v počtu operátorů – zatímco v prvním případě pro umlčení exprese represorem stačí menší počet operátorů (1-2) a navýšení jejich počtu může negativně ovlivnit expresi v indukovaném stavu, u transaktivátorů se používá vyšší počet operátorů (obvykle 7) (Bringaud et al., 2000; Sun&Tai, 2000; Meissner et al., 2002; Meissner et al., 2005). V každém případě je zásadní i výběr vhodného promotoru, do kterého se sekvence operátoru umístí. Většinou se jedná o promotory, které umožňují velmi intenzivní transkripci, například u *Trypanosoma brucei* se pro tyto účely používá dobře charakterizovaný PARP (procyclic acidic repetitive protein) promotor nebo na stádiu nezávislý rRNA promotor – oba rozeznávané RNA polymerázou I (Wirtz&Clayton, 1995; Niemirowicz et al., 2018). Kompatibilní s použitím *tet* operátorů je i transkripce zajišťovaná fágovou T7 RNA polymerázou specificky rozeznávající T7 promotor (Wen et al., 2001; DaRocha et al., 2004; Wickstead et al., 2002). TetR-*tetO* systém se mimo jiné hodí i pro regulovanou expresi antisense RNA a pro vytvoření knockdown fenotypu pomocí dráhy RNA interference, která je u některých parazitických prvků funkční (Kolev et al., 2011; Bringaud et al., 2000; Shi et al., 2000).

5.2 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni stability mRNA

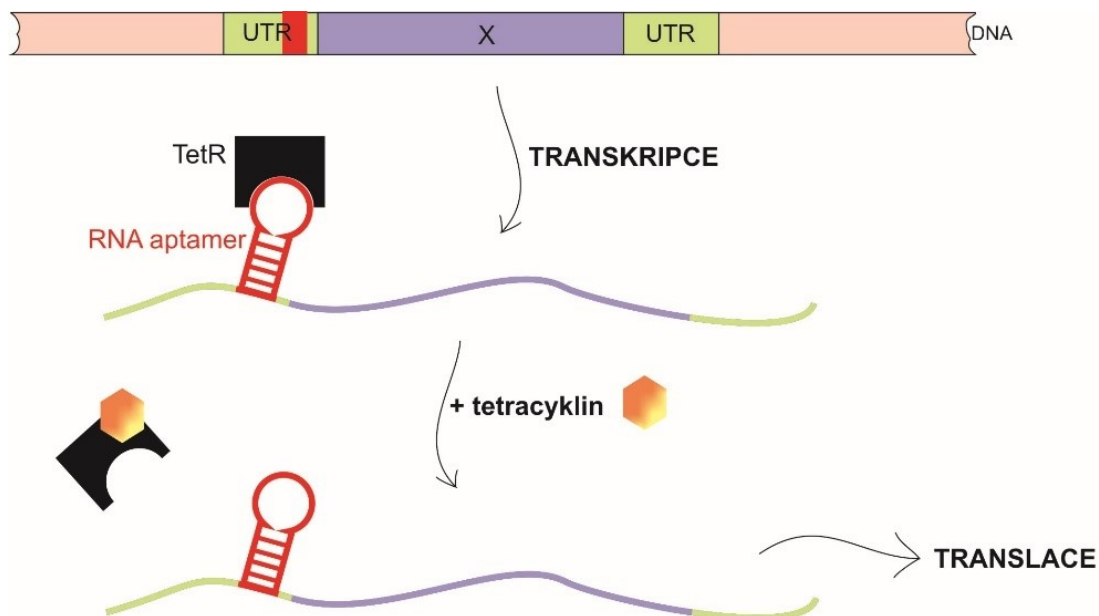
Katalyticky aktivní RNA – ribozymy, jejichž aktivitu lze modifikovat přidáním určité látky, mohou být využity pro manipulaci s množstvím konkrétní mRNA, a tedy i daného proteinu. U parazitických prvoků byly zatím k tomuto účelu použity dva různé ribozymy – *glmS* ribozym vyskytující se u *Bacillus subtilis* a dalších gram-pozitivních bakterií a Sm1 hammerhead ribozym objevený u *Schistosoma mansoni*. *glmS* riboswitch je schopen sám sebe štěpit po navázání molekuly glukosamin-6-fosfátu. Tato látka je produktem enzymu, který vzniká expresí *glmS* genu, v jehož 5'UTR oblasti se nachází právě zmíněný autokatalytický RNA element (Winkler et al., 2004; Watson&Fedor, 2011). V případě *Plasmodium falciparum* a *Trypanosoma brucei* byla sekvence tohoto RNA elementu vložena mezi gen zájmu a příslušnou 3'UTR oblast, aby po indukci štěpení glukosamin-6-fosfátem byla 3'UTR oblast oddělena od zbytku transkriptu (Obr. 7). mRNA, která takto přijde o polyA sekvenci na 3' konci je následně degradována (Prommana et al., 2013; Cruz-Bustos et al., 2018). Agop-Nersesian a kolektiv (2008) se pokusili využít pro degradaci mRNA reportérového genu u *P. falciparum* a *T. gondii* deriváty Sm1 ribozymu, které umístili před start kodon tak, aby po naštěpení autokatalytickou RNA došlo k oddělení 5'UTR a degradaci transkriptu. Na rozdíl od *glmS* ribozymu, Sm1 ribozymy nevyžadují pro svou autokatalytickou funkci žádné speciální látky, naopak je třeba používat inhibitory pro zmírnění jejich aktivity. Analog adenosinu toyocamycin sice inhibuje aktivitu Sm1 ribozymu, nicméně ve zmíněném experimentu byl funkční jen u *T. gondii*, a i tak se ukázalo, že není příliš vhodným inhibitorem, protože je toxický a má negativní vliv na expresi obecně, a to včetně reportérového genu, jehož mRNA stabilizuje (Agop-Nersesian et al., 2008).



Obr. 7: Indukce štěpení *glmS* ribozymem přidáním molekuly glukosaminu. Dle Prommana et al., 2013, upraveno.

5.3 Inducibilní expresní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni translace

Belmont a Niles (2010) získali pomocí *in vitro* selekce metodou SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) sadu RNA aptamerů – oligonukleotidů schopných se specificky vázat na bakteriální represor TetR. Pokud se vlásenkovité struktury aptamerů nacházejí před start kodonem v 5'UTR oblasti genu, tak na ně se vázající represor může velmi účinně bránit translaci dané mRNA (Obr. 8) (Goldfless et al., 2012). Goldfless a kolektiv (2014) aplikovali tento systém, který umožňuje umlčení a reverzibilní zahájení exprese vybraného proteinu přidáním anhydrotetracyklinu, u *P. falciparum*. Fúzí TetR s vybranými proteiny *P. falciparum*, které vykazovaly homologii s regulátory translace kvasinky *S. cerevisiae* (TetR-DOZI a TetR-CITH), byl vytvořen velmi efektivní systém, jehož schopnost inhibice translace může být dále navýšena přidáním RNA aptamerů i do 3'UTR oblasti transgenu. Tento systém tak zahrnuje nejen specifickou interakci bakteriálního represoru s aptamery, ale také využití endogenních regulačních mechanismů buňky vedoucích ke zvýšené degradaci represorem „označené“ mRNA (Ganesan et al., 2016).



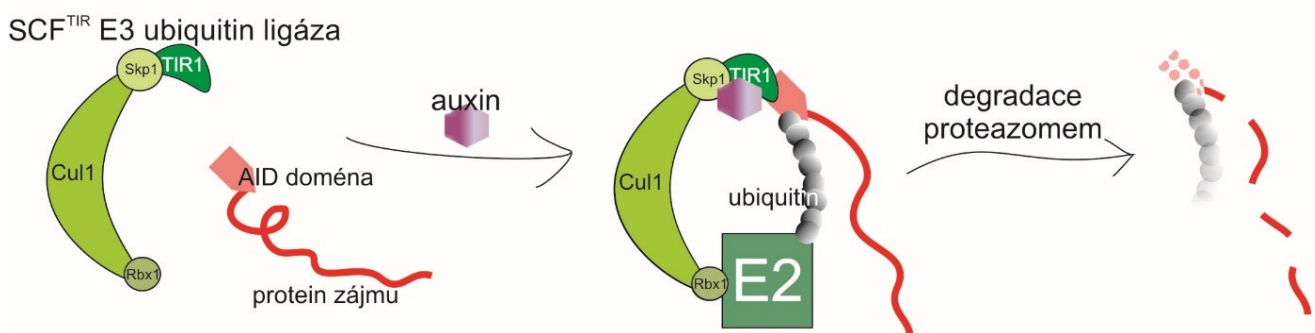
Obr. 8: Schematické znázornění regulace translace pomocí RNA aptameru. Dle Goldfless et al., 2012, upraveno.

5.4 Inducibilní systémy u parazitických protist: regulace na úrovni stability proteinu

U parazitických prvoků bylo zatím popsáno použití dvou typů destabilizačních domén – ddFKBP a ddDHFR. ddFKBP je destabilizační doména odvozená od lidského proteinu FKBP12 (FK506-binding protein 12). Pokud je doména součástí proteinu (na jeho N- či C-konci), způsobuje jeho rychlou degradaci proteazomem. Degradaci proteinu lze zabránit přidáním ligandů – rapamycinu, FK506 nebo syntetickým ligandem Shield-1 (Banaszynski et al., 2006). Tento způsob inducibilní degradace byl funkční u řady parazitických organismů (*T. cruzi*, *P. falciparum*, *T. gondii*, *E. histolytica*, *L. mexicana*, *L. major*) a ve většině případů byl jako ligand destabilizační domény použit Shield-1. Nicméně Liu a Singh (2014) na základě srovnání stabilizace proteinu různými ligandy u *Entamoeba histolytica* dospěli k závěru, že cenově dostupnější ligandy ddFKBP – rapamycin a FK506 – plní svou funkci stejně dobře jako Shield-1. Je však na místě podotknout, že při použití této destabilizační domény bylo velmi často možné detekovat zbytky daného proteinu i bez stabilizace ligandem (Armstrong&Goldberg, 2007; Ma et al., 2012; Azevedo et al., 2013; Wheeler et al., 2015). Efektivitu degradace lze zvýšit pomocí silně destabilizující mutace zmíněné domény nazývané dd_{TM} (Dvorin et al., 2010). Druhou často používanou destabilizační doménou je ddDHFR původem z dihydrofolát reduktázy *E. coli*, jejímž stabilizačním ligandem je trimethoprim (TMP)

(Iwamoto et al., 2010). Ma a kolektiv (2015) použili tuto destabilizační doménu k regulovatelné produkci různých toxických proteinů a vytvoření ‚sebevražedného‘ kmene *Trypanosoma cruzi*, který by mohl sloužit jako atenuovaná vakcína chránící hostitele před Chagasovou chorobou. Zajímavým zjištěním bylo, že degradace ddDHFR označených proteinů je závislá na teplotě a při nižších teplotách (23 °C) není příliš efektivní, což omezuje využitelnost tohoto systému (Podešvová et al., 2017).

Alternativou ke zmíněným destabilizačním doménám je využití mechanismu auxinem indukované degradace (AID). Jde o dráhu vyskytující se u rostlinných buněk, která zajišťuje specifickou degradaci represorů AUX/IAA rodiny pomocí auxin-specifické SCF^{TIR} E3 ubiquitin ligázy. SCF^{TIR} se skládá z několika různých proteinů a po vazbě auxinu na TIR1 receptor komplexu přímo interaguje se zmíněnými transkripčními faktory a zároveň s E2 ubiquitin konjugujícím enzymem, který daný AUX/IAA represor označí jako určený k degradaci proteazomem (Obr. 9) (Nishimura et al., 2009; Dharmasiri et al., 2005; Tan et al., 2007). Použití tohoto systému u parazitických prvoků má dvě základní podmínky, a to expresi TIR1 podjednotky SCF komplexu, která se přirozeně vyskytuje pouze u rostlin, a dále ‚označení‘ proteinu zájmu na jednom z konců auxinem regulovatelným represorem (např. IAA17 z *Arabidopsis thaliana*) (Kreidenweiss et al., 2013). Protože je tento systém funkční i při nižší teplotách (21 °C), Philip a Waters (2015) jej úspěšně aplikovali při testování funkce kalcineurinu u různých stádií *Plasmodium berghei*, včetně stádií v hmyzím vektoru.



Obr. 9: Schematické znázornění auxinem řízené degradace proteinů. Dle Nishimura et al., 2009, upraveno.

5.5 Inducibilní systémy u parazitických protist: DiCre rekombináza

Cre je místně specifická rekombináza bakteriofága P1 katalyzující rekombinaci mezi dvěma *loxP* místy - 34 párů bazí dlouhými sekvenčními motivy obsahujícími palindromické sekvence (Nagy, 2000; Abremski&Hoess, 1984). Jullien a kolektiv (2003) vytvořili a testovali několik variant dimerizující Cre rekombinázy (DiCre). Tento enzym je tvořen dvěma oddělenými fragmenty Cre rekombinázy, které jsou přes polypeptidový linker spojené s rapamycin vázající doménou – FKBP12 nebo FRB. Samostatné fragmenty postrádají aktivitu, ale po přidání rapamycinu dimerizují a vytváří funkční rekombinázu (Jullien et al., 2003; 2007). Varianta DiCre složená z FKBP-Cre59 a FRB-Cre60 byla použita u *T. gondii*, *P. falciparum* a *L. mexicana* (Andematten et al., 2013; Colins et al., 2013; Duncan et al., 2016). Santos a kolektiv (2017) vytvořili buněčnou linii *L. major*, která kromě stabilní exprese DiCre rekombinázy nese i gen zájmu ohraničený *loxP* místy. Gen je však vložen v nesprávné orientaci, a tedy jeho expresí nevzniká funkční protein. Po aktivaci DiCre dojde k rekombinaci a „obrácení“ genu zájmu do správné orientace a zahájení exprese daného proteinu. Navrácení genu do původního nefunkčního uspořádání brání mutovaná *loxP* místa, která po první rekombinaci dají vznik jednomu funkčnímu a jednomu mutovanému *loxP* místu, ke kterému má DiCre výrazně sníženou afinitu (Santos et al., 2017).

Tabulka 1: Přehled použití indukibilních expresních systémů u parazitických prvoků.

Druh organismu	Typ indukibilního systému	Použitá indukující molekula	Indukce na úrovni:	Reference
<i>Trypanosoma brucei</i>	TetR - <i>tetO</i>	tetracyklin	transkripce	Wirtz&Clayton (1995); Biebinger et al. (1997); Wirtz et al. (1999); Ochatt et al. (1999); Bringaud et al. (2000); Shi et al. (2000); Kelly et al. (2007); Sunter et al. (2012); Niemirowicz et al. (2018)
	TetR - <i>tetO</i> - indukibilní T7 promotor	tetracyklin	transkripce	Wickstead et al. (2002); Alford et al. (2005); Alibu et al. (2005); Kelly et al. (2007); Poon et al. (2012)
	LacI - <i>lacO</i>	IPTG	transkripce	Tschopp et al. (2011)
	VanR - <i>vanO</i>	kyselina vanilinová (kyselina 4-hydroxy-3-methoxybenzoová)	transkripce	Sunter (2016)
	CymR - <i>cuO</i>	kyselina 4-isopropylbenzoová	transkripce	Li et al. (2017)
	<i>glmS</i> ribozym	GlcN6P (glukosamin-6-fosfát)	stability mRNA	Cruz-Bustos et al. (2018)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TetR - <i>tetO</i> - indukibilní T7 promotor	tetracyklin	transkripce	Wen et al. (2001); DaRocha et al. (2004)
	ddFKBP	Shield-1	stability proteinu	Ma et al. (2012)
	ddDHFR	TMP-laktát	stability proteinu	Ma et al. (2015)
<i>Leishmania chagasi</i>	TetR - <i>tetO</i> - indukibilní T7 promotor	doxycyklin	transkripce	Yao et al. (2007)
<i>Leishmania donovani</i>	stádium-specifická exprese			Ghedini et al. (1998)
	TetR - <i>tetO</i>	tetracyklin	transkripce	Yan et al. (2001); Yan et al. (2002)
<i>Leishmania major</i>	ddFKBP	Shield-1, rapamycin, FK506	stability proteinu	da Silva et al. (2009)
	DiCre rekombinace	rapamycin	dimerizace	Santos et al. (2017)
<i>Leishmania mexicana</i>	TetR - <i>tetO</i> - indukibilní T7 promotor	tetracyklin	transkripce	Kraeva et al. (2014)
	ddFKBP	Shield-1	stability proteinu	Wheeler et al. (2015)
	DiCre rekombinace	rapamycin	dimerizace	Duncan et al. (2016)
	ddDHFR	TMP, TMP-laktát	stability proteinu	Podešvová et al. (2017)
<i>Leishmania tarentolae</i>	TetR - <i>tetO</i> - indukibilní T7 promotor	tetracyklin	transkripce	Kushnir et al. (2005)

Tabulka 1: (druhá část)

Druh organismu	Typ inducibilního systému	Použitá indukující molekula	Indukce na úrovni:	Reference
<i>Giardia intestinalis</i>	TetR - <i>tetO</i>	tetracyklin	transkripce	Sun&Tai (2000); Sun et al. (2005); Touz et al. (2005)
	stádium-specifická exprese		transkripce	Hehl et al. (2000)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TetR - <i>tetO</i>	tetracyklin	transkripce	Ortiz&Johnson (2003)
<i>Plasmodium berghei</i>	stádium-specifická exprese			Combe et al. (2009)
	TRAD - <i>tetO</i>	anhydrotetracyklin	transkripce	Pino et al. (2012)
	AID	auxin	stabilita proteinu	Philip&Waters (2015)
	TetR - <i>tetO</i>	anhydrotetracyklin	transkripce	Wang et al. (2017)
<i>Plasmodium falciparum</i>	TATi - <i>tetO</i>	anhydrotetracyklin	transkripce	Meissner et al. (2005); Ehlgén et al. (2012)
	ddFKBP	Shield-1	stability proteinu	Armstrong&Goldberg (2007); Russo et al. (2009); Azevedo et al. (2013)
	Sm 1 hammerhead ribozym	toyocamycin	stability mRNA	Agop-Nersesian et al. (2008)
	DDTM (derivát ddFKBP)	Shield-1	stability proteinu	Dvorin et al. (2010)
	ddDHFR	TMP	stability proteinu	Muralidharan et al. (2011)
	DiCre rekombinace	rapamycin	dimerizace	Colins et al. (2013)
	<i>glmS</i> ribozym	GlcN6P (glukosamin-6-fosfát)	stability mRNA	Prommana et al. (2013)
	AID	auxin a jeho deriváty	stability proteinu	Kreidenweiss et al. (2013)
	TetR - RNA aptamer	anhydrotetracyklin	translace, (stabilita mRNA)	Goldfless et al. (2014); Ganesan et al. (2016)
<i>Toxoplasma gondii</i>	TetR - <i>tetO</i>	anhydrotetracyklin	transkripce	Meissner et al. (2001); Gissot et al. (2017)
	TATi - <i>tetO</i>	anhydrotetracyklin	transkripce	Meissner et al. (2002)
	ddFKBP	Shield-1	stability proteinu	Herm-Götz et al. (2007)
	Sm 1 hammerhead ribozym	toyocamycin	stability proteinu	Agop-Nersesian et al. (2008)
	DiCre rekombinace	rapamycin	dimerizace	Andematten et al. (2013)
	AID	auxin	stability proteinu	Brown et al. (2018)
<i>Entamoeba histolytica</i>	TetR - <i>tetO</i>	tetracyklin	transkripce	Ramakrishnan et al. (1997); Hamann et al. (1997); Vines et al. (1998); Ramakrishnan et al. (2001); Katz et al. (2003)
	ddFKBP	Shield-1, rapamycin, FK506	stability proteinu	Liu&Singh (2014)
	ddDHFR	TMP	stability proteinu	Liu&Singh (2014)

6 Závěr

Inducibilní expresní systémy představují užitečný nástroj pro studium buněčných procesů. Jejich použití umožňuje získat buněčné linie, u kterých lze teoreticky vyvolat či naopak umlčet produkci libovolného genového produktu v časovém rozmezí několika hodin či dní. Využití je lze jak pro produkci proteinů ve velkých množstvích v bakteriálních kulturách, tak i pro jemnou modulaci hladiny genových produktů u eukaryotických buněk. Řadu inducibilních expresních systémů je možné použít i pro studium a regulaci buněčných pochodů u parazitických prvoků, ačkoliv u některých z nich je repertoár použitelných inducibilních systémů velmi omezený.

Inducibilní expresní systémy se neustále vyvíjejí. Původní systémy jsou modifikovány, aby odpovídaly nárokům na expresi různých genových produktů v různých organismech, a aplikací rozličných regulátorů exprese vznikají systémy nové, nabízející dosud nevídané možnosti. Relativně novým trendem v oblasti inducibilní exprese jsou expresní systémy regulované světlem o určité vlnové délce. Tyto systémy umožňují velmi rychlou a specifickou kontrolu exprese proteinů zájmu s minimálním negativním vlivem na zkoumané organismy. Tento efektivní a levný způsob indukce exprese by tak mohl v budoucnu nahradit chemicky indukované expresní systémy.

7 Literatura

Přehledové články (review) jsou označeny hvězdičkou *

Abremski, K., & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1509-1514.

Adari, H., Andrews, B., Ford, P. J., Hanning, G., Brosius, J., & Makrides, S. C. (1995). Expression of the human T-Cell receptor V β 5.3 in *Escherichia coli* by thermal induction of the *trc* promoter: Nucleotide sequence of the *lacI* gene. *DNA and cell biology*, 14(11), 945-950.

Agop-Nersesian, C., Pfahler, J., Lanzer, M., & Meissner, M. (2008). Functional expression of ribozymes in Apicomplexa: towards exogenous control of gene expression by inducible RNA-cleavage. *International journal for parasitology*, 38(6), 673-681.

Alibu, V. P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., & Horn, D. (2005). A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 139(1), 75-82.

Alsford, S., Kawahara, T., Glover, L., & Horn, D. (2005). Tagging a *T. brucei* RRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Molecular and biochemical parasitology*, 144(2), 142-148.

Andenmatten, N., Egartner, S., Jackson, A. J., Jullien, N., Herman, J. P., & Meissner, M. (2013). Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nature methods*, 10(2), 125.

Andrews, K. J., & Lin, E. C. (1976). Thiogalactoside transacetylase of the lactose operon as an enzyme for detoxification. *Journal of bacteriology*, 128(1), 510.

Armstrong, C. M., & Goldberg, D. E. (2007). An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nature methods*, 4(12), 1007-1009.

Azevedo, M. F., Sanders, P. R., Krejany, E., Nie, C. Q., Fu, P., Bach, L. A., ... & Gilson, P. R. (2013). Inhibition of *Plasmodium falciparum* CDPK1 by conditional expression of its J-domain demonstrates a key role in schizont development. *Biochemical Journal*, 452(3), 433-441.

Baim, S. B., Labow, M. A., Levine, A. J., & Shenk, T. (1991). A chimeric mammalian transactivator based on the *lac* repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5072-5076.

Bajguz, A., Bąkała, I., & Talarek, M. (2015). Ecdysteroids in plants and their pharmacological effects in vertebrates and humans. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 45, pp. 121-145). Elsevier. *

Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. L., & Wandless, T. J. (2006). A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, 126(5), 995-1004.

Barkley, M. D., Riggs, A. D., Jobe, A., & Bourgeois, S. (1975). Interaction of effecting ligands with *lac* repressor and repressor-operator complex. *Biochemistry*, 14(8), 1700-1712.

Baum, J., Papenfuss, A. T., Mair, G. R., Janse, C. J., Vlachou, D., Waters, A. P., ... & de Koning-Ward, T. F. (2009). Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic acids research*, 37(11), 3788-3798.

Belmont, B. J., & Niles, J. C. (2010). Engineering a Direct and Inducible Protein–RNA Interaction To Regulate RNA Biology. *ACS chemical biology*, 5(9), 851-861.

- Benne, R., van der Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., van Boom, J. H., Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46(6), 819-826.
- Bertrand, K. P., Postle, K., Wray Jr, L. V., & Reznikoff, W. S. (1983). Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene*, 23(2), 149-156.
- Bertrand, K. P., Postle, K., Wray Jr, L. V., & Reznikoff, W. S. (1984). Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant. *Journal of bacteriology*, 158(3), 910-919.
- Besse, M., von Wilcken-Bergmann, B., & Müller-Hill, B. (1986). Synthetic lac operator mediates repression through lac repressor when introduced upstream and downstream from lac promoter. *The EMBO journal*, 5(6), 1377-1381.
- Biebinger, S., Wirtz, L. E., Lorenz, P., & Clayton, C. (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, 85(1), 99-112.
- Boehm, M. F., Zhang, L., Zhi, L., McClurg, M. R., Berger, E., Wagoner, M., ... & Nadzan, A. M. (1995). Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *Journal of medicinal chemistry*, 38(16), 3146-3155.
- Borowiec, J. A., Zhang, L., Sasse-Dwight, S., & Gralla, J. D. (1987). DNA supercoiling promotes formation of a bent repression loop in lac DNA. *Journal of molecular biology*, 196(1), 101-111.
- Brenowitz, M., Pickar, A., & Jamison, E. (1991). Stability of a Lac repressor mediated" looped complex". *Biochemistry*, 30(24), 5986-5998.
- Bringaud, F., Robinson, D. R., Barradeau, S., Biteau, N., Baltz, D., & Baltz, T. (2000). Characterization and disruption of a new Trypanosoma brucei repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. *Molecular and biochemical parasitology*, 111(2), 283-297.
- Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103(7), 1143-1154.
- Brosius, J., Erfle, M., Storella, J. (1985). Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3539-3541.
- Brown, K. M., Long, S., & Sibley, L. D. (2018). Conditional knockdown of proteins using Auxin-inducible degron (AID) Fusions in Toxoplasma gondii. *Bio-protocol*, 8(4). e2728.
- Budkevich, T. V., El'skaya, A. V., & Nierhaus, K. H. (2008). Features of 80S mammalian ribosome and its subunits. *Nucleic acids research*, 36(14), 4736-4744.
- Bukrinsky, M. I., Barsov, E. V., & Shilov, A. A. (1988). Multicopy expression vector based on temperature-regulated lac repressor: expression of human immunodeficiency virus env gene in Escherichia coli. *Gene*, 70(2), 415-417.
- Busby, S., & Ebright, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of molecular biology*, 293(2), 199-213. *
- Buszczak, M., & Segraves, W. A. (1998). Drosophila metamorphosis: the only way is USP?. *Current Biology*, 8(24), R879-R882. *

- Calos, M. P. (1978). DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature*, 274(5673), 762.
- Collins, C. R., Das, S., Wong, E. H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., ... & Blackman, M. J. (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.
- Combe, A., Giovannini, D., Carvalho, T. G., Spath, S., Boisson, B., Loussert, C., ... & Ménard, R. (2009). Clonal conditional mutagenesis in malaria parasites. *Cell host & microbe*, 5(4), 386-396.
- Cronin, C. A., Gluba, W., & Scrable, H. (2001). The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes & development*, 15(12), 1506-1517.
- Cruz-Bustos, T., Ramakrishnan, S., Cordeiro, C. D., Ahmed, M. A., & Docampo, R. (2018). A Riboswitch-based Inducible Gene Expression System for *Trypanosoma brucei*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(3), 412-421.
- da Silva, L. M., Owens, K. L., Murta, S. M., & Beverley, S. M. (2009). Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7583-7588.
- Dai, X., Willis, L. G., Palli, S. R., & Theilmann, D. A. (2005). Tight transcriptional regulation of foreign genes in insect cells using an ecdysone receptor-based inducible system. *Protein expression and purification*, 42(2), 236-245.
- DaRocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M., & Donelson, J. E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 133(2), 175-186.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(1), 21-25.
- Deuschle, U., Meyer, W. K., & Thiesen, H. J. (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Molecular and cellular biology*, 15(4), 1907-1914.
- Deutscher, J., Francke, C., & Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(4), 939-1031.
*
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041), 441-445.
- Dingermann, T., Frank-Stoll, U., Werner, H., Wissmann, A., Hillen, W., Jacquet, M., & Marschalek, R. (1992). RNA polymerase III catalysed transcription can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by the bacterial tetracycline repressor-operator system. *The EMBO journal*, 11(4), 1487-1492.
- Dubendorf, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology*, 219(1), 45-59.
- Duncan, S. M., Myburgh, E., Philippon, C., Brown, E., Meissner, M., Brewer, J., & Mottram, J. C. (2016). Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. *Molecular microbiology*, 100(6), 931-944.
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., ... & Baker, D. A. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*, 328(5980), 910-912.

- Ecco, G., Imbeault, M. & Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development*, 144(15), 2719-2729. *
- Eckert, B., & Beck, C. F. (1989). Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *Journal of bacteriology*, 171(6), 3557-3559.
- Ehlgen, F., Pham, J. S., de Koning-Ward, T., Cowman, A. F., & Ralph, S. A. (2012). Investigation of the Plasmodium falciparum food vacuole through inducible expression of the chloroquine resistance transporter (PfCRT). *PLoS One*, 7(6), e38781.
- Eismann, E. R., & Müller-Hill, B. (1990). lac repressor forms stable loops in vitro with supercoiled wild-type lac DNA containing all three natural lac operators. *Journal of molecular biology*, 213(4), 763-775.
- Epps, H. M., & Gale, E. F. (1942). The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of Escherichia coli: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochemical Journal*, 36(7-9), 619.
- Esengil, H., Chang, V., Mich, J. K., & Chen, J. K. (2007). Small-molecule regulation of zebrafish gene expression. *Nature chemical biology*, 3(3), 154-155.
- Faryar, K., & Gatz, C. (1992). Construction of a tetracycline-inducible promoter in Schizosaccharomyces pombe. *Current genetics*, 21(4-5), 345-349.
- Fieck, A., Wyborski, D. L., & Short, J. M. (1992). Modifications of the E. coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic acids research*, 20(7), 1785-1791.
- Figge, J., Wright, C., Collins, C. J., Roberts, T. M., & Livingston, D. M. (1988). Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by E. coli lac repressor in monkey cells. *Cell*, 52(5), 713-722.
- Freundlieb, S., Schirra-Müller, C., & Bujard, H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *The journal of gene medicine*, 1(1), 4-12.
- Frohberg, C., Heins, L., & Gatz, C. (1991). Characterization of the interaction of plant transcription factors using a bacterial repressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10470-10474.
- Furth, P. A., St Onge, L., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H. & Hennighausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(20), 9302-9306.
- Gamboa-Meléndez, H., & Judelson, H. S. (2015). Development of a bipartite ecdysone-responsive gene switch for the oomycete P hytophthora infestans and its use to manipulate transcription during axenic culture and plant infection. *Molecular plant pathology*, 16(1), 83-91.
- Ganesan, S. M., Falla, A., Goldfless, S. J., Nasamu, A. S., & Niles, J. C. (2016). Synthetic RNA-protein modules integrated with native translation mechanisms to control gene expression in malaria parasites. *Nature communications*, 7, 10727.
- Gatz, C., Kaiser, A., & Wendenburg, R. (1991). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 227(2), 229-237.
- Geiduschek, E. P., & Tocchini-Valentini, G. P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Annual review of biochemistry*, 57(1), 873-914. *
- Ghedini, E., Charest, H., Zhang, W. W., Debrabant, A., Dwyer, D., & Matlashewski, G. (1998). Inducible expression of suicide genes in Leishmania donovani amastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 22997-23003.

- Gilbert, W., & Maxam, A. (1973). The nucleotide sequence of the lac operator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3581-3584.
- Gissot, M., Hovasse, A., Chaloin, L., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., & Tomavo, S. (2017). An evolutionary conserved zinc finger protein is involved in *Toxoplasma gondii* mRNA nuclear export. *Cellular microbiology*, 19(2), e12644.
- Gitzinger, M., Kemmer, C., Fluri, D. A., Daoud El-Baba, M., Weber, W., & Fussenegger, M. (2011). The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic acids research*, 40(5), e37-e37.
- Goldfless, S. J., Belmont, B. J., de Paz, A. M., Liu, J. F., & Niles, J. C. (2012). Direct and specific chemical control of eukaryotic translation with a synthetic RNA–protein interaction. *Nucleic acids research*, 40(9), e64-e64.
- Goldfless, S. J., Wagner, J. C., & Niles, J. C. (2014). Versatile control of *Plasmodium falciparum* gene expression with an inducible protein–RNA interaction. *Nature communications*, 5, 5329.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547-5551.
- Gossen, M., Bonin, A. L., Freundlieb, S., & Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Current opinion in biotechnology*, 5(5), 516-520. *
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766-1769.
- Gottesman, S. (1990). Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. *Methods in enzymology*, 185, 119-129. *
- Graham, L. D. (2002). Ecdysone-controlled expression of transgenes. *Expert opinion on biological therapy*, 2(5), 525-535. *
- Griekspoor, A., Zwart, W., Neefjes, J., & Michalides, R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear receptor signaling*, 5(1), nrs-05003. *
- Guan, L., & Kaback, H. R. (2006). Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 67-91. *
- Guillaume, G., Ledent, V., Moens, W., & Collard, J. M. (2004). Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microbial Drug Resistance*, 10(1), 11-26.
- Gülland, U., & Hillen, W. (1992). The Tn10-encoded tetR mRNA has heterogeneous 5' ends in vivo and in vitro. *Gene*, 114(1), 97-101.
- Haberman, R. P., McCown, T. J., & Samulski, R. J. (1998). Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene therapy*, 5(12), 1604-1611.
- Hamann, L., Buß, H., & Tannich, E. (1997). Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 84(1), 83-91.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., & Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), 733-736.
- Hehl, A. B., Marti, M., & Kohler, P. (2000). Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein–green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1789-1800.

- Herm-Götz, A., Agop-Nersesian, C., Münter, S., Grimley, J. S., Wandless, T. J., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2007). Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. *Nature methods*, 4(12), 1003.
- Herzenberg, L. A. (1959). Studies on the induction of beta-galactosidase in a cryptic strain of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 31(2), 525-538.
- Herzenberg, L. A. (1961). Isolation and identification of derivatives formed in the course of intracellular accumulation of thiogalactosides by *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 93(2), 314-315.
- Hillen, W., & Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn 10 encoded tetracycline resistance. *Annual review of microbiology*, 48(1), 345-369. *
- Hillen, W., Schollmeier, K., & Gatz, C. (1984). Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the tet operon regulatory region. *Journal of molecular biology*, 172(2), 185-201.
- Hoppe, U. C., Marbán, E., & Johns, D. C. (2000). Adenovirus-mediated inducible gene expression in vivo by a hybrid ecdysone receptor. *Molecular Therapy*, 1(2), 159-164.
- Hu, M. C. T., & Davidson, N. (1987). The inducible Iac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell*, 48(4), 555-566.
- Chalmers, R., Sewitz, S., Lipkow, K., & Crellin, P. (2000). Complete nucleotide sequence of Tn10. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2970-2972.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(2), 232-260. *
- Christopherson, K. S., Mark, M. R., Bajaj, V., & Godowski, P. J. (1992). Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(14), 6314-6318.
- Isackson, P. J., & Bertrand, K. P. (1985). Dominant negative mutations in the Tn10 tet repressor: evidence for use of the conserved helix-turn-helix motif in DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(18), 6226-6230.
- Ito-Harashima, S., Matsuura, M., Kawanishi, M., Nakagawa, Y., & Yagi, T. (2017). New reporter gene assays for detecting natural and synthetic molting hormone agonists using yeasts expressing ecdysone receptors of various insects. *FEBS open bio*, 7(7), 995-1008.
- Iwamoto, M., Björklund, T., Lundberg, C., Kirik, D., & Wandless, T. J. (2010). A general chemical method to regulate protein stability in the mammalian central nervous system. *Chemistry & biology*, 17(9), 981-988.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3), 318-356. *
- Jensen, P. R., Westerhoff, H. V., & Michelsen, O. (1993). The use of lac-type promoters in control analysis. *European journal of biochemistry*, 211(1-2), 181-191.
- Jobe, A., & Bourgeois, S. (1972). lac repressor-operator interaction: VI. The natural inducer of the lac operon. *Journal of molecular biology*, 69(3), 397-408.
- Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J. L., Cremer, H., & Herman, J. P. (2007). Conditional transgenesis using dimerizable Cre (DiCre). *PLoS one*, 2(12), e1355.

- Jullien, N., Sampieri, F., Enjalbert, A., & Herman, J. P. (2003). Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic acids research*, *31*(21), e131-e131.
- Karns, L. R., Kisielewski, A., Gulding, K. M., & Theodorescu, D. (2001). Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts. *BMC biotechnology*, *1*(1), 11.
- Katz, U., Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Milstein, O., Mirelman, D. (2003). Comparison between constitutive and inducible plasmid vectors used for gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, *128*(2), 229-233.
- Kelly, S., Reed, J., Kramer, S., Ellis, L., Webb, H., Sunter, J., ... & Carrington, M. (2007). Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Molecular and biochemical parasitology*, *154*(1-4), 103.
- Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K., Hillen, W., & Saenger, W. (1995). The Complex formed between tet repressor and tetracycline-Mg² reveals mechanism of antibiotic resistance. *Journal of molecular biology*, *247*(2), 260-280.
- Kodrík, D. (2014). Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu. *Živa*, *5*, 206-208. *
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segreaves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., & Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, *67*(1), 59-77.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., & Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annual review of biochemistry*, *62*(1), 749-797. *
- Kolev, N. G., Tschudi, C., & Ullu, E. (2011). RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryotic cell*, *10*(9), 1156-1163. *
- Kraeva, N., Ishemgulova, A., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2014). Tetracycline-inducible gene expression system in *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, *198*(1), 11-13.
- Kreidenweiss, A., Hopkins, A. V., & Mordmüller, B. (2013). 2A and the auxin-based degron system facilitate control of protein levels in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, *8*(11), e78661.
- Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R., & Alexandrov, K. (2005). Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein expression and purification*, *42*(1), 37-46.
- Labow, M. A., Baim, S. B., Shenk, T., & Levine, A. J. (1990). Conversion of the lac repressor into an allosterically regulated transcriptional activator for mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, *10*(7), 3343-3356.
- Lansoud-Soukate, J., Gharib, B., Baswaid, S., Capron, A., & de Reggi, M. (1990). Ecdysteroid-like compounds in the serum and urine of African patients infected with *Loa loa* and *Mansonella perstans* microfilariae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(2), 269-271.
- Lee, J., & Goldfarb, A. (1991). Lac repressor acts by modifying the initial transcribing complex so that it cannot leave the promoter. *Cell*, *66*(4), 793-798.
- Lee, S. W., & Edlin, G. (1985). Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene*, *39*(2-3), 173-180.
- Lee, S., Sohn, K. C., Choi, D. K., Won, M., Park, K. A., Ju, S. K., ... & Ro, H. (2016). Ecdysone receptor-based singular gene switches for regulated transgene expression in cells and adult rodent tissues. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *5*, e367.

- Lester, G. (1952). The beta-galactosidase of lactose mutants of *Escherichia coli*, K-12. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40(2), 390-401.
- Li, F. J., Xu, Z. S., Aye, H. M., Brasseur, A., Lun, Z. R., Tan, K. S., & He, C. Y. (2017). An efficient cumate-inducible system for procyclic and bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 214, 101-104.
- Liu, Y. C., & Singh, U. (2014). Destabilization domain approach adapted for regulated protein expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology*, 44(10), 729-735.
- Ma, Y. F., Weiss, L. M., & Huang, H. (2012). A method for rapid regulation of protein expression in *Trypanosoma cruzi*. *International journal for parasitology*, 42(1), 33-37.
- Ma, Y., Weiss, L. M., & Huang, H. (2015). Inducible suicide vector systems for *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection*, 17(6), 440-450.
- Magasanik, B. (1961, January). Catabolite repression. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 26, pp. 249-256). Cold Spring Harbor Laboratory Press. *
- Majors, J. (1975). Specific binding of CAP factor to lac promoter DNA. *Nature*, 256(5519), 672.
- Makman, R. S., Sutherland, E. W. (1965). Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1309-1314.
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). lac operon induction in *Escherichia coli*: systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology*, 157(1), 82-88.
- Marger, M. D., & Saier Jr, M. H. (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in biochemical sciences*, 18(1), 13-20.
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J., & Rauscher, F. J. (1994). Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4509-4513.
- Marschall, L., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2017). Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: promoter systems and genetic constraints. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(2), 501-512. *
- McKay, D. B., Pickover, C. A., & Steitz, T. A. (1982). *Escherichia coli* lac repressor is elongated with its operator DNA binding domains located at both ends. *Journal of molecular biology*, 156(1), 175-183.
- Meier, I., Wray, L. V., & Hillen, W. (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes tetA and tetR by the tandem tet operators O1 and O2. *The EMBO journal*, 7(2), 567-572.
- Meissner, M., & Soldati, D. (2005). The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in *Toxoplasma gondii* and other protozoan parasites. *Microbes and infection*, 7(13), 1376-1384. *
- Meissner, M., Agop-Nersesian, C., & Sullivan, W. J. (2007). Molecular tools for analysis of gene function in parasitic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(5), 963-975. *
- Meissner, M., Brecht, S., Bujard, H., & Soldati, D. (2001). Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic acids research*, 29(22), e115-e115.
- Meissner, M., Krejany, E., Gilson, P. R., de Koning-Ward, T. F., Soldati, D., & Crabb, B. S. (2005). Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2980-2985.

- Meissner, M., Schlüter, D., & Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*, 298(5594), 837-840.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 3(1), 371-394. *
- Müller-Hill, B., Crapo, L., & Gilbert, W. (1968). Mutants that make more lac repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(4), 1259.
- Müller-Hill, B., Rickenberg, H. V., & Wallenfels, K. (1964). Specificity of the induction of the enzymes of the lac operon in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 10(2), 303-318.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., ... & Caron, A. W. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC biotechnology*, 6(1), 43.
- Muralidharan, V., Oksman, A., Iwamoto, M., Wandless, T. J., & Goldberg, D. E. (2011). Asparagine repeat function in a *Plasmodium falciparum* protein assessed via a regulatable fluorescent affinity tag. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(11), 4411-4416.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *genesis*, 26(2), 99-109. *
- Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, 395(5), 559-575. *
- Niemirowicz, G. T., Cazzulo, J. J., Álvarez, V. E., & Bouvier, L. A. (2018). Simplified inducible system for *Trypanosoma brucei*. *PloS one*, 13(10), e0205527.
- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., & Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature methods*, 6(12), 917-923.
- No, D., Yao, T. P., & Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3346-3351.
- Novagen. (1999). *pET system manual 8th Edition*. Novagen, Inc. Dostupné na <https://research.fhrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>
- Ochatt, C. M., Bütikofer, P., Navarro, M., Wirtz, E., Boschung, M., Armah, D., & Cross, G. A. (1999). Conditional expression of glycosylphosphatidylinositol phospholipase C in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 103(1), 35-48.
- Ortiz, D., & Johnson, P. J. (2003). Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 128(1), 43-49.
- Petryk, A., Warren, J. T., Marqués, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., ... O'Connor, M. B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13773-13778.
- Pfahl, M., Gulde, V., & Bourgeois, S. (1979). "Second" and "third operator" of the lac operon: an investigation of their role in the regulatory mechanism. *Journal of molecular biology*, 127(3), 339-344.
- Philip, N., & Waters, A. P. (2015). Conditional degradation of *Plasmodium calcineurin* reveals functions in parasite colonization of both host and vector. *Cell host & microbe*, 18(1), 122-131.
- Pino, P., Sebastian, S., Kim, E. A., Bush, E., Brochet, M., Volkmann, K., ... & Soldati-Favre, D. (2012). A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites. *Cell host & microbe*, 12(6), 824-834.

- Podešvová, L., Huang, H., & Yurchenko, V. (2017). Inducible protein stabilization system in *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, 214, 62-64.
- Poon, S. K., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., & Kelly, S. (2012). A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. *Open biology*, 2(2), 110037.
- Prommana, P., Uthaipibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., ... & Shaw, P. J. (2013). Inducible knockdown of *Plasmodium* gene expression using the glmS ribozyme. *PLoS one*, 8(8), e73783.
- Ramakrishnan, G., Rogers, J., Mann, B. J., Petri Jr, W. A. (2001). New tools for genetic analysis of *Entamoeba histolytica*: blasticidin S deaminase and green fluorescence protein. *Parasitology international*, 50(1), 47-50.
- Ramakrishnan, G., Vines, R. R., Mann, B. J., & Petri Jr, W. A. (1997). A tetracycline-inducible gene expression system in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 84(1), 93-100.
- Reznikoff, W. S., Winter, R. B., & Hurley, C. K. (1974). The location of the repressor binding sites in the lac operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(6), 2314-2318.
- Riddiford, L. M., Cherbas, P., & Truman, J. W. (2000). Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins and hormones*, 60, 1-73. *
- Roderick, S. L. (2005). The lac operon galactoside acetyltransferase. *Comptes rendus biologiques*, 328(6), 568-575. *
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. *
- Russo, I., Oksman, A., Vaupel, B., & Goldberg, D. E. (2009). A calpain unique to alveolates is essential in *Plasmodium falciparum* and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1554-1559.
- Saez, E., Nelson, M. C., Eshelman, B., Banayo, E., Koder, A., Cho, G. J., & Evans, R. M. (2000). Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14512-14517.
- Santos, R. E., Silva, G. L., Santos, E. V., Duncan, S. M., Mottram, J. C., Damasceno, J. D., & Tosi, L. R. (2017). A DiCre recombinase-based system for inducible expression in *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology*, 216, 45-48.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., & Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna*, 6(7), 1069-1076.
- Schultz, D. C., Friedman, J. R., & Rauscher, F. J. (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes & development*, 15(4), 428-443.
- Schumann, W. (2016). Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones*, 21(6), 959-968. *
- Silverstone, A. E., Arditti, R. R., & Magasanik, B. (1970). Catabolite-insensitive revertants of lac promoter mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 773-779.
- Sripathy, S. P., Stevens, J., & Schultz, D. C. (2006). The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Molecular and cellular biology*, 26(22), 8623-8638.

- Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P., & Rolling, F. (2009). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Advanced drug delivery reviews*, 61(7-8), 527-541. *
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1), 207-234.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113-130.
- Suhr, S. T., Gil, E. B., Senut, M. C., & Gage, F. H. (1998). High level transactivation by a modified Bombyx ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7999-8004.
- Sun, C. H., & Tai, J. H. (2000). Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 105(1), 51-60.
- Sun, C. H., Su, L. H., & Gillin, F. D. (2005). Influence of 5' sequences on expression of the Tet repressor in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 142(1), 1-11.
- Sunter, J. D. (2016). A vanillic acid inducible expression system for *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 207(1), 45-48.
- Sunter, J., Wickstead, B., Gull, K., & Carrington, M. (2012). A new generation of T7 RNA polymerase-independent inducible expression plasmids for *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, 7(4), e35167.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7136), 640-645.
- Tavva, V. S., Dinkins, R. D., Palli, S. R., & Collins, G. B. (2006). Development of a methoxyfenozide-responsive gene switch for applications in plants. *The Plant Journal*, 45(3), 457-469.
- Thomas, H. E., Stunnenberg, H. G., & Stewart, A. F. (1993). Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*, 362(6419), 471-475.
- Touz, M. C., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (2005). A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 58(4), 999-1011.
- Tschopp, F., Charriere, F., & Schneider, A. (2011). In vivo study in *Trypanosoma brucei* links mitochondrial transfer RNA import to mitochondrial protein import. *EMBO reports*, 12(8), 825-832.
- van den Bogert, C., Kroon, A. M. (1981). Tissue distribution and effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats. *Biochemical pharmacology*, 30(12), 1706-1709.
- Vines, R. R., Ramakrishnan, G., Rogers, J. B., Lockhart, L. A., Mann, B. J., & Petri Jr, W. A. (1998). Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a β 2 integrin motif. *Molecular biology of the cell*, 9(8), 2069-2079.
- Wang, M., Wang, Q., Gao, X., & Su, Z. (2017). Conditional knock-out of lipoic acid protein ligase 1 reveals redundancy pathway for lipoic acid metabolism in *Plasmodium berghei* malaria parasite. *Parasites & vectors*, 10(1), 315.
- Wang, Y., Blandino, G., Oren, M., & Givol, D. (1998). Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene*, 17(15), 6314-6317.
- Watson, P. Y., & Fedor, M. J. (2011). The glmS riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites in vivo. *Nature structural & molecular biology*, 18(3), 359-363.

- Wen, L. M., Xu, P., Benegal, G., Carvahó, M. R. C., Butler, D. R., & Buck, G. A. (2001). Trypanosoma cruzi: exogenously regulated gene expression. *Experimental parasitology*, 97(4), 196-204.
- Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nature communications*, 6, 8964.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., & Gull, K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, 125(1-2), 211-216.
- Wilson, C. J., Zhan, H., Swint-Kruse, L., & Matthews, K. S. (2007). The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cellular and molecular life sciences*, 64(1), 3-16. *
- Wilson, T. H., & Kashket, E. R. (1969). Isolation and properties of thiogalactoside transacetylase-negative mutants of Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 173(3), 501-508.
- Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., & Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 428(6980), 281-286.
- Wirtz, E., & Clayton, C. (1995). Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science*, 268(5214), 1179-1183.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & Cross, G. M. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(1), 89-101.
- World Health Organization. (2018). *World Malaria Report 2018*. Dostupné z: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>
- Wray, L. V., & Reznikoff, W. S. (1983). Identification of repressor binding sites controlling expression of tetracycline resistance encoded by Tn10. *Journal of bacteriology*, 156(3), 1188-1191.
- Wray, L. V., Jorgensen, R. A., & Reznikoff, W. S. (1981). Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. *Journal of bacteriology*, 147(2), 297-304.
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology*, 3(1), 87-94.
- Yamaguchi, A., Udagawa, T., & Sawai, T. (1990). Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4809-4813.
- Yan, S., Martínez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S., Myler, P. J., & Stuart, K. (2002). A low-background inducible promoter system in Leishmania donovani. *Molecular and biochemical parasitology*, 119(2), 217-223.
- Yan, S., Myler, P. J., & Stuart, K. (2001). Tetracycline regulated gene expression in Leishmania donovani. *Molecular and biochemical parasitology*, 112(1), 61-69.
- Yao, C., Luo, J., Hsiao, C. H. C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2007). Leishmania chagasi: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. *Experimental parasitology*, 116(3), 205-213.
- Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., ... & Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 366(6454), 476-479.
- Yao, T. P., Segraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M., & Evans, R. M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71(1), 63-72.

Yarranton, G. T. (1992). Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5), 506-511. *