

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Vendula Horáčková

**Nové molekulární nástroje pro manipulaci s genovou expresí  
*Giardia intestinalis***

Development of new molecular tools for altering gene expression  
in *Giardia intestinalis*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2022

## **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 25. 4. 2022

.....  
Podpis

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli Pavlu Doležalovi za jeho cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnoval při vedení této práce. Velké díky patří Lubošovi, který mne v začátcích mého působení v laboratoři zasvětil do tajů metod molekulární biologie a kultivace našeho úžasného modelového organismu. Dále děkuji celému týmu naší laboratoře za přátelskou atmosféru a příjemné pracovní prostředí. Děkuji také svým rodičům, bez jejichž podpory by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

## **Abstrakt**

*Giardia intestinalis* je celosvětově rozšířeným parazitickým organismem a původcem průjmového onemocnění člověka a dalších obratlovců. Ačkoliv je známa kompletní sekvence genomu tohoto organismu, o mechanismech regulace exprese jeho genů se ví velmi málo. Spolu s tetraploidním genomem komplikuje tato skutečnost použití řady běžných metod reverzní genetiky. Cílem této práce bylo vyvinout nové nástroje pro manipulaci genové exprese u *G. intestinalis*. Byly vytvořeny konstrukty pro inducibilní expresi genů regulovanou tetracyklinovým represorem za využití T7 promotoru a endogenního *oct* promotoru. Dále byl vytvořen knock-out genu *cwp1* pomocí technologie CRISPR-Cas9. Za účelem modifikace mechanismů oprav dvouřetězcových zlomů vyvolaných Cas9 endonukleázou u *G. intestinalis*, byla v buňkách tohoto organismu vyvolána exprese dvou komponent bakteriální NHEJ dráhy, LigD a Ku.

**Klíčová slova:** inducibilní exprese, CRISPR-Cas9, knock-out, NHEJ, *Giardia intestinalis*

## **Abstract**

*Giardia intestinalis* is a widespread intestinal parasite that causes diarrhea in human and other vertebrate hosts. Although, fully sequenced genome of *G. intestinalis* has been published, very little is known about the regulation of gene expression. Together with the tetraploid genome, this complicates the use of many common reverse genetics methods. The aim of this thesis was to develop new molecular tools that can be used to alter gene expression in *G. intestinalis*. For the purposes of this work, new vectors for tetracycline-inducible gene expression including T7 promoter and endogenous oct promoter were designed. Furthermore, *cwp1* gene knock-out was created using CRISPR-Cas9 technology. In order to modify mechanisms of double strand break repair, expression of two key components of bacterial NHEJ pathway – LigD and Ku – was introduced into cells of *G. intestinalis*.

**Key words:** inducible expression, CRISPR-Cas9, knock-out, NHEJ, *Giardia intestinalis*

# Obsah

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Úvod.....                                                              | 3  |
| 2 Literární přehled.....                                                 | 4  |
| 2.1 <i>Giardia intestinalis</i> a její životní cyklus .....              | 4  |
| 2.2 <i>Giardia intestinalis</i> jako modelový organismus .....           | 5  |
| 2.2.1 Knock-down genů u <i>G. intestinalis</i> .....                     | 6  |
| 2.2.2 Knock-out genů u <i>G. intestinalis</i> .....                      | 6  |
| 2.3 Inducibilní expresní systémy.....                                    | 7  |
| 2.3.1 Inducibilní expresní systémy u <i>G. intestinalis</i> .....        | 7  |
| 2.3.2 Tetracyklinem regulovatelné inducibilní systémy .....              | 7  |
| 2.4 CRISPR-Cas9 systémy .....                                            | 8  |
| 2.4.1 Objev CRISPR-Cas.....                                              | 9  |
| 2.4.2 Struktura CRISPR-Cas lokusu .....                                  | 10 |
| 2.4.3 Mechanismus adaptivní imunity založené na CRISPR-Cas systému ..... | 12 |
| 2.4.4 Aktuální rozdělení CRISPR-Cas systémů.....                         | 14 |
| 2.4.5 Využití CRISPR-Cas9.....                                           | 15 |
| 2.5 Opravy dvouřetězcových zlomů .....                                   | 16 |
| 2.5.1 Homologní rekombinace.....                                         | 17 |
| 2.5.2 aEJ (alternative end joining) .....                                | 18 |
| 2.5.3 Single-strand annealing (SSA).....                                 | 18 |
| 2.5.4 c-NHEJ (classical non-homologous end joining).....                 | 19 |
| 2.5.5 Regulace reparačních drah u dvouřetězcových zlomů .....            | 21 |
| 3 Cíle práce .....                                                       | 23 |
| 4 Materiál a metodika .....                                              | 24 |
| 4.1 Použité organismy, jejich kultivace a transformace.....              | 24 |
| 4.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....                                      | 24 |
| 4.1.2 <i>Giardia intestinalis</i> .....                                  | 24 |
| 4.2 Použité konstrukty.....                                              | 26 |
| 4.2.1 Konstrukty pro inducibilní expresi.....                            | 26 |
| 4.2.2 Konstrukty pro <i>cwp1</i> knock-out.....                          | 30 |
| 4.2.3 Konstrukty pro testování NHEJ dráhy .....                          | 32 |
| 4.3 Příprava konstruktů .....                                            | 34 |
| 4.3.1 Amplifikace genů.....                                              | 34 |
| 4.3.1.1 Použité primery .....                                            | 36 |
| 4.3.2 Optimalizace kodónového složení genů.....                          | 40 |
| 4.3.3 Klonování.....                                                     | 40 |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.4 Transfekce buněk <i>G. intestinalis</i> .....                                                 | 48  |
| 4.3.5 Testování vytvořených buněčných linií .....                                                   | 50  |
| 5 Výsledky .....                                                                                    | 60  |
| 5.1 Inducibilní expresní systém pro <i>G. intestinalis</i> .....                                    | 60  |
| 5.1.1 Test aktivity T7 RNA polymerázy .....                                                         | 60  |
| 5.1.2 Nové vektory pro expresi T7 RNA polymerázy .....                                              | 63  |
| 5.1.3 Vytvoření vektoru pTetR pro inducibilní expresi .....                                         | 66  |
| 5.1.4 Kontrolní indukce WB buněk .....                                                              | 66  |
| 5.1.5 Testování inducibilní exprese genu <i>g-6-pi</i> na plasmidu pTetR.....                       | 67  |
| 5.1.6 Testování inducibilní exprese <i>g-6-pi</i> na plasmidu pTetR(SV40NLS) .....                  | 70  |
| 5.1.7 Srovnání velikostí G-6-PI v buňkách s jadernou T7 RNAP a bez T7RNAP .....                     | 72  |
| 5.1.8 5'RACE.....                                                                                   | 74  |
| 5.1.9 Testování inducibilní exprese zkrácené verze genu pro MOMP35 na plasmidu pTetR(SV40NLS) ..... | 76  |
| 5.1.10 Testování inducibilní exprese zkrácené verze genu <i>momp35</i> na plasmidu pTetR...         | 76  |
| 5.1.11 Testování inducibilní exprese fúzního genu <i>g-6-pi_momp270</i> na plasmidu pTetR.          | 79  |
| 5.1.12 Testování inducibilní exprese genu pro Bak1 na plasmidu pTetR(SV40NLS) .....                 | 81  |
| 5.1.13 Inducibilní exprese pomocí endogenního <i>oct</i> promotoru (vektor pTetRaII).....           | 82  |
| 5.2 Knock-out genu <i>cwpI</i> .....                                                                | 84  |
| 5.2.1 Exprese Cas9 endonukleázy.....                                                                | 84  |
| 5.2.2 Vektor pTGuide .....                                                                          | 85  |
| 5.2.3 <i>cwpI</i> knock-out .....                                                                   | 86  |
| 5.2.4 Subklonování <i>cwpI</i> -KO linie .....                                                      | 89  |
| 5.2.5 <i>cwpI</i> knock-out – opakování experimentu.....                                            | 92  |
| 5.2.6 <i>cwpI</i> knock-out pomocí PCR produktu .....                                               | 94  |
| 5.3 Oprava DSB u <i>G. intestinalis</i> .....                                                       | 96  |
| 5.3.1 Testování přítomnosti c-NHEJ dráhy u <i>G. intestinalis</i> .....                             | 96  |
| 5.3.2 Zavedení komponent bakteriální NHEJ dráhy do buněk <i>G. intestinalis</i> .....               | 97  |
| 5.3.3 Inhibice NHEJ dráhy pomocí Scr7.....                                                          | 103 |
| 6 Diskuse.....                                                                                      | 106 |
| 6.1 Inducibilní expresní systém u <i>G. intestinalis</i> .....                                      | 106 |
| 6.2 Knock-out genu <i>cwpI</i> .....                                                                | 109 |
| 6.3 Oprava DSB u <i>G. intestinalis</i> .....                                                       | 111 |
| 7 Závěr .....                                                                                       | 116 |
| 8 Seznam použitých zkratk.....                                                                      | 117 |
| 9 Seznam literatury .....                                                                           | 119 |
| 10 Přílohy.....                                                                                     | 129 |

# 1 Úvod

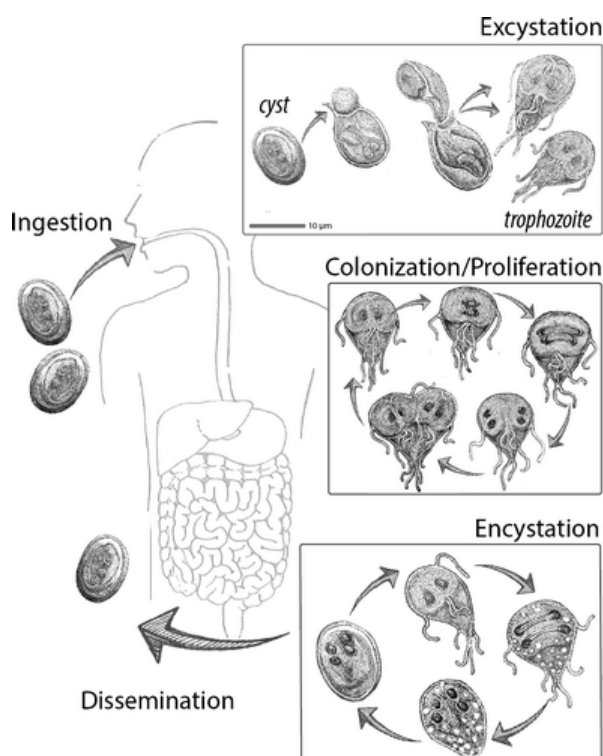
*Giardia intestinalis* je původcem celosvětově rozšířeného průjmového onemocnění giardiózy a přenáší se mezi hostiteli v podobě odolných cyst. Po požití cysty dojde v tenkém střevě hostitele k přeměně cysty na stádium trofozoita, který žije extracelulárně na povrchu střevních mikrokřků. Při průchodu střevem dojde k diferenciaci trofozoita do stádia cysty, která opouští hostitele se stolicí. Podobně jako je tomu u dalších jednobuněčných parazitů jsou i buňky *G. intestinalis* v určitých ohledech výrazně redukovány ať už se jedná o některé chybějící biosyntetické dráhy, anaerobní deriváty mitochondrií neschopné oxidativní fosforylace či redukci komponent vnitrobuněčného transportu. Na druhou stranu buňky tohoto prvoka vynikají například rozvinutým cytoskeletem, pro nějž je charakteristická přítomnost stabilních mikrotubulárních struktur (např. ventrálního disku), tvorbou cystové stěny unikátního složení a schopností antigenní variability. Při studiu těchto a řady dalších buněčných procesů a struktur mohou být uplatněny metody reverzní genetiky, kterými se tato práce zabývá. Konkrétně je v této práci věnována pozornost molekulárním nástrojům, jež umožňují manipulaci genové exprese ve smyslu snížení množství produktu určitého genu (knock-down) nebo jeho úplného odstranění (knock-out). Dalšími nástroji, kterými lze regulovat expresi genů zájmu jsou indukibilní expresní systémy, pomocí nichž je možné zvyšovat či snižovat úroveň exprese genu zájmu obvykle přidáním určité indukující molekuly.

Primárním cílem této práce bylo vytvořit konstrukt pro indukibilní expresi regulovanou tetracyklinovým represorem. Inovací oproti již publikovaným experimentům na toto téma u *G. intestinalis* bylo využití T7 RNA polymerázy. Dalším cílem byla tvorba knock-outu genu *cwp1* pomocí technologie CRISPR-Cas9. S tímto tématem úzce souvisí problematika oprav dvouřetězcových zlomů DNA způsobených Cas9 endonukleázou, neboť na základě reparačních mechanismů, které má buňka k dispozici, může dojít k opravě zlomu různým způsobem za vzniku různých produktů. Jelikož u *G. intestinalis* nebyla prokázána přítomnost reparační dráhy označované jako c-NHEJ, byl proveden pokus o obnovení funkce této dráhy zavedením exprese dvou jejích klíčových komponent původem z *Mycobacterium tuberculosis*. Jedním z výstupů této diplomové práce je i manuskript popisující zavedení metody CRISPR-Cas9 pro *G. intestinalis*, který byl nedávno přijat k publikaci v časopise Open Biology.

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Giardia intestinalis* a její životní cyklus

*Giardia intestinalis* je parazitický jednobuněčný organismus způsobující průjemové onemocnění savců, včetně člověka (Cernikova et al., 2018). Životní cyklus tohoto prvoka zahrnuje dvě hlavní stádia (Obr. 1) – dvoujaderného osmibičíkatého trofozoita s charakteristickým přísavným diskem, který obývá tenké střevo savců, a stádium odolné cysty, jež je hostitelem vylučována do prostředí a slouží jako infekční agens (Einarsson et al., 2016).



**Obrázek 1:** Životní cyklus *Giardia intestinalis*. Po požití cysty hostitelem dochází v duodenu k excystaci a kolonizaci střevních mikrokliků dělicími se trofozoity. Při pohybu trofozoitů do dalších částí tenkého střeva dochází na základě externích stimulů k přeměně na stádium cysty (encystaci), jež tělo hostitele opouští. Převzato z Nosala&Dawson (2015).

Dormantní stádium prvoka chráněné před vlivy vnějšího prostředí 0,3-0,5 µm silnou stěnou se aktivuje při procesu zvaném excystace, který je iniciován kontaktem cysty s kyselým prostředím žaludku hostitele. Následně dojde v duodenu k porušení integrity stěny cysty a z jejího nitra vyleze bičíky napřed čtyřjaderná buňka excyzoita, který po dvou cytokinezích dává vznik čtyřem dvoujaderným trofozoitům (Ward et al., 1997; Bernarder et al., 2001; Ankarklev et al., 2010). Při první cytokinezi, kterou buňka excyzoita prochází, se začíná z cytoskeletálních fragmentů přítomných již ve stádiu cysty utvářet přísavný disk, specializovaná mikrotubulární struktura umožňující trofozoitům přichytit se na stěnu tenkého střeva (Palm et al., 2005; Dawson, 2010).

V duodenu se trofozoiti opakovaně mitoticky dělí a postupně migrují do dalších částí tenkého střeva, kde v reakci na externí stimuly (rostoucí pH, klesající koncentrace cholesterolu, rostoucí

koncentrace žluči) dochází k encystaci – diferenciaci bičíkatého trofozoita do podoby nepohyblivé cysty (Ankarklev et al., 2010). Během tohoto procesu jsou bičíky internalizovány, přisavný disk se rozpadá na fragmenty, buňky se zakulacují a ztrácejí svůj typický kapkovitý tvar (Palm et al., 2005; Lauwaet et al., 2007).

Sacharidovou složku stěny cysty tvoří vlákna homopolymeru  $\beta(1-3)$ -N-acetylgalaktosaminu (označovaného jako giardan), na jehož syntéze z glukózy se podílí enzymy inducibilní biosyntetické dráhy probíhající v cytosolu (Macechko et al., 1992; Gerwig et al., 2002; Karr&Jarroll, 2004). Expresí několika enzymů této dráhy je regulována na úrovni transkripce a regulační oblast genu pro jeden z těchto enzymů, glukosamin-6-fosfát deaminázu (EC 5.3.1.10), je prvním popsáním inducibilním promotorem u *G. intestinalis* (Knodler et al., 1999; Jarroll et al., 2011). Důležitou složkou cystové stěny, která díky interakci s giardanem pravděpodobně propůjčuje cystě její vysoce nerozpustný charakter, jsou i CWP (cyst-wall-protein) proteiny, jejichž exprese mnohonásobně vzrůstá právě u encystujících buněk (Luján et al., 1995; Mowatt et al., 1995; Gerwig et al., 2002; Sun et al., 2003). V souvislosti s touto prací je významný zejména CWP1, jehož exprese je též řízena inducibilním promotorem, který charakterizovali Hehl a kolektiv (2000) a který může být využit k inducibilní expresi rekombinantních proteinů v buňkách *G. intestinalis* (viz následující kapitola).

## **2.2 *Giardia intestinalis* jako modelový organismus**

Ačkoliv má giardióza nezanedbatelný dopad na lidské zdraví a její epidemiologii a léčbě je věnována řada publikací, patogenní působení *G. intestinalis* není jediným aspektem, kterému je u tohoto organismu věnována pozornost. Unikátní molekulárně-biologické a biochemické charakteristiky spolu s nenáročnou kultivací a možností transfekce činí tohoto prvoka vhodným modelovým organismem pro studium nejrozličnějších buněčných struktur a procesů, ať už jde například o flagelární transformaci, mechanismy antigenní variability či anaerobní deriváty mitochondrií (Nohynková et al., 2006; Prucca et al., 2008; Voleman et al., 2017).

Na rozdíl od řady jiných parazitických prvků je možné *G. intestinalis* relativně snadno kultivovat v axenickém médiu, a dokonce ji lze i transfekovat plasmidovou DNA (Keister, 1983; Yee&Nash, 1995; Singer et al., 1998). V současné době se u tohoto organismu jako selekční markery využívají tři různé geny podmiňující rezistenci vůči antibiotikům: gen pro neomycin fosfotransferázu (*neo<sup>r</sup>*), puromycin-N-acetyltransferázu (*pac*), a gen *bsr* (blasticidine S resistance gene z *B. subtilis*) (Yu et al., 1996; Singer et al., 1998; Gourguechon&Cande, 2011). Je s výhodou, že jak proces encystace, tak excystace je možné relativně snadno navodit v laboratorních podmínkách a všechna stadia životního cyklu tak lze pozorovat *in vitro* (Davids&Gillin, 2011). V populaci *in vitro* kultivovaných trofozoitů je však malý výskyt dělicích se buněk, což je problematické pro studium buněčného dělení, navíc u *G. intestinalis* zřejmě z důvodů odlišné regulace buněčného cyklu nelze použít metody synchronizace obvykle používané např. u savčích buněk (Hoyne et al., 1989). Existují však metody, kterými lze populaci trofozoitů nabohatit o mitotické buňky či trofozoity zastavit v rané S-fázi reverzibilní inhibicí DNA polymerázy (Nohynkova et al., 2006; Reiner et al., 2008).

Genom *G. intestinalis* byl kompletně osekvenován, nicméně pro velkou část kódovaných proteinů nebyly nalezeny homology a jejich funkce není známa (Morrison&Svärd, 2011). To se týká i řady faktorů sekretovaných *G. intestinalis* během interakce se střevními buňkami (Ma'ayeh et al., 2017). Z tohoto důvodu je v mnoha případech záhodno využít metod reverzní genetiky, které umožní například úplně odstranit produkt určitého genu či řídit expresi daného produktu pomocí inducibilních expresních systémů, aby bylo možné objasnit funkci daného proteinu.

### 2.2.1 Knock-down genů u *G. intestinalis*

V současné době je známa řada metod pro snížení množství (knock-down) či úplné odstranění (knock-out) produktu určitého genu z buňky, z nichž některé byly použity i u *G. intestinalis*. Dan a kolektiv (2000) využili k tomuto účelu aktivity hammerhead ribozymu, tedy katalyticky aktivní molekuly RNA, která byla včleněna do molekuly antisense RNA. Pomocí virového vektoru odvozeného z GLV (*Giardia lamblia* virus) syntetizovali v buňkách trofozoitů antisense RNA komplementární k mRNA pyruvát ferredoxin oxidoreduktázy a tato antisense RNA obsahovala sekvenci ribozymu, který měl po spárování antisense RNA a mRNA na základě komplementarity cílovou mRNA rozštěpit. Stejným způsobem se Chen a kolektiv (2007) pokusili snížit expresi proteinu KRR1. Ribozymy v obou experimentech *in vitro* mRNA skutečně štěpily a snížení množství mRNA daného genu (respektive snížená aktivita PFOR) bylo pozorováno i *in vivo*, nicméně mRNA genu zájmu se ani v jednom případě plně eliminovat nepodařilo (Dan et al., 2000; Chen et al., 2007). Saraiya a Wang (2008) využili u *G. intestinalis* taktéž aktivity ribozymu pro knock-down jedné z komponent RNA interference.

Regulace genové exprese pomocí RNA interference je vlastní řadě eukaryotických organismů a u některých z nich se této dráhy i využívá pro experimentální potlačení exprese genů (Shabalina&Koonin, 2008; Perrimon et al., 2010). *G. intestinalis* základní komponenty této dráhy má, a dokonce byla *in vivo* prokázána jejich aktivita, pro experimentální manipulaci genové exprese se však RNA interference nevyužívá zřejmě z důvodu její specializované funkce v biologii tohoto prvoka (Ullu et al., 2004; Prucca et al., 2008; Marcial-Quino et al., 2017; Jex et al., 2020).

Pro vytvoření knock-down fenotypu u *G. intestinalis* lze též použít tzv. morfolino oligonukleotidy, které brání translaci zkoumaného genu, či katalyticky neaktivní endonukleázu Cas9 (dCas9), jež reguluje expresi na úrovni transkripce (Carpenter&Cande, 2009; Paredes et al., 2011; Woessner&Dawson, 2012; McNally et al., 2019).

### 2.2.2 Knock-out genů u *G. intestinalis*

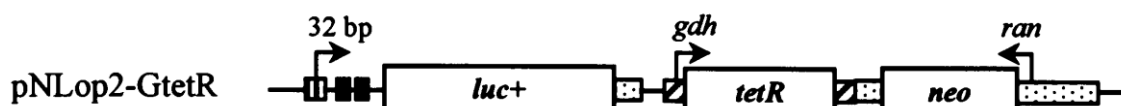
Ačkoliv je známa řada metod, jak docílit snížení exprese genu, vytvořit úplný knock-out je u *G. intestinalis* značně problematické, neboť jde o organismus tetraploidní se dvěma diploidními jádry (avšak ne všechny geny jsou přítomné v obou jádrech – viz Tůmová et al., 2019). První úspěšný knock-out vytvořili Ebner a kolektiv (2016) odstraněním všech funkčních kopií genu *cwpl* z genomu pomocí rekombinázy Cre. Tento časově náročný experiment však vyžadoval několik opakování procesu transfekce a selekce. Odstranit všechny kopie genu *mlf* za využití endonukleázy Cas9 a mechanismů pro opravu poškozené DNA se pokusili Lin a kolektiv (2019).

Výsledkem nicméně bylo pouze snížení exprese zmíněného genu způsobené zřejmě odstraněním jen několika kopií genů. Ke kompletnímu genovému knock-outu tedy nedošlo.

## 2.3 Inducibilní expresní systémy

### 2.3.1 Inducibilní expresní systémy u *G. intestinalis*

Pro výzkum genů, jež mají například potenciál působit na buňky při zvýšené expresi toxicky, je záhodno využít inducibilních expresních systémů, z nichž některé umožňují i velice jemnou regulaci intenzity exprese daného genu. U *G. intestinalis* se pro tyto účely využívá přirozeně inducibilního promotoru genu *cwp1*, k jehož zvýšené expresi dochází při encystaci (Hehl et al., 2000; Hehl et al., 2007; Cernikova et al., 2020). Z důvodu nutnosti vyvolat u buněk (časově omezený) proces encystace, však tato metoda není univerzálně použitelnou strategií. Naproti tomu, systém založený na interakci operátoru a represoru regulovaný přidáním antibiotika tetracyklinu (Obr. 2), jehož použití u *G. intestinalis* poprvé publikovali Sun a Tai (2000), by v ideálním případě umožňoval snadné a reverzibilní vyvolání exprese vybraného genu u trofozoitů. V rámci optimalizace tohoto systému testovali autoři několik různých konstruktů a podmínek pro dosažení žádané intenzity exprese před a po indukci a jejich plasmid pro inducibilní expresi byl v modifikované podobě následně použit v několika dalších experimentech (Sun&Tai, 2000; Touz et al., 2004; Sun et al., 2005; Touz et al., 2005; Rivero et al., 2010). Dle některých autorů však není tento systém dostatečně dobře regulovatelný. Vývoji jiného, na úrovni transkripce regulovatelného, inducibilního systému u *G. intestinalis* nicméně brání současný stav znalostí transkripčních faktorů a struktury regulačních elementů. Charakterizace těchto klíčových transkripčních komponent je komplikovaná vinou jejich značné odlišnosti od ostatních eukaryot. (Adam, 2011; Jex et al., 2020).



**Obrázek 2:** Příklad konstruktů pro inducibilní expresi regulovanou tetracyklinem. Reportérovým genem je v tomto případě luciferáza (*luc*), jejíž aktivita byla nepřímým ukazatelem intenzity exprese. Mezi (32 párů bází dlouhým) syntenickým promotorem genu *ran* (čtverec se svislým šrafováním) a *luc* genem byly umístěny dva *tetO* operátory (černé obdélníky). Klíčovou složkou konstruktů byl gen pro represor TetR pod promotorem genu *gdh*. Dále byl v konstruktu přítomen selekční marker *neo* podmiňující resistenci vůči G418 pod promotorem *ran* (tečkovaný obdélník se šipkou). Převzato ze Sun&Tai (2000).

### 2.3.2 Tetracyklinem regulovatelné inducibilní systémy

Širokospektrá antibiotika tetracykliny díky své interakci s rRNA 30S ribozomální podjednotky blokuji vznik peptidové vazby mezi aminoacyl tRNA a již existujícím peptidem, a tak inhibují proteosyntézu u bakterií (Brodersen et al., 2000). Bakterie vyvinuly několik strategií, jak tomu zabránit – modifikace molekuly tetracyklinu, jež má za následek jeho rychlejší degradaci, mutace v 16S rRNA, na kterou se antibiotikum váže, odstraňování tetracyklinu z jeho vazebného místa na ribozomu a exprese efluxních pump, které transportují tetracyklin ven z buňky (Nguyen et al,

2014). Právě produkce nejrozličnějších proteinů, které buňku před negativním efektem antibiotika chrání, je nutné regulovat, protože jejich konstantní exprese i při absenci tetracyklinu je pro bakterie nevýhodná (Lee&Edlin, 1985; Eckert&Beck, 1989).

Jedním z nejlépe charakterizovaných případů indukibilní exprese u bakterií je exprese genu *tetA* na transpozonu Tn10 u *Escherichia coli*. Jeho produktem je přenašeč, který transportuje tetracyklin ven z buňky do periplasmatického prostoru za využití toku protonů opačným směrem (Yamaguchi et al., 1990; Marger&Saier, 1993). Exprese *tetA* je regulována pomocí represoru TetR, který se v podobě homodimeru váže na sekvenci operátoru nacházející se před genem *tetA* (Wray&Reznikoff, 1983; Isacson&Bertrand, 1985). Po vazbě tetracyklinu do „core“ represoru dojde k destabilizaci vazeb DNA vazebných alfa-helixů s DNA a disociaci represoru, čímž vznikne prostor pro iniciaci transkripce *tetA* z příslušného promotoru (Kisker et al., 1995).

Klíčové komponenty bakteriálního tetracyklinem indukovaného systému regulace exprese – operátor *tetO* a na něj se vážící represor TetR – mohou být využity pro indukibilní expresi nejrozličnějších proteinů v bakteriích, ale i v buňce eukaryotické (u eukaryotických ribozomů vazba tetracyklinu nemá inhibiční efekt na proteosyntézu), což z nich činí nástroj s všestranným využitím (Frohberg et al., 1991; Faryar&Gatz, 1992; Budkevich et al., 2008). Kromě základní podoby systému, kde je do sekvence promotoru vybraného genu vhodně umístěn operátor, s nímž za nepřítomnosti tetracyklinu interaguje TetR represor, byly vyvinuty i nejrozličnější modifikace, například fúze TetR represoru s transkripčními faktory, které naopak umožní v přítomnosti represoru transkripci aktivovat (Gossen&Bujard, 1992).

U tetracyklinem indukované exprese v heterologních systémech je klíčovým faktorem umístění operátoru do promotorové oblasti, což může být problematické zejména u eukaryot, u kterých nejsou dostatečně charakterizovány promotorové oblasti genů (např. *G. intestinalis*) (Sun et al., 2000; Adam, 2011; Jex et al., 2020). Řešením může být použití promotoru specificky rozeznávaného fágovou T7 RNA polymerázou. Tato RNA polymeráza se vyznačuje vysokou procesivitou a pro kompletní transkripci genu nevyžaduje žádné další transkripční faktory, a především je tvořena pouze jedinou podjednotkou, což výrazně usnadňuje její expresi v organismu zájmu (Borkotoky&Murali, 2018). Inducibilní systém založený na aktivitě T7 RNA polymerázy regulované tetracyklinovým represorem je hojně využíván například u některých druhů parazitických trypanosomatid (Wen et al., 2001; Wickstead et al., 2002; Yao et al., 2007; Kraeva et al., 2014).

## 2.4 CRISPR-Cas9 systémy

Viry jsou čtenější než jakýkoliv organismus na planetě a odhaduje se, že například ve vodních prostředích jsou to právě viry, konkrétně bakteriofágy, které zlyžují 4–50 % každodenního přírůstku bakterií (Breitbart&Rohwer, 2005). Bakterie však vyvinuly řadu mechanismů, jak se bakteriofágům účinně bránit, ať už zamezením vazby (adsorbce) virionu na povrch buňky, zabráněním vstupu virové DNA, zastavení replikačního cyklu fága mechanismy abortivní infekce nebo degradací jeho nukleové kyseliny (Labrie et al., 2010). Do poslední zmíněné kategorie patří u bakterií se hojně vyskytující restrikčně-modifikační systémy, které umožňují štěpení do buňky vstoupivší virové DNA pomocí restrikčních enzymů. Právě objev tohoto způsobu obrany

bakteriální buňky proti cizorodé DNA v 50. letech minulého století umožnil později obrovský pokrok na poli molekulární biologie, totiž možnost využití „molekulárních nůžek“ k vytváření rekombinantní DNA a klonování. Na bázi restričních enzymů II. třídy jsou založeny i novější systémy pro místně-specifickou editaci genomů – ZNF a TALEN (Felice et al., 2019).

Stejně jako aplikace restričně-modifikačních systémů znamenal i objev CRISPR-Cas systémů, které jsou součástí prokaryotického arzenálu pro boj s cizorodými nukleovými kyselinami, revoluci v genovém inženýrství. Oproti jiným nástrojům pro editaci genomu má totiž CRISPR-Cas9 obrovskou výhodu – místně specifická aktivita Cas9 je určena párováním molekuly guideRNA a cílové DNA (a nikoliv proteinu a DNA jako je tomu např. u již zmíněných ZNF nukleáz). Díky tomu není nutné měnit aminokyselinovou sekvenci DNA-vazebných domén, neboť stejný enzym lze navést na různá místa v genomu pouhým přidáním jiné guideRNA (Jinek et al., 2012).

### 2.4.1 Objev CRISPR-Cas

V roce 1987 Ishino a kolektiv publikovali analýzu sekvence genu *iap* u *Escherichia coli* kmene K12, při které v oblasti přilehlé k 3' konci zmíněného genu našli pozoruhodný lokus neznámé funkce složený z přímých repetitivních sekvencí a „spacerů“ nacházejících se mezi nimi. Poté byly podobné oblasti nalezeny i v genomech dalších prokaryot (Nakata et al., 1989; Groenen et al., 1993; Hoe et al., 1999; Masepohl et al., 1996; Mojica et al., 1995). Jansen a kolektiv (2002) zjistili, že skupiny těchto repetitivních sekvencí jsou u prokaryot a zejména u termo-extremofilních archeí relativně časté, zatímco u eukaryot a virů se nevyskytují. Společnou vlastností těchto oblastí, označovaných jako CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) je i přítomnost tzv. „leader“ sekvence (300-500 párů bazí dlouhý element ležící na okraji skupiny repetitivních sekvencí) a také *cas* (CRISPR-associated) genů. U produktů *cas* genů byla předpokládána schopnost interakce s DNA a jistá souvislost se vznikem CRISPR lokusů (Jansen et al., 2002). Zdálo se, že spacers jsou unikátní sekvence neznámého původu, pro které mimo CRISPR lokus v rámci tehdy známých bakteriálních genomů nebyly nalezeny žádné homology (van Embden et al., 2000).

Později se díky rostoucímu počtu osekvenovaných genomů podařilo nalézt příslušné homologní sekvence v genomu bakteriofágů a na konjugativních plasmidech (Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005). Tang a kolektiv (2002, 2005) ukázali, že u dvou různých organismů ze skupiny Archea dochází k transkripci CRISPR lokusu z oblasti leader sekvence za vzniku dlouhé molekuly RNA, jež je následně rozštěpena na menší jednotky opakujících se motivů. Dále bylo zjištěno, že molekuly antisense RNA mají inhibiční efekt na proliferaci bakteriofágů v populaci bakterií.

Pro pochopení biologické funkce tohoto systému bylo důležité odhalení souvislosti mezi přítomností CRISPR lokusu u bakterie a její odolností vůči určitému bakteriofágovi a dále též prokazatelná korelace mezi počtem spacer sekvencí v CRISPR lokusu a schopností bakterie odolat invazi bakteriofága. Na základě těchto poznatků byla formulována hypotéza o existenci prokaryotického mechanismu, který se podobá eukaryotické RNA interferenci a který chrání před invazí cizorodé nukleové kyseliny. Jednotlivé spacers v rámci CRISPR lokusu jsou jakýmsi

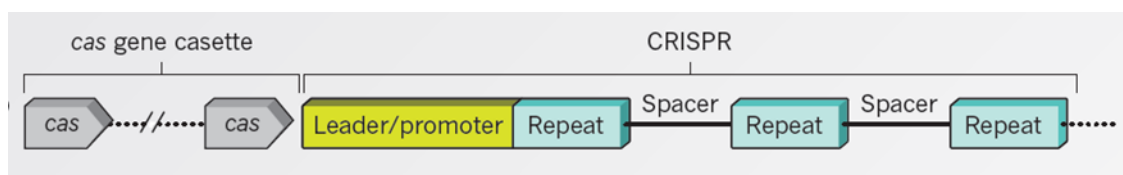
chronologickým záznamem o atacích nejen fágů, ale i dalších extrachromozomálních elementů (např. plasmidů) v minulosti (Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005; Makarova et al., 2006). Makarova a kolektiv (2006) dokonce našli určitou funkční analogii mezi proteiny RNAi mašinerie u eukaryot (Dicer, RNA-vazebné proteiny RISC komplexu atd.) a produkty *cas* genů, u nichž byly též předpokládány nukleázové, helikázové a RNA-vazebné domény.

Funkce CRISPR-Cas systému jakožto mechanismu adaptivní imunity u bakterií byla poprvé prokázána Barrangou a kolektivem (2007) u *Streptococcus thermophilus*, který má v genomu několik CRISPR lokusů. Autoři kultivovali bakterie v přítomnosti bakteriofágů a následně analyzovali získané rezistentní kmeny. U těchto kmenů zjistili přírůstek 1–4 nových spacerů v oblasti mezi leader sekvencí a původními spacery a tyto spacery vykazovaly podobnost se sekvencemi nalezenými v genomu příslušného fága. Experimentální delece nových spacerů vedla ke ztrátě resistance, zatímco umělé přidání těchto spacerů do lokusu u citlivého kmene bakterií vedlo ke vzniku resistance. I inaktivace genu *cas5*, u kterého se předpokládalo, že jeho produktem je nukleáza, vedla ke ztrátě resistance, zatímco inaktivace jiného *cas* genu – *cas7* – citlivost k fágovi nezměnila (Barrangou et al., 2007).

Marrafini a Sontheimer (2008) díky řadě experimentů se dvěma různými kmeny *Staphylococcus epidermidis*, z nichž jeden obsahoval CRISPR lokus a druhý nikoliv, prokázali, že CRISPR-Cas systém nejen chrání své nositele před atakem bakteriofágů, ale dokonce brání i uchování některých plasmidů v buňce. Kmen *S. epidermidis* nesoucí CRISPR lokus se spacerem homologním k *nes* genu vyskytující se na konjugativních plasmidech stafylokoků (jež poskytují svým nositelům resistenci vůči antibiotikům) totiž není schopen takovéto plasmidy udržet v buňce, ať už jsou mu dodávány pomocí konjugace či transformace elektroporací (zatímco kmen bez CRISPR lokusu stejné plasmidy nést může). Autoři jasně prokázali, že právě a jen existence CRISPR lokusu s přidruženými *cas* geny je za tento jev zodpovědná, a také, že molekulou, na kterou produkt spaceru nazývaný crRNA (crispr RNA) cílí, je DNA a nikoliv mRNA, jako je tomu u eukaryotické RNA interference (pozn. neplatí pro všechny CRISPR-Cas systémy – některé umožňují i degradaci molekul RNA – viz Hille et al., 2018; Makarova et al., 2020).

## 2.4.2 Struktura CRISPR-Cas lokusu

CRISPR lokus je složen z přímých repetice dlouhých 21–47 párů bazí, které jsou v rámci konkrétního CRISPR lokusu totožné, co do délky a sekvence, a mezi nimi se nacházejících unikátních sekvencí – spacerů – dlouhých 20–72bp (Obr. 3). Základních jednotek složených z jedné repetice a spaceru může být v jednom CRISPR lokusu až několik stovek (Karginov&Hannon, 2010). Nové spacery jsou přidávány vždy ze strany od leader sekvence, což je oblast dlouhá 300–500 párů bazí, která bývá u všech CRISPR lokusů v rámci jednoho genomu sekvenčně podobná, ale u různých druhů se liší (Jansen et al., 2002; Barrangou et al., 2007; Karginov&Hannon, 2010). Spacery obvykle odpovídají sekvenci na cizorodé (např. fágové) molekule DNA, jež se označuje jako protospacer (Deveau et al., 2008).



**Obrázek 3:** Schematické znázornění CRISPR lokusu s asociovanými *cas* geny. CRISPR se skládá ze série přímých repetice (modré bloky) a unikátních sekvencí zvaných spacers (plné linie mezi repeticemi). Jako promotor při transkripci zde slouží sekvence bohatá na AT páry nazývaná leader (zelený blok). Převzato z Wiedenheft et al. (2012), upraveno.

K protospaceru musí přiléhat PAM (protospacer adjacent motif) sekvence (Obr. 4), která je specificky rozeznávána Cas proteiny (různé CRISPR-Cas systémy využívají různé PAM sekvence) a její přítomnost určuje, zda bude daný protospacer integrován do CRISPR lokusu (Deveau et al., 2008; Horvath et al., 2008; Mojica et al., 2009). PAM motiv umožňuje nukleázám rozpoznat cizorodou DNA, jež obsahuje sekvenci protospaceru a je určena k degradaci, od spaceru přítomného v CRISPR lokusu na vlastním chromozomu, kde PAM přítomen není (Deveau et al., 2008; Sapranaukas et al., 2011). U některých CRISPR-Cas systémů typu III (viz dále) však rozlišení vlastní DNA od cizorodé probíhá jiným způsobem, nezávisle na PAM sekvenci (Marraffini a Sontheimer, 2010). V blízkosti CRISPR lokusu se obvykle nachází skupina *cas* genů, jejichž produkty hrají roli v různých fázích obrany proti cizorodé nukleové kyselině, ovšem ne všechny CRISPR lokusy ve své blízkosti tyto geny mají (Jansen et al., 2002; Horvath et al., 2009; Diez-Villasenor et al., 2010; Makarova et al., 2020).

#### a Viral DNA



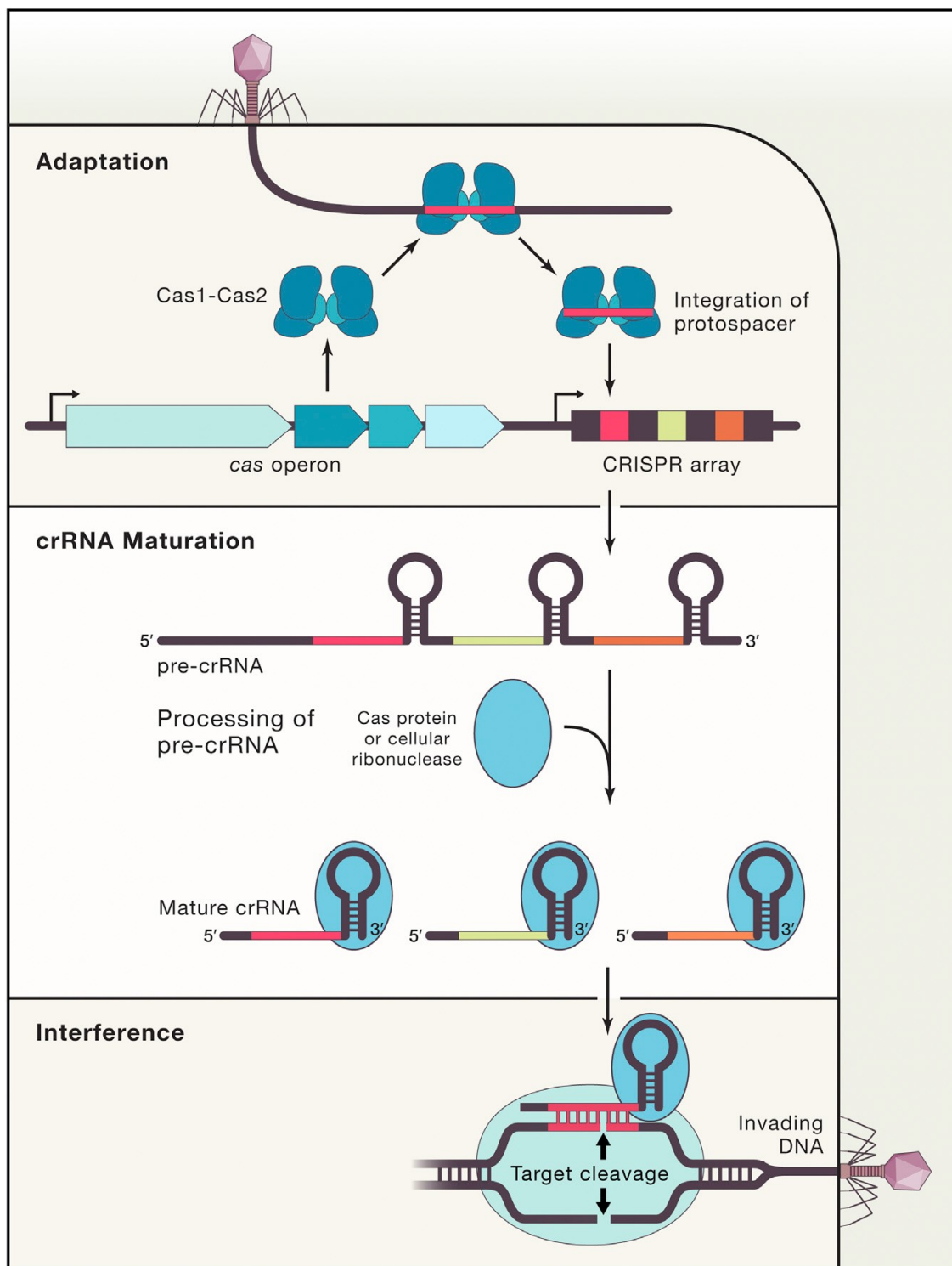
#### b Host DNA



**Obrázek 4:** Začlenění sekvence virové DNA do CRISPR lokusu. Ve fázi adaptace (mechanismus v kapitole 2.4.3) dochází díky proteinům Cas1 a Cas2 k integraci části cizorodé DNA označované jako protospacer (vyznačeno zeleně) mezi CRISPR repetice (černě). V rámci CRISPR se pak příslušná sekvence označuje jako spacer (modře). Blízko protospaceru (nikoliv však spaceru) se nachází PAM motiv (červeně). Převzato z Bhaya et al. (2011), upraveno.

### 2.4.3 Mechanismus adaptivní imunity založené na CRISPR-Cas systému

Působení CRISPR-Cas systémů lze rozdělit do tří fází (Obr. 5). První z nich – fáze adaptace (někdy označována jako fáze imunizace či „spacer acquisition“) – spočívá v rozeznání vhodné sekvence (protospaceru) na cílové molekule DNA, jejím zpracování a začlenění mezi repetitivní sekvence v CRISPR lokusu (Hille et al., 2018). Nové sekvence (spacery) jsou do lokusu vkládány chronologicky za sebou tak, že spacer získaný během posledního útoku se nachází vždy na kraji, v oblasti mezi staršími spacery a leader sekvencí (Barrangou et al., 2007). Takto získaná sada spacerů se vertikálně přenáší na dceřiné buňky a umožňuje tak potomstvu čelit hrozbám, kterým byla populace vystavena v minulosti. U prakticky všech CRISPR-Cas systémů hrají zásadní roli v získávání nových spacerů proteiny Cas1 a Cas2, které v některých případech vyžadují spolupráci dalších proteinů (Hille et al., 2018). Druhým krokem je biogeneze CRISPR RNA (crRNA). Spacery jsou transkribovány v podobě dlouhé pre-crRNA, která je následně naštěpena Cas proteiny či jinými RNázami na jednotlivé krátké fragmenty RNA obsahující sekvenci spaceru a část repetice (Brouns et al., 2008; Tang et al., 2002; 2005; Hille et al., 2018). Výjimkou je CRISPR-Cas systém u *Neisseria meningitidis* (typ II-C), u kterého je crRNA transkribována z promotoru uvnitř každé z repetice, a tedy není maturace pomocí RNázy nezbytně nutná (Zhang et al., 2013). Finální fází je interference, při které maturovaná crRNA utvoří komplex s Cas nukleázou a díky komplementaritě crRNA se sekvencí na virové DNA (či RNA) dojde k degradaci dané nukleové kyseliny (Hille et al., 2018).



**Obrázek 5:** Schematické znázornění jednotlivých fází imunitní reakce založené na systému CRISPR-Cas. Ve fázi adaptace je vybrána sekvence protospaceru na cizorodé nukleové kyselině a tato sekvence je začleněna do CRISPR lokusu. Pro integraci nových spacerů je důležitá dvojice proteinů Cas1 a Cas2. V další fázi dochází k syntéze a maturaci crRNA. V poslední fázi je maturovaná crRNA ve spojení s Cas nukleázou použita k rozpoznání cizorodé nukleové kyseliny, jež je následně nukleázou degradována. Převzato z Hille et al. (2018), upraveno.

## 2.4.4 Aktuální rozdělení CRISPR-Cas systémů

Mezi prokaryoty se vyskytuje celá řada typů CRISPR-Cas systémů, jejichž základní principy jsou do značné míry shodné (tj. k likvidaci cizorodých nukleových kyselin využívají již do genomu integrované fragmenty cizorodé nukleové kyseliny). Odlišnost mezi jednotlivými systémy spočívá v sestavě zúčastněných proteinů i v samotném mechanismu jednotlivých fází. Makarova a kolektiv (2020) rozlišují v rámci veškerých známých systémů dvě velké třídy CRISPR-Cas systémů: třídu 1, u které nukleoproteinový komplex zodpovědný za výsledné štěpení cizorodé nukleové kyseliny obsahuje několik různých Cas proteinů, a systémy třídy 2, u nichž je za stejný úkol zodpovědná jediná multidoménová Cas endonukleáza schopná vázat crRNA (Hille et al., 2018). V následujícím textu budou stručně zmíněny rysy typické pro konkrétní typy, s důrazem na typ II, který využívá Cas9 endonukleázu, a z tohoto důvodu je pro tuto práci relevantní.

### 2.4.4.1 Rozdělení CRISPR-Cas systémů dle Makarova et al. (2020)

#### **CRISPR-Cas systémy třídy 1 (zahrnuje typy I, III a IV)**

V rámci třídy 1 stojí za zmínku systémy typu I, které jsou ze všech typů nejrozšířenější a zahrnují nejlépe charakterizovaný systém I-E u *E. coli*. Tyto systémy využívají ve fázi interference multiproteinový komplex složený z různých Cas proteinů označovaný jako Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense). Poté, co tento multiproteinový komplex nalezne na cílové molekule DNA oblast komplementární k příslušné crRNA, dojde k degradaci druhého, k crRNA nekomplementárního vlákna DNA pomocí endonukleázy Cas3. Maturaci crRNA u tohoto typu většinou zajišťuje RNáza z rodiny Cas6.

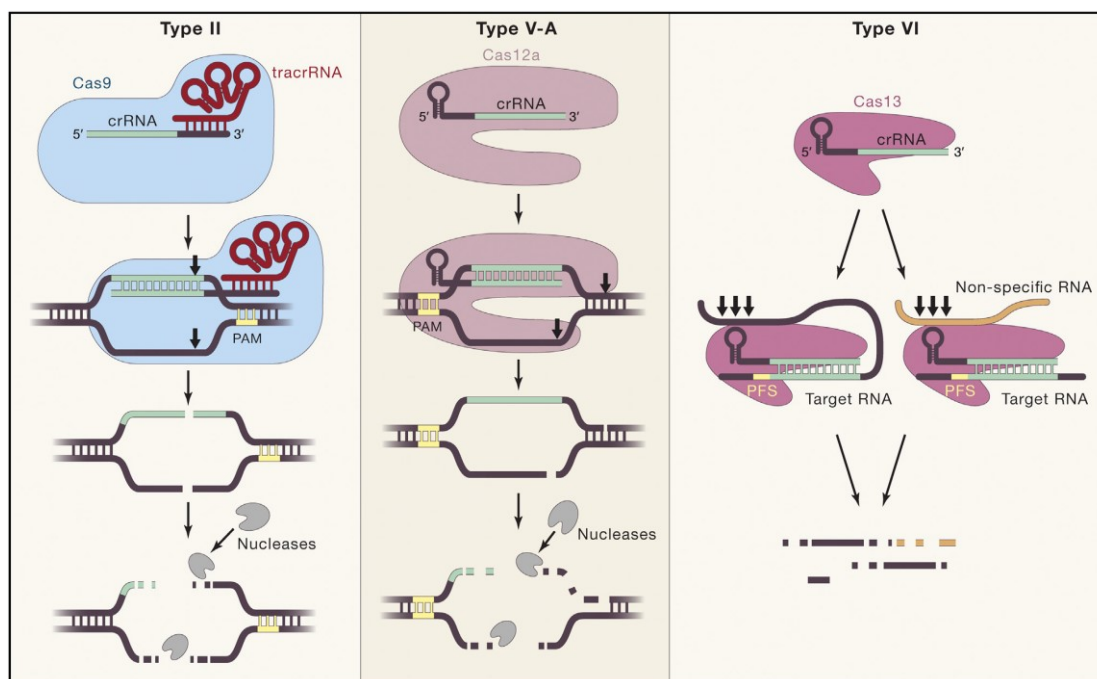
Systémy typu III taktéž využívají při interferenci multiproteinových komplexů, ty se však váží na nascentní transkript. Tato vazba (prostřednictvím komplementární crRNA) umožní štěpení odpovídajícího DNA templátu za vzniku dvouřetězcových zlomů. Jiná nukleáza následně degraduje i navázaný transkript. Systémy typu III jsou tak schopné štěpit jak molekuly DNA, tak i RNA (Hille et al., 2018).

#### **CRISPR-Cas systémy třídy 2 (zahrnuje typy II, V a VI)**

U typu V je klíčovým proteinem Cas12, což je nukleáza, která rozpoznává PAM sekvenci na obou vláknech DNA a netvoří dvouřetězcové zlomy, nýbrž pouze jednořetězcová přerušení. Samotné Cas12 nukleázy pak lze rozdělit do dvou skupin: Cas12a, které pro svou aktivitu vyžadují pouze crRNA a Cas12b, pro něž je nutná i přítomnost další molekuly RNA, tzv. tracrRNA (trans-encoded small CRISPR RNA). Pro typ VI je typický protein Cas13, který je schopen degradovat jednořetězcovou RNA bez účasti tracrRNA na maturaci crRNA.

Systémy typu II vyžadují přítomnost Cas9 endonukleázy (dříve označované jako CsnI), která je za přítomnosti crRNA a tracrRNA (nebo uměle vytvořené fúzní sgRNA) schopná vytvářet dvouřetězcové zlomy s tupými konci tří párů bazí upstream od PAM sekvence na cílové molekule DNA (Obr. 6; Garneau et al., 2010; Jinek et al., 2012). tracrRNA asociuje s crRNA na základě komplementarity s její oblastí repetice a je nutná pro její maturaci, na které se podílí RNáza III i samotná Cas9 (Deltcheva et al., 2011). U systémů typu II (např. u *Streptococcus thermophilus*,

který však má i systémy typu I a III) *cas* operon vedle *cas9* obsahuje ještě geny *cas1*, *cas2* a navíc další gen typický pro konkrétní subtyp systému např. *csn2* (Makarova et al., 2020). Konkrétně u *S. thermophilus* bylo prokázáno, že produkty všech čtyř genů jsou nezbytné ve fázi adaptace, tedy začlenění spaceru do CRISPR lokusu (Wei et al., 2015). Ve fázi interference (degradace cizorodé DNA) je však jediným nezbytným Cas proteinem Cas9 (Sapranauskas et al., 2011). Cas9 obsahuje dvě nukleázové domény – HNH doménu a RuvC-like doménu, přičemž obě jsou důležité pro štěpení cílové DNA a vznik dvouřetězcových zlomů, neboť HNH doména je zodpovědná za štěpení vlákna komplementárního k crRNA, zatímco RuvC-like doména štěpí vlákno druhé (Jinek et al., 2012).



**Obrázek 6:** Schéma fáze interference u systémů CRISPR-Cas třídy 2. Pro tuto třídu je typické, že za štěpení cizorodé nukleové kyseliny je zodpovědná jediná multidoménová Cas endonukleáza. U systémů typu II je touto endonukleázou Cas9, která kromě crRNA vyžaduje i tracrRNA (trans-activating crRNA). U systémů typu V-A je klíčovou nukleázou Cas12a, která přítomnost tracrRNA nevyžaduje stejně jako Cas13, endonukleáza u systémů typu VI. Cas13 se vyznačuje schopností degradovat ssRNA komplementární k crRNA. Převzato z Hille et al. (2018).

## 2.4.5 Využití CRISPR-Cas9

Jak již bylo zmíněno výše, pouze endonukleáza Cas9 a dvě molekuly ribonukleové kyseliny (crRNA a tracrRNA) plně dostačují pro vytvoření dvouvláknových zlomů na vybraném místě na cílové molekule DNA, což z Cas9 na rozdíl od Cas proteinů jiných typů CRISPR-Cas systémů dělá ideálního kandidáta na využití v heterologních expresních systémech (Sapranauskas et al., 2011). Cestu k masovému využití Cas9 endonukleázy v genovém inženýrství a dalších oborech otevřely publikace v roce 2012, které jako první ukázaly, že je možné Cas9 pomocí vhodné zvolené crRNA „naprogramovat“ tak, aby štěpila DNA prakticky libovolné sekvence, která

zároveň bude ležet vedle PAM motivu (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Jinek a kolektiv (2012) vytvořili chimérickou RNA tvořenou fúzí 3' konce crRNA s 5' koncem tracrRNA a došli k závěru, že použití takto vzniklé molekuly sgRNA (single-guide RNA; někdy též označovaná jako guide RNA) je stejně efektivní jako použití crRNA a tracrRNA. Výsledný systém zredukovaný na dvě komponenty, Cas9 endonukleázu a sgRNA, se v následujících letech stal všestranně použitelným nástrojem pro editaci genomu a zároveň i základem pro vývoj několika generací modifikovaných systémů, které například regulují genovou expresi na úrovni transkripce (např. CRISPRi a CRISPRa), degradují specificky vybrané transkripty (RCas9) nebo umožňují kontrolovat lokalizaci určitých částí chromozomů v jaderných kompartmentech (CRISPR-GO) (Wang et al., 2018; McNally et al., 2019; Pickar-Oliver&Gersbach, 2019).

Při editaci genomu pomocí endonukleáz (včetně Cas9) je zcela zásadní, jak bude vzniklé poškození DNA opraveno, neboť různé buněčné opravné mechanismy poskytují různé produkty, z nichž některé nemusí být při daném experimentu žádoucí. U některých organismů mohou navíc některé komponenty reparačních mechanismů chybět (Nenarokova et al., 2019). V následující kapitole jsou popsány základní mechanismy oprav dvouřetězcových zlomů, tedy zlomů, které vznikají mimo jiné i působením Cas9 (Garneau et al., 2010).

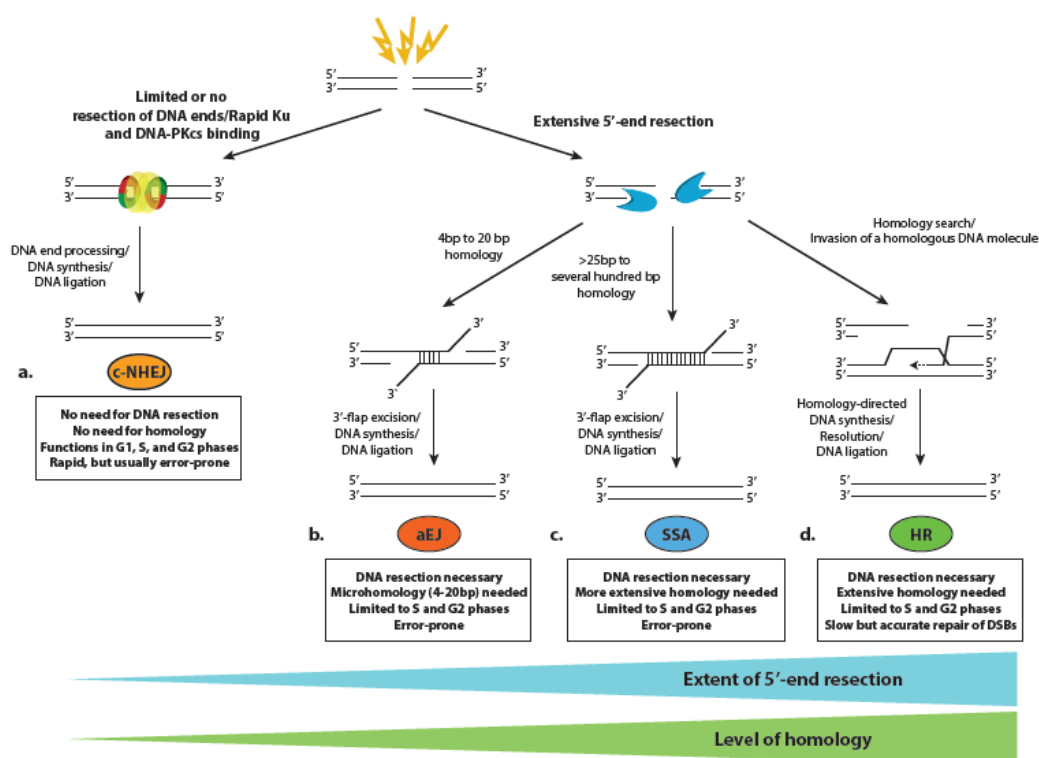
## 2.5 Opravy dvouřetězcových zlomů

DNA všech živých organismů je neustále nejrůznějšími způsoby poškozována, ať už působením vnějších faktorů jako jsou například ultrafialové a ionizační záření, alkylační činidla a polyaromatické uhlovodíky, nejrůznější toxiny (např. aflatoxiny) a environmentální stresory (extrémní teploty, oxidativní stres). Mutace vznikají i zásluhou endogenních procesů probíhajících přirozeně v našich buňkách, tedy při replikaci DNA, působením topoizomeráz, spontánním odstraněním aminoskupin (deaminací) bází nebo rovnou celé báze, a také interakcí DNA s reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) vznikajícími v řadě buněčných procesů (Chatterjee&Walker, 2017). Jedním z možných poškození jsou zlomy DNA, které mohou postihovat jedno z vláken (single strand breaks – SSB) nebo vlákna obě (double strand breaks – DSB) (Chatterjee&Walker, 2017).

Dvouřetězcové zlomy jsou jedním z nejzávažnějších poškození DNA, neboť mohou vést ke vzniku mutací, přestavbám či ztrátám velkých částí chromozomů a takto způsobená nestabilita genomu může být spojena s nefunkční regulací buněčného růstu, buněčnou smrtí či rakovinným bujením (Chang et al., 2017; Ranjha et al., 2018). Pro opravu DSB existují dva hlavní mechanismy – homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců zlomu (c-NHEJ neboli classical non-homologous end joining pathway). Který z těchto typů oprav bude při opravě zlomu uplatněn záleží na několika faktorech. Jedním z nich je fáze buněčného cyklu, ve které se buňka nachází. Při opravě pomocí HR je nutná přítomnost homologního templátu pro opravu, což obvykle bývá sesterská chromatida, která se však zpravidla nachází v blízkosti poškozené chromatidy pouze v S a G2 fázi. Naproti tomu c-NHEJ nevyžaduje přítomnost templátu pro opravu, a tedy může probíhat v jakékoliv fázi buněčného cyklu (Hustedt&Durocher, 2016).

Kromě HR a c-NHEJ byly popsány ještě další dvě dráhy schopné opravy dvouřetězcových zlomů: a-EJ (alternative end joining; někdy též označovaná jako MMEJ – microhomology-mediated end

joining) a SSA (single-strand annealing). Obě tyto dráhy vyžadují podobně jako homologní rekombinace rozsáhlejší degradace jednoho z vláken od 5' konce za účelem nalezení tzv. úseků mikrohomologie (Obr. 7). Tyto dráhy sdílejí i některé klíčové proteiny s mašinérií HR, například MRN komplex (Aleksandrov et al., 2020). V následujících odstavcích budou jednotlivé typy oprav dvouřetězcových zlomů u eukaryot stručně představeny (pro přehlednost jsou všechny uvedené reparační mechanismy znázorněny na příkladu *H. sapiens*).



**Obrázek 7:** Zjednodušené schéma znázorňující charakteristické rysy různých mechanismů oprav dvouřetězcových zlomů, které lze rozdělit podle přítomnosti degradace jednoho z vláken dvouřetězcové DNA či dle rozsahu homologní sekvenční nutné pro opravu zlomu. Převzato z Aleksandrov et al. (2020).

## 2.5.1 Homologní rekombinace

Oprava homologní rekombinací je zahájena rozpoznáním dvouřetězcového zlomu proteinovým komplexem MRN (složený z proteinů Mre11, Rad50, Nbs1). Tento komplex interaguje s proteinem CtIP (CtBP-interacting protein) a tak aktivuje endonukleázu Mre11, která vytvoří jednořetězcové přerušení na vlákně, jehož 5' konec je součástí dvouřetězcového zlomu. Díky své 3'–5' exonukleázové aktivitě odbourává Mre11 krátké úseky DNA z takto přerušeného vlákna. S MRN komplexem interaguje ATM (ataxia telangiectasia mutated) kináza, která fosforyluje histony a zahájí tak kaskádu modifikací chromatinu, které mimo jiné umožní účast BRCA1-BARD1 (Breast cancer type 2 susceptibility protein; BRCA1-associated RING domain protein 1) komplexu, který taktéž stimuluje nukleázovou aktivitu Mre11. Vlákno, které bylo degradováno

Mre11 je dále (v rozsahu i několika stovek párů bází) odbouráváno exonukleázou Exo1 a komplexem nukleázy a helikázy Dna2/BLM (Bloom helicase) tak, že ve výsledku na obou stranách zlomu zůstane dlouhý přesahující jednořetězcový 3' konec vlákna, které Mre11 nukleáza nechala netknuté. Toto vlákno je pokryto proteiny RPA (replication protein A), které následně nahradí Rad51, jenž v komplexu s jednořetězcovou DNA vytvoří nukleoproteinový filament. Proteiny pokryté vlákno DNA je schopné na základě komplementarity vyhledat homologní templát, podle kterého DNA polymerázy (např. DNA polymeráza  $\delta$ ) prodlouží 3' přesahující konec, a tak umožní opravu sekvence původně přerušené dvouřetězcovým zlomem (Nimonkar et al., 2011; Wright et al., 2018; Sun et al., 2020). Oproti ostatním reparačním mechanismům pro opravu DSB bývá homologní rekombinace často považována za poměrně přesný způsob opravy DNA, nicméně bylo prokázáno, že i oprava homologní rekombinací může mít za následek vznik mutací se závažnými následky (Rodgers&McVey, 2016).

### **2.5.2 aEJ (alternative end joining)**

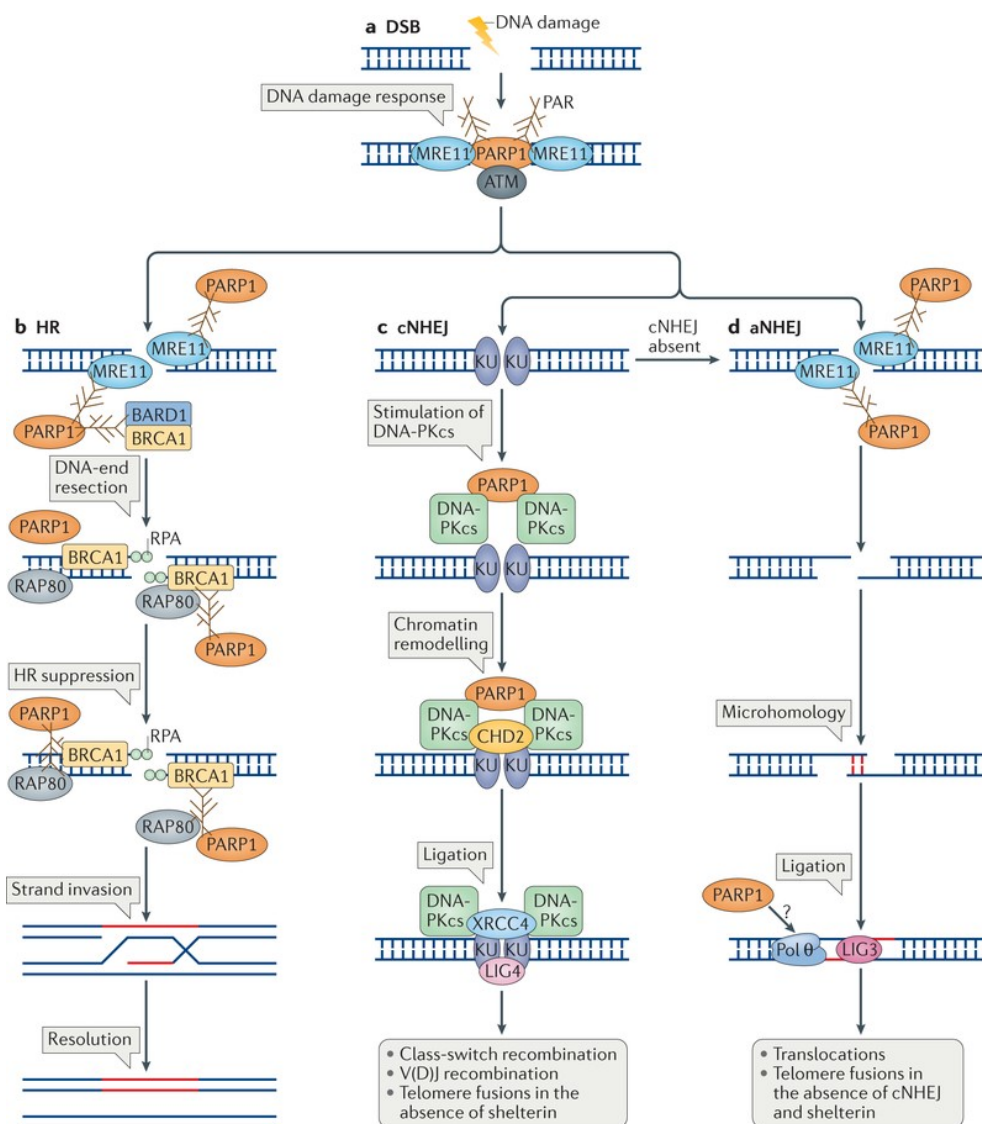
Alternativní dráha spojování konců zlomu, označovaná jako aEJ, je též závislá na odbourání jednoho z vláken konce zlomu od 5' konce a stejně jako u homologní rekombinace je za tuto aktivitu zodpovědný MRN komplex a CtIP. Oproti homologní rekombinaci, která pro opravu obecně vyžaduje homologní templát delší než 100 párů bází, aEJ stačí pro opravu 2–20 párů bází dlouhá oblast mikrohologie (Chang et al., 2017). Dalším klíčovým hráčem je PARP1 (poly(ADP-ribose)polymerase 1), která je zodpovědná za detekci poškození DNA, a její výskyt v místě zlomu je rozhodující, neboť zde dochází ke kompetici s proteiny jiných reparačních drah, například velice hojnými Ku proteiny – viz c-NHEJ (Wang et al., 2006; Robert et al., 2009). Když dojde k asociaci jednoho přesahujícího 3' konce vlákna s přesahujícím vláknem na opačné straně zlomu na základě krátké oblasti mikrohologie, jsou chybějící nukleotidy doplněny DNA polymerázou  $\theta$  a oprava je dokončena aktivitou DNA ligázy I nebo DNA ligázy III (Chang et al., 2017; Ray Chaudhuri&Nussenzweig, 2017). Opravou pomocí této reparační dráhy nevyhnutelně vznikají mutace a zdá se, že je důležitá zejména jako záložní mechanismus v případech, kdy ostatní reparační mechanismy nejsou funkční (Aleksandrov et al., 2020).

### **2.5.3 Single-strand annealing (SSA)**

Podobně jako u homologní rekombinace a aEJ vyžaduje oprava zlomů pomocí SSA rozsáhlou degradaci 5' konců (většího rozsahu než u aEJ) a zároveň přítomnost homologních sekvencí, v tomto případě dlouhých až několik stovek párů bází, které lze najít u zlomů v místech s výskytem tandemových repetit. Na odbourávání 5' konců se zde podílí MRN komplex, CtIP, Exo1 a Dna2/BLM komplex. Přesahující jednořetězcové vlákno je zde stejně jako při homologní rekombinaci pokryto RPA proteiny, které jsou pak nahrazeny Rad52, jenž zajišťuje asociaci s komplementárním homologním úsekem na protějším přesahujícím vlákně (Alexandrov et al., 2020). Mechanismy aEJ a SSA jsou si velice podobné a liší se pouze délkou homologních sekvencí a proteiny účastnicími se kontaktu komplementárních úseků na přesahujících vláknech ve zlomu. I při opravách zlomů pomocí SSA dochází ke vzniku delecí, nicméně je tento reparační mechanismus díky účasti Rad52 účinnější než aEJ (Symington, 2016).

#### 2.5.4 c-NHEJ (classical non-homologous end joining)

Při opravě zlomu pomocí c-NHEJ dráhy je klíčové navázání heterodimeru Ku70-Ku80 (Obr. 8), který má vysokou afinitu k tupým koncům či koncům DNA s malým jednořetězcovým přesahem. Ku proteiny kromě toho, že detekují dvouřetězcové přerušení DNA, chrání zlom před dalším poškozením prostřednictvím konkurenčních opravných mechanismů, které typicky zahajují opravu zlomu rozsáhlým odbouráváním jednoho z řetězců (Mimitou et al., 2010; Yeh et al., 2019; Aleksandrov et al., 2020). Dále slouží Ku heterodimer i jako lešení pro navázání dalších proteinů této dráhy, konkrétně vytváří stabilní komplex s DNA-PKcs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit), která taktéž přispívá k ochraně konců DNA před dalším poškozením (Williams et al., 2014). V případě jednořetězcových přesahů a dalších struktur (vlásky, modifikované nukleotidy), které by bránily opravě zlomu, mohou být konce zlomu před samotnou ligací upraveny nukleázami (např. Artemis) či DNA polymerázami (u c-NHEJ se uplatňují DNA polymeráza  $\lambda$  a DNA polymeráza  $\mu$ ) (Aleksandrov et al., 2020). Poté jsou konce zlomu ligovány pomocí komplexu DNA ligázy IV a proteinů XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4) a XLF (XRCC4-like factor). XRCC4 je klíčovým scaffold proteinem c-NHEJ dráhy, který interaguje s řadou dalších proteinů, a kromě toho, že stimuluje aktivitu DNA ligázy IV, se společně s XLF podílí na vzniku dlouhých filament sloužících k propojení obou konců zlomu před jejich ligací (Grawunder et al., 1997; Williams et al., 2014).

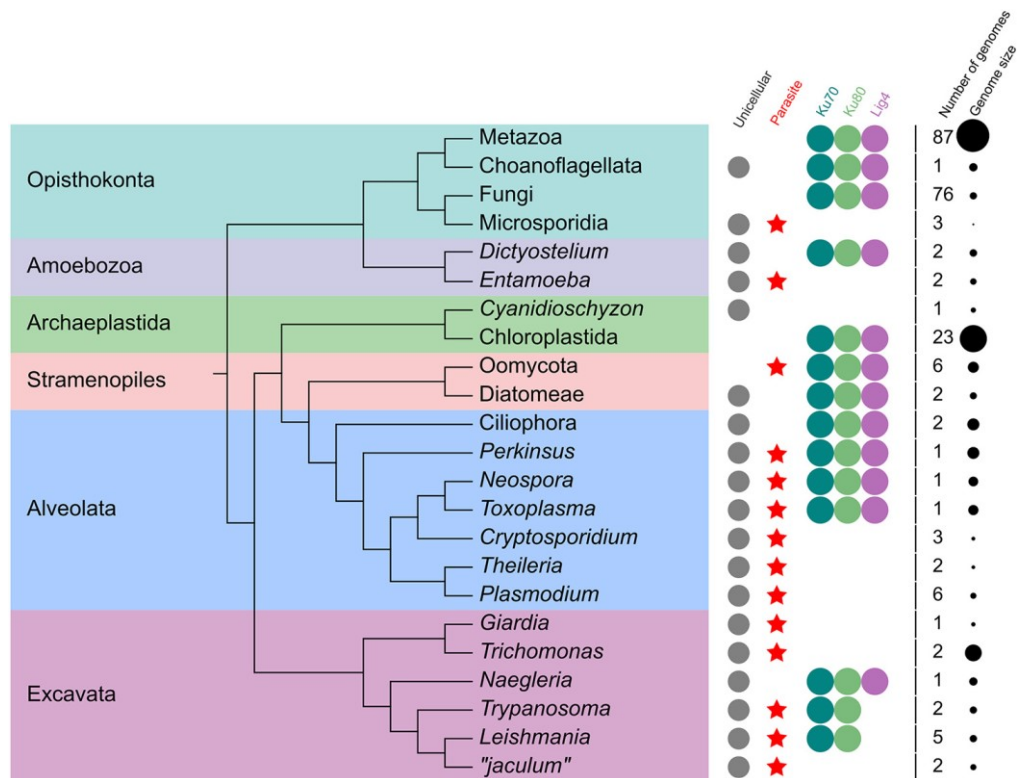


**Obrázek 8:** Schéma znázorňující proces opravy dvouřetězcového zlomu pomocí různých reparačních drah. U HR a a-NHEJ je zlom rozeznán komplexem MRN (zde znázorněn pouze nukleázou Mre1) a poté dochází k odbourání jednoho z vláken dvouřetězcové DNA za účelem vzniku přesahujícího invazního vlákna (v případě HR) či nalezení úseku mikrohomologie, na jejímž základě může dojít k asociaci konců zlomu a opravě (u a-NHEJ). U c-NHEJ jsou konce zlomu chráněny před degradací Ku proteiny, které též slouží jako scaffold pro další proteinové komplexy, jejichž aktivitou je zlom opraven. Na ilustraci je oranžově znázorněna polymeráza PARP1, která hraje roli všech zmíněných reparačních drah. Převzato z Ray Chaudhuri&Nussenzweig (2017), upraveno.

### 2.5.5 Regulace reparačních drah u dvouřetězcových zlomů

Jak již bylo zmíněno, při vzniku dvouřetězcových zlomů má buňka několik možností, jak zajistit jejich opravu a kromě S/G2 fáze, kdy dochází častěji k opravě homologní rekombinací díky blízkosti sesterské chromatidy, je pravděpodobnější oprava pomocí c-NHEJ, neboť klíčové komponenty této dráhy – Ku proteiny – se v buňkách vyskytují hojněji než komplexy MRN, jejichž asociace se zlomem by mohla vyústit v homologní rekombinaci nebo jednu z alternativních drah spojování konců DNA (Chang et al., 2017). Při editaci genomu pomocí metod genového inženýrství, včetně endonukleáz jako je Cas9, hraje právě způsob reparace záměrně vyvolaných poškození DNA klíčovou roli. V současné době existuje řada technik, které lze využít pro navození určité reparační dráhy. Zvýšení četnosti opravy dvouvláknových zlomů homologní rekombinací je například možné dosáhnout potlačením exprese proteinu Ku80 či fúzí Cas9 s CtIP (který je za běžných okolností aktivován pouze v S, G2 a M fázi díky fosforylaci Cdk1 nebo Cdk2) (da Silva Ferreira et al., 2006; Charpentier et al., 2018). Kromě toho je známo několik inhibitorů, jež působí na klíčové proteiny reparačních drah (Yeh et al., 2019). Jedním z nich je Scr7, specifický inhibitor DNA ligázy IV, který se používá pro potlačení c-NHEJ dráhy a zvýšení účinnosti homologní rekombinace při editacích genomu pomocí Cas9 endonukleázy u různých typů buněk, včetně *Giardia intestinalis* (Srivastava et al., 2012; Lin et al., 2019; Yeh et al., 2019).

Lin a kolektiv (2019) pozorovali při použití Scr7 u *G. intestinalis* vyšší účinnost CRISPR-Cas9 systému při odstraňování kopií genu *mlf* z genomu (za současného poskytnutí homologního templátu pro opravu zlomů homologní rekombinací), což odpovídá očekávanému působení tohoto inhibitoru na c-NHEJ dráhu, respektive na DNA ligázu IV. Dle o pár měsíců později publikované analýzy genomu *G. intestinalis* za účelem nalezení ortologů základních komponent c-NHEJ dráhy však DNA ligáza IV u *G. intestinalis* vůbec nebyla nalezena (Obr. 9). Stejně jako řada dalších parazitických protist je tak *Giardia* při opravách dvouřetězcových zlomů pravděpodobně odkázána pouze na homologní rekombinaci a případné alternativní dráhy spojování konců zlomů (Nenarokova et al., 2019).



**Obrázek 9:** Distribuce tří klíčových komponent c-NHEJ dráhy Ku70, Ku80 a DNA ligázy IV u vybraných zástupců eukaryotických skupin s důrazem na jednobuněčné (šedé kolečko) a parazitické (červená hvězdička) organismy. Čísla znázorňují počet analyzovaných genomů u příslušného taxonu. Převzato z Nenarokova et al. (2019).

### 3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo rozšířit paletu nástrojů pro manipulaci genové exprese u *Giardia intestinalis*.

Praktické cíle:

1. Vytvoření a optimalizace konstruktů pro inducibilní expresi regulovanou tetracyklinovým represorem u *Giardia intestinalis* za využití:
  - a) T7 promotoru
  - b) endogenního promotoru
2. Knock-out genu *cwp1* pomocí Cas9 endonukleázy
3. Zjistit, jak dlouhé homologní oblasti jsou nutné pro opravu zlomu homologní rekombinací při vytváření *cwp1* knock-outu
4. Exprese komponent bakteriální NHEJ dráhy Ku a LigD v buňkách *G. intestinalis* a ověření jejich funkce

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Použité organismy, jejich kultivace a transformace

#### 4.1.1 *Escherichia coli*

Veškeré rekombinantní plasmidy byly namnoženy za použití chemicky kompetentních bakterií *E. coli* kmene TOP 10 kultivovaných v LB médiu při teplotě 37 °C na třepačce (220 rpm). Pro selekci bakterií obsahujících žádaný plasmid bylo použito antibiotikum ampicilin (Sigma) o finální koncentraci 100 µg/ml.

Kompetentní bakterie byly transformovány pomocí tepelného šoku (42 °C na 30–60 s). Po transformaci byly bakterie hodinu inkubovány v SOC médiu (37 °C, 220 rpm) a následně roztřeny na agarové LB plotny s ampicilinem jako selekčním antibiotikem o koncentraci 100 µg/ml. Bakterie na plotnách byly kultivovány v termostatu (37 °C) přes noc.

#### 4.1.2 *Giardia intestinalis*

Pro expresi rekombinantních proteinů byly použity buňky *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957) a WB C6 (ATCC 50803). Trofozoiti byly kultivováni axenicky v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s 10% hovězím sérem (Gibco) v termostatu (37 °C). Kultura byla udržována kontinuálním přenosem malého inokula vychlazené suspenze trofozoitů do čerstvého média každých 3.-4. den. Veškerá přímá manipulace s buňkami probíhala ve sterilních podmínkách flow-boxu.

Trofozoiti *G. intestinalis* byli transfekováni metodou elektroporace na přístroji Gene Pulser Xcell (Biorad). Buňky byly kultivovány v TYI-S-33 médiu v 50ml lahvích, dokud neutvořily souvislý nárůst na stěně nádoby. Poté bylo médium z nádoby vylito a nahrazeno vychlazeným sterilním PBS. Kultivační lahev byla uložena do ledové lázně na cca 20 minut a následně důkladně protřepána, aby bylo dosaženo uvolnění přisedlých trofozoitů ze stěn nádoby do pufru. Poté byly buňky ve zkumavce stočeny na 10 minut při 1000 x g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v 900 µl TYI-S-33 média a buněčná suspenze byla rozdělena po 300 µl do 4mm sterilních elektroporačních kyvet. Do kyvet byla přidána plasmidová DNA (obvykle 25 µg, 50 µg a 75 µg; konkrétní množství je uvedeno u jednotlivých experimentů). Kyvety byly na 10 minut umístěny do ledové lázně. Pro elektroporaci byl použit tzv. „exponenciální protokol“ s následujícími parametry: 350 V, 1000 µF, 750 Ω. Následně byly kyvety uloženy na 5 minut na led. Poté byl jejich obsah přemístěn do 15ml kultivačních zkumavek s TYI-S-33 médiem a zkumavky uloženy do termostatu (37 °C). Po cca 24 hodinách bylo médium nahrazeno čerstvým s přidavkem selekčních antibiotik puromycinu (Sigma Aldrich; o finální koncentraci 57 µg/ml), G418 (Sigma Aldrich; o finální koncentraci 572 µg/ml) a/nebo blasticidinu S (Sigma Aldrich; finální koncentrace 73 µl/ml). Dále bylo médium vyměňováno cca každé 3 dny, případně po delší době s ohledem na množství přeživších buněk. Po dosažení monolayeru byla kultura udržována přenosem malého inokula do nové zkumavky s čerstvým médiem obsahujícím příslušná selekční antibiotika o výše zmíněné koncentraci.

#### 4.1.2.1 Encystace *G. intestinalis*

Tvorba cyst *in vitro* byla u buněk navozena pomocí jednokrokového „Uppsala“ encystačního protokolu (Einarsson et al., 2016). Encystační médium bylo připraveno dle Tabulky 1. Před přidáním hovězího séra bylo upraveno pH pomocí NaOH na hodnotu 7,8. Médium bylo sterilizováno filtrací (PES filtr s póry o velikosti 0,22 µm) a dlouhodobě uchováváno v -20 °C. Před samotnou encystací byla do média přidána směs hovězí a ovčí žluči v prášku (Sigma; 5 mg/ml encystačního média) a připravené médium bylo znovu sterilizováno filtrací. Před provedením encystace byly trofozoiti nejprve kultivováni v TYI-S-33 médiu do vytvoření monolayeru a poté přeliti encystačním médiem, ve kterém byli ponecháni při 37 °C cca 24 hodin.

**Tabulka 1:** Příprava „Uppsala“ encystačního média.

| Finální objem                                | 1 l      |
|----------------------------------------------|----------|
| dH <sub>2</sub> O                            | 870 ml   |
| BBL TM Trypticase TM Pepton (BD Biosciences) | 20 g     |
| Extrakt z kvasinek (Oxoid)                   | 10 g     |
| Glukóza (Sigma)                              | 10 g     |
| NaCl (Sigma)                                 | 2 g      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Lachema)    | 0,1 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lachema)    | 0,6 g    |
| L-cystein (Sigma)                            | 2 g      |
| Kyselina askorbová (Sigma)                   | 0,2 g    |
| Citrát železito-ammonný (Sigma)              | 0,0228 g |
| 10% inaktivované hovězí sérum (Gibco)        | 100 ml   |
| Penicilin-Streptomycin (Sigma)               | 15 ml    |

#### 4.1.2.2 Subklonování buněk *G. intestinalis*

V případech, kdy je pro experiment důležité, aby byla buněčná kultura geneticky homogenní, se provádí subklonování buněk, tj. izolace jednotlivých buněk trofozoitů, které následně dají vznik celé populaci.

Subklonování buněk *G. intestinalis* bylo provedeno pomocí 96jamkové destičky (jamky s plochým dnem), na které bylo nejprve provedeno sériové ředění následujícím způsobem. Osm jamek bylo naplněno 200 µl média TYI-S-33 a do první z nich bylo přidáno malé inokulum vychlazené kultury. Obsah jamky byl důkladně promíchán a bylo z něj přeneseno 20 µl do další jamky s médiem, jejíž obsah byl opět důkladně promíchán. Tento postup byl opakován, dokud jsme nezískali osm různých ředění. Z každého ředění byly nanášeny tři 2 µl kapky (jednotlivě) do prázdných jamek. Obsah kapek byl prohlédnut invertovaným mikroskopem a bylo vybráno optimální ředění, ze kterého byly dále nanášeny kapky do prázdných jamek na destičce. Do jamek, u kterých bylo mikroskopicky ověřeno, že obsahují pouze jednu buňku, bylo přidáno 200 µl média TYI-S-33 s příslušnými selekčními antibiotiky. Následně byla destička uzavřena víčkem a inkubována za anaerobních podmínek (uzavřená v nepropustném obalu s vyvíječem anaerobních

plynů AnaeroGen Compact (Thermo Scientific)) v termostatu (37 °C), dokud populace buněk v jamkách nedosáhla dostatečné velikosti pro přenos do zkumavek.

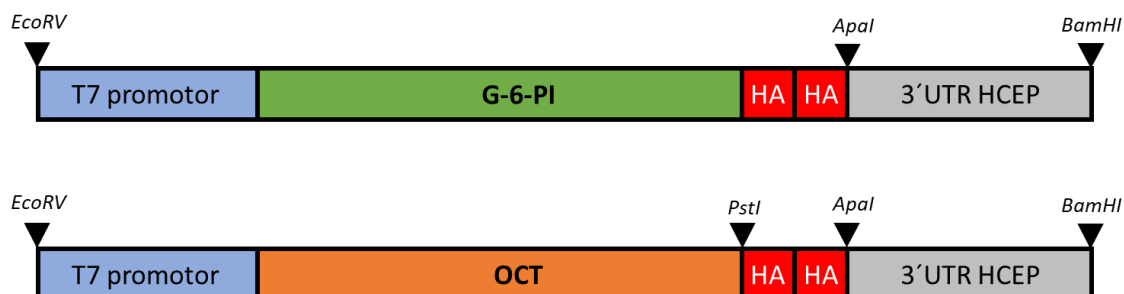
## 4.2 Použité konstrukty

V této části i v následujících kapitolách je často užíváno označení 5'UTR (resp. 3'UTR) oblast. Zkratka „UTR“ však v kontextu této práce neoznačuje nepřekládanou oblast mRNA, nýbrž obvykle 200-300 párů bazí dlouhou oblast v genomu *G. intestinalis*, která se nachází upstream od ATG kodónu příslušného genu (respektive downstream od stop kodónu). Jedná se o pracovní označení sekvencí na plasmidech, jež umožňují expresi genu, který je mezi tyto oblasti vložen.

### 4.2.1 Konstrukty pro inducibilní expresi

#### 4.2.1.1 T7promotor-oct/g-6-pi-2xHA v pTG

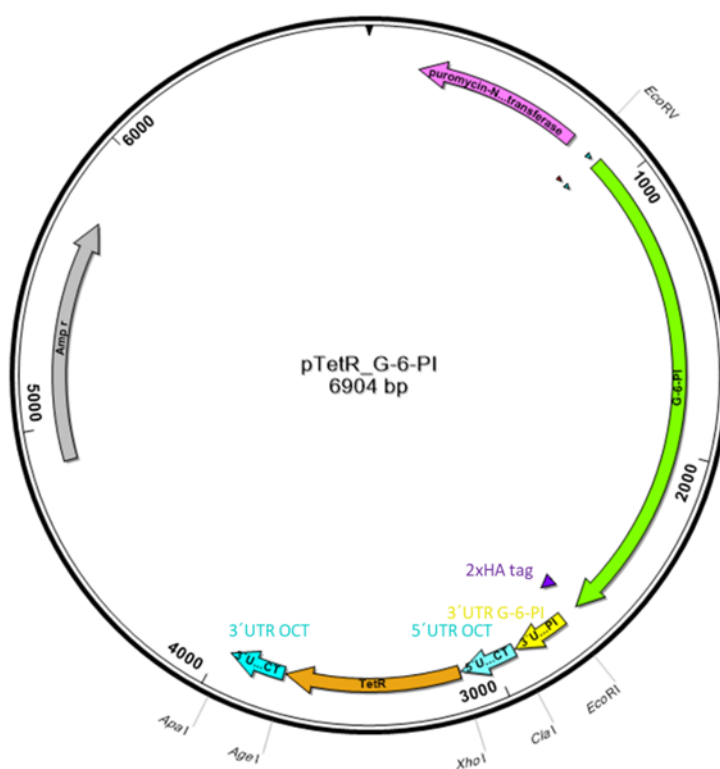
Pro otestování exprese rekombinantních proteinů pomocí fágové T7 RNA polymerázy v buňkách *G. intestinalis* byly vybrány dva geny, u kterých jsme předpokládali, že jejich zvýšená exprese nebude pro buňky toxická, a sice gen pro ornitin karbamoyl transferázu (OCT; GL50803\_10311) a glukóza-6-fosfát izomerázu (G-6-PI; GL50803\_9115). Oba proteiny byly značeny pomocí dvou HA tagů na C-terminu a příslušné geny byly i s T7 promotorem vloženy do plasmidu pTG (Martincová et al., 2012), ze kterého předtím byla vyštěpena promotorová oblast (5'UTR oblast genu *oct*), jejíž funkci měl nahradit právě zmíněný T7 promotor (Obr. 10). Exprese T7 RNA polymerázy (značené V5 tagem) byla zajištěna jiným plasmidem – pUC57-mini. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinů s HA tagy byla 67 kDa (G-6-PI) a 39 kDa (OCT).



**Obrázek 10:** Konstrukty pro expresi glukóza-6-fosfát izomerázy (G-6-PI) a ornitin karbamoyl transferázy (OCT) (oba proteiny značené HA tagy). Tyto konstrukty byly vloženy do vektoru pTG.

#### 4.2.1.2 Vektory pTetR a pTetR(SV40NLS)

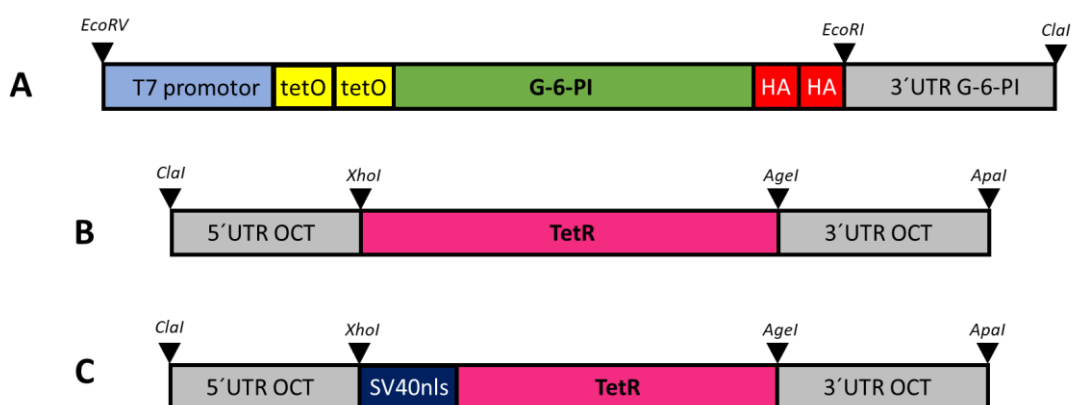
Vektor pTetR byl vytvořen v rámci této diplomové práce z vektoru pTG odstraněním 5'UTR (promotorové) oblasti genu *oct* (Obr. 11). Vektor byl upraven tak, aby mohl sloužit k expresi dvou různých genů – genu pro TetR represor (pod promotorem *oct*) a dalšího genu zájmu, jehož transkripce měla být regulována právě TetR represorem (v rámci této práce to byly geny pro G-6-PI, Bak1 a zkrácenou verzi genu MOMP35). Regulační oblast zahrnující T7 promotor a *tetO* operátory v tomto vektoru však obsažena nebyla a musela být do vektoru vkládána spolu s genem, jehož indukibilní exprese byla testována. Plasmid pTetR(SV40NLS) se od vektoru pTetR liší pouze tím, že v něm přítomný gen pro TetR represor obsahuje jadernou lokalizační sekvenci velkého T antigenu viru SV40 (ve výsledném proteinu na N-terminu). Tato modifikace byla zavedena na základě výsledků experimentů Sun a kolektivu (2005). Plasmid pTetR(SV40NLS) byl též využit pro expresi G-6-PI, Bak1 a zkrácené verze genu pro MOMP35. Molekulová hmotnost TetR měla být 23 kDa, respektive 24 kDa v případě represoru s jadernou lokalizační sekvencí. Ani jedna z verzí TetR represoru neobsahovala tagy, které by umožnily detekovat jeho expresi.



**Obrázek 11:** Schematické znázornění vektoru pTetR vytvořeného z vektoru pTG. Oranžově je vyznačen gen pro represor TetR (příslušné UTR oblasti jsou vyznačeny modře). Zeleně je vyznačen gen pro glukóza-6-fosfát izomerázu se dvěma HA tagy, za kterou je umístěna 3' UTR oblast genu *g-6-pi* (žlutě). Krátké šipky v blízkosti restrikčního místa pro EcoRV značí regulační oblast obsahující T7 promotor a operátory (viz dále). Dále se na plasmidu nachází gen pro puromycin-N-acetyl transferázu (fialová) a gen pro resistenci vůči ampicilinu (šedá). Schéma bylo vytvořeno v programu SeqBuilder.

#### 4.2.1.2.1 T7 promotor-*tetO-tetO-g-6-pi-2xHA* v pTetR a pTetR(SV40)

Konstrukt pro expresi glukóza-6-fosfát izomerázy pod inducibilním T7 promotorem na plasmidu pTetR obsahoval dva *tetO* operátory a jako 3'UTR oblast byla vybrána příslušná oblast tohoto genu (3'UTR *g-6-pi*). Předpokládaná velikost výsledného proteinu i s tagy byla 67 kDa. Dále se na vektoru pTetR nacházel gen pro represor TetR, jehož exprese byla umožněna 5'UTR genu *oct*. Druhá varianta vektoru pTetR nazvaná pTetR(SV40NLS) obsahovala represor s jadernou lokalizační sekvencí velkého T antigenu viru SV40 na N-terminu (Obr. 12).



**Obrázek 12:** **A** Konstrukt pro inducibilní expresi glukóza-6-fosfát izomerázy (zeleně) značené HA tagy na C-terminu. Exprese měla být regulována dvojicí *tetO* operátorů (žlutě). **B** konstrukt pro expresi TetR represoru (růžová) **C** konstrukt pro expresi TetR represoru s jadernou lokalizační sekvencí velkého T antigenu viru SV40 (modře).

#### 4.2.1.2.2 T7 promotor-*tetO-tetO-momp270-BAP* v pTetR a pTetR(SV40NLS)

Konstrukt obsahující prvních 270 párů bazí genu *momp35* (mitosomal outer membrane protein 35; GL50803\_14939; sekvence viz Příloha 5) byl vložen do vektorů pTetR i pTetR(SV40NLS). Exprese tohoto genu měla být řízena stejnou regulační oblastí, jako tomu bylo u přechozího konstruktu s genem pro G-6-PI, tedy složenou z T7 promotoru a dvou *tetO* operátorů (Obr. 13). Molekulová hmotnost výsledného proteinu s BAP tagem na C-terminu měla být přibližně 12 kDa.



**Obrázek 13:** Konstrukt pro inducibilní expresi genu *momp270* (zkrácené verze genu *momp35*).

#### 4.2.1.2.3 T7 promotor-*tetO-tetO-g-6-pi-momp270*-BAP ve vektoru pTetR

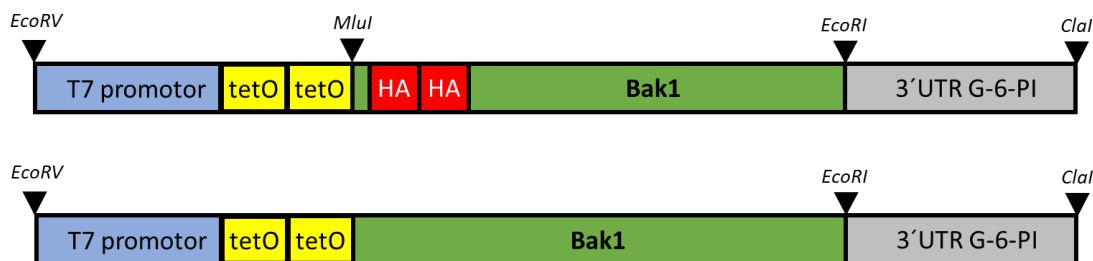
Na základě výsledků 5'RACE provedené u buněk obsahujících vektor pTetR s genem pro G-6-PI jsme se domnívali, že by se v rámci tohoto genu mohl nacházet vnitřní promotor (viz dále). Vliv této sekvence na expresi genů měl být zjištěn pomocí konstruktů obsahujících stejně jako předchozí konstrukt zkrácenou verzi genu *momp35* s C-terminálně uloženým BAP tagem ovšem s tím rozdílem, že před tento gen byla umístěna sekvence prvních 105 párů bází genu pro G-6-PI. Aby nemohlo dojít k translaci této části, byla počáteční sekvence ATG mutována na ATC. Dále se v rámci konstruktů nacházela regulační oblast složená z T7 promotoru a dvou *tetO* operátorů (Obr. 14). Předpokládaná molekulová hmotnost zkráceného MOMP35 proteinu měla být 12 kDa.



**Obrázek 14:** Konstrukt pro inducibilní expresi genu *momp270* (zkrácené verze genu *momp35*). Před genem se nachází prvních 105 párů bází genu *g-6-pi*.

#### 4.2.1.2.4 T7 promotor-*tetO-tetO-2xHA-bak1* ve vektoru pTetR

Dalším konstruktem vloženým do vektoru pTetR byl konstrukt pro inducibilní expresi proteinu Bak1 z genomu *Homo sapiens* (XM\_011514779.3). Jelikož příslušný gen obsahuje introny (které však nejsou v genomu *G. intestinalis* časté), byl tento gen amplifikován přímo z cDNA vytvořené na základě mRNA získané z buněk *H. sapiens*. Vedle konstruktů obsahujících dva HA tagy na N-terminu výsledného proteinu byl vytvořen i konstrukt bez jakéhokoliv tagu (Obr. 15). Tento konstrukt měl sloužit jako kontrola, neboť jsme nevěděli, zda nebude HA tag nějakým způsobem interferovat s porotvornou aktivitou, jakou má Bak1 v organismu svého původu. Na základě sekvenace výsledného konstruktů byla molekulová hmotnost proteinu Bak1 přibližně 23 kDa, respektive 26 kDa v případě verze se dvěma HA tagy.



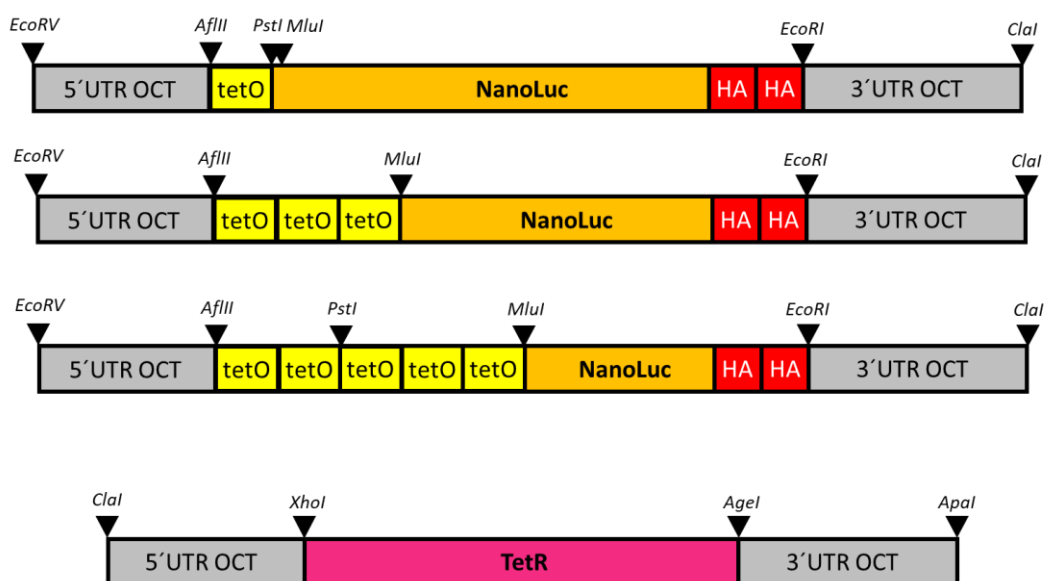
**Obrázek 15:** Konstrukt pro inducibilní expresi proteinu Bak1 s HA tagy (horní část obrázku) a bez tagů (spodní část obrázku).

### 4.2.1.3 Vektor pTetRall

Vektor pTetRall byl vytvořen v rámci této práce z plasmidu pTG za účelem exprese dvou genů – TetR represoru a reportérového proteinu NanoLuc. Rozdíl oproti vektoru pTetR spočívá v tom, že v tomto vektoru jsou pro oba geny použity stejné promotorové oblasti, konkrétně UTR oblasti genu *oct*. Tento vektor tak již nebyl určen k použití současně s T7 RNA polymerázou, jako tomu bylo u vektoru pTetR. Oproti pTetR navíc tento vektor obsahuje regulační oblast (jeden či více *tetO* operátorů), která je restrikcčními místy oddělena jak od promotorové oblasti (5'UTR genu *oct*) tak od genu pro NanoLuc, a je tedy možné snadno tuto oblast upravit či úplně odstranit (viz dále).

#### 4.2.1.3.1 T7promotor-*nanoluc*-2xHA (vektor pTetRall)

Vektor pTetRall obsahoval gen pro NanoLuc (sekvence viz Příloha 4) se dvěma HA tagy (Obr. 16). Inducibilní exprese tohoto genu mělo být dosaženo umístěním *tetO* operátorů mezi tento gen a *oct* promotor (5'UTR OCT). Účelem tohoto konstruktu bylo zjistit optimální počet operátorů pro silnou a zároveň dobře regulovatelnou expresi. Molekulová hmotnost NanoLuc luciferázy se dvěma HA tagy měla být přibližně 21 kDa.



**Obrázek 16:** Konstrukty pro inducibilní expresi NanoLuc luciferázy (oranžová) s jedním, třemi a pěti operátory (*tetO*). Tyto konstrukty se nacházely na vektoru pTetRall, který obsahoval i gen pro represor TetR. Jak NanoLuc, tak TetR se na tomto vektoru nacházely pod *oct* promotorem (5'UTR OCT).

### 4.2.2 Konstrukty pro *cwp1* knock-out

#### 4.2.2.1 Cas9U6g1pac

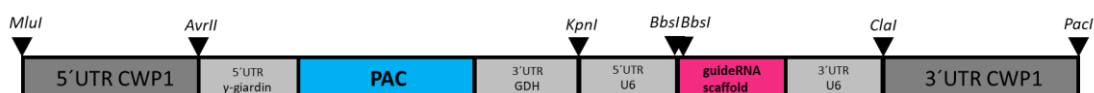
Při vytváření vektorů pro knock-out genu *cwp1* byl zcela zásadní vektor „Cas9U6g1pac“, jež vytvořila a naší laboratoři k využití poskytla Kari D. Hagen z laboratoře Scotta Dawsona (Department of Microbiology and Molecular Genetics, UC Davis). Tento vektor obsahuje jak gen

pro Cas9 endonukleázu se dvěma lokalizačními sekvencemi (SV40NLS a 2340NLS) a třemi HA tagy optimalizovanou pro expresi v *G. intestinalis*, tak i kazetu pro transkripci guideRNA (Obr. 17). Stejný vektor s deaktivovanou endonukleázou (dCas9) testovali McNally a kolektiv (2019).

#### 4.2.2.2 Vektor pTGuide

Vektor pTGuide byl vytvořen z vektoru pTG, ze kterého byla vyštěpena 5'UTR oblast (genu *oct*) a gen pro PAC podmiňující resistenci vůči puromycinu (i s příslušnými UTR oblastmi). Do prázdného vektoru pak byla vložena tzv. homologní raménka (viz dále). Mezi těmito raménky se nachází gen pro selekční marker PAC (s 5'UTR oblastí genu pro  $\gamma$ -giardin a 3'UTR oblastí genu pro GDH) a kazeta pro transkripci guideRNA (obsahující místo pro vložení spaceru, scaffold, 5'UTR oblast a 3'UTR oblast genu pro U6 snRNA). Templátem pro amplifikaci obou těchto částí byl vektor „Cas9U6g1pac“ (viz výše).

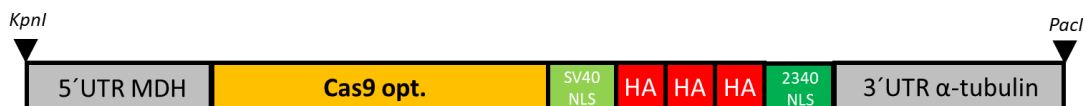
Homologní raménka vektoru pTGuide byla tvořena 988 párů bazí dlouhým úsekem z genomu *G. intestinalis*, který se nachází bezprostředně upstream od genu *cwp1* (5'UTR CWP1, Obr. 17) a též 998 párů bazí dlouhou sekvencí nacházející se bezprostředně za STOP kodonem genu *cwp1* (3'UTR CWP1). Tyto sekvence měly představovat templát pro opravu zlomu (vyvolaných Cas9 endonukleázou) v oblasti *cwp1* lokusu prostřednictvím homologní rekombinace. Konstrukt nacházející se mezi těmito homologními raménky měl být prostřednictvím tohoto opravného mechanismu vložen do genomu místo genu *cwp1*. Proces postupného odstranění všech kopií genu *cwp1* a jejich nahrazení zmíněným konstruktem byl podpořen přítomností selekčního markeru (PAC) a kazety pro syntézu guideRNA. samotná guideRNA (respektive pouze její část označovaná jako spacer) byla do vektoru vložena dle protokolu poskytnutého autory plasmidu „Cas9U6g1pac“ (McNally et al., 2019). Část molekuly guideRNA nutná pro interakci s Cas9 endonukleázou označovaná jako „scaffold“ byla v konstruktu přítomna již před vložením spaceru, který mohl být do konstruktu přidán díky přítomnosti dvou restrikčních míst pro enzym BbsI. Transkripce celé molekuly guideRNA (spaceru a scaffoldu) byla zajištěna promotorem genu pro U6 snRNA, tedy jedné ze složek spliceozomu, jehož komponenty byly u *G. intestinalis* nalezeny navzdory skutečnosti, že genom tohoto organismu obsahuje minimální množství experimentálně ověřených intronů (Adam, 2011). Tento konstrukt (s již vloženou sekvencí spaceru) sloužil jako templát pro přípravu dalších konstruktů s různými délkami homologních ramen (5'UTR CWP1 a 3'UTR CWP1 oblastí).



**Obrázek 17:** Konstrukt pro knock-out genu *cwp1*. Mezi homologními raménky (5'UTR CWP1 a 3'UTR CWP1) se nacházel gen pro puromycin-N-acetyl transferázu (PAC) a kazeta pro transkripci guideRNA, do které měl být přes restrikční místa pro BbsI klonován spacer (druhá část guideRNA – scaffold – byla součástí vektoru (růžově vyznačeno)).

#### 4.2.2.3 pONDRAcas9

Vektor pONDRAcas9 (Obr. 18) vznikl z části plasmidu pONDRA obsahující selekční markery (resistenci vůči ampicilinu a G418) vložením genu *cas9*, který byl i s UTR oblastmi (5'UTR genu pro MDH a 3'UTR genu pro  $\alpha$ -tubulin) amplifikován z vektoru „Cas9U6g1pac“. Sekvence genu pro Cas9 endonukleázu byla autory původního vektoru optimalizována pro expresi v buňkách *G. intestinalis* a obsahovala dvě jaderné lokalizační sekvence – NLS velkého T antigenu viru SV40 a jadernou lokalizační sekvenci pocházející původně z genu GL50803\_2340 (McInally et al., 2019). Molekulová hmotnost výsledného proteinu i se třemi HA tagy byla přibližně 169 kDa.

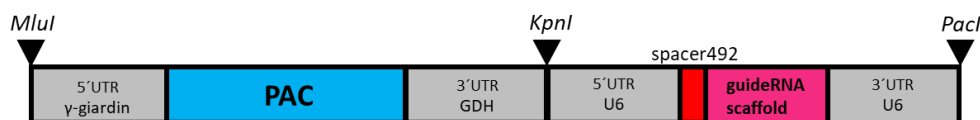


**Obrázek 18:** Konstrukt pro expresi Cas9 endonukleázy (žlutě) optimalizované pro expresi v buňkách *G. intestinalis*. Cas9 je zde značena třemi HA tagy a obsahuje dvě jaderné lokalizační sekvence (SV40NLS a 2340NLS).

#### 4.2.3 Konstrukty pro testování NHEJ dráhy

##### 4.2.3.1 pTGuideNHEJ

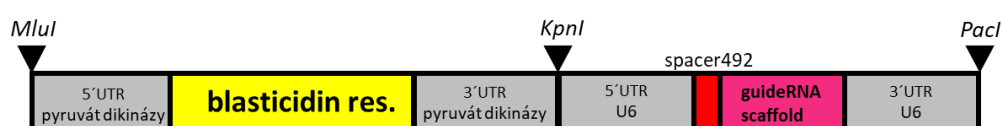
Vektor pTGuideNHEJ byl vytvořen z vektoru pTGuide odstraněním všech částí nacházejících se mezi restrikčními místy MluI a PacI, tedy i homologních ramének sloužících k opravě zlomů (způsobených Cas9 endonukleázou) homologní rekombinací a integraci konstruktů na plasmidu do genomu. Poté byl ze stejného plasmidu amplifikována pouze kazeta pro transkripci guideRNA (konkrétně byla použita verze vektoru pTGuide s již vloženou guideRNA 492) a gen pro puromycin-N-acetyl transferázu a obě tyto části byly vloženy mezi restrikční místa MluI a PacI štěpeného plasmidu. Tak vznikl vektor (Obr. 19), který mohl být selekcí udržován v transfekovaných buňkách a zároveň, díky transkripci guideRNA, mohl v součinnosti s Cas9 (na plasmidu pONDRAcas9) vyvolávat vznik zlomů v *cwpI* lokusu, ovšem bez možnosti vložení sebe sama do genomu prostřednictvím homologní rekombinace. Buňky s tímto plasmidem tak mohly k opravě zlomu homologní rekombinací využít pouze homologní chromozom (který však dle naší hypotézy byl též díky přítomnosti Cas9 a guideRNA neustále štěpen) nebo jiné opravné mechanismy, jejichž existenci v buňkách *G. intestinalis* jsme právě pomocí tohoto vektoru měli v úmyslu testovat.



**Obrázek 19:** Konstrukt pro tvorbu zlomů DNA v buňkách obsahujících Cas9 endonukleázu. V rámci tohoto konstruktů se nachází gen pro puromycin-N-acetyl transferázu (modře) a kazeta pro transkripci guideRNA (obsahující spacer 492).

#### 4.2.3.2 pTGuideNHEJblast

Plasmid pTGuideNHEJblast (Obr. 20) vznikl z plasmidu pTGuideNHEJ výměnou kazety pro expresi puromycin-N-acetyl transferázy za kazetu pro expresi genu podmiňujícího resistenci vůči blasticidinu. Tato kazeta obsahovala zmíněný gen spolu s 5'UTR a 3'UTR oblastmi genu pro pyruvát dikinázu a byla do vektoru pTGuideNHEJ vložena přes restrikční místa MluI a KpnI. Důvodem pro vytvoření tohoto plasmidu byla pouze skutečnost, že pro plánovaný experiment, který zahrnoval Cas9 (na plasmidu pONDRAcas9 nesoucí resistenci ke G418) a pTetRaII\_NHEJ (nesoucí resistenci k puromycinu), a proto jej nebylo možné v tomto experimentu použít. Tudiž musela být kazeta pro resistenci k puromycinu vyměněna za poslední možnou resistenci, která se u buněk *G. intestinalis* používá, a sice za resistenci k blasticidinu.



**Obrázek 20:** Konstrukt pro tvorbu zlomů DNA v buňkách obsahujících Cas9 endonukleázu. V rámci tohoto konstruktu se nachází gen pro resistenci vůči blasticidinu (žlutě) a kazeta pro transkripci guideRNA (obsahující spacer 492).

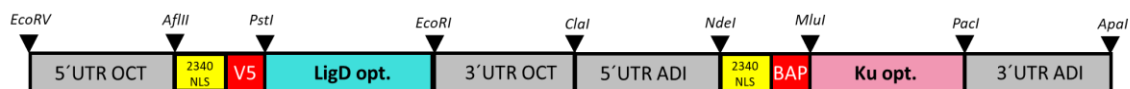
#### 4.2.3.3 pTetRaII\_NHEJ

Vektor pTetRaII\_NHEJ vznikl z vektoru pTetRaII vložením genu pro ligázu LigD pod *oct* promotor (mezi restrikční místa pro enzymy AflIII a EcoRI) a genu pro Ku protein i s UTR oblastmi (mezi restrikční místa pro enzymy ClaI a ApaI). Původní pTetRaII vektor nebyl použit z důvodu, že obsahoval dva stejné *oct* promotory i stejné příslušné 3'UTR oblasti, a tedy by mezi těmito oblastmi mohlo docházet k rekombinaci. Proto byl druhý *oct* promotor vyměněn za promotor arginin deiminázy.

V rámci tohoto konstruktu (Obr. 21) se nacházel gen pro ligázu LigD z *Mycobacterium tuberculosis* (LIGD\_MYCTU; Rv0938) s V5 tagem a jadernou lokalizační sekvencí 2340NLS na N-terminu. Exprese tohoto genu byla řízena 5'UTR oblastí genu *oct*. Předpokládaná molekulová hmotnost LigD včetně tagu a jaderné lokalizační sekvence byla 89 kDa. Dále byl součástí konstruktu gen pro Ku protein z *Mycobacterium tuberculosis* (KU\_MYCTU; Rv0937c) s BAP tagem a jadernou lokalizační sekvencí 2340NLS na N-terminu. Transkripce tohoto proteinu měla být možná díky 5'UTR genu GL50803\_112103 (arginin deimináza, ADI). Molekulová hmotnost Ku proteinu (s BAP tagem a NLS) byla přibližně 37 kDa.

Původní sekvence obou bakteriálních genů byly převzaty z databáze Uniprot a jejich kodónové složení bylo optimalizováno pro expresi v buňkách *G. intestinalis* (viz kapitola Optimalizace; optimalizované sekvence viz Příloha 1 a 2). Syntézu optimalizovaných sekvencí a jejich vložení do vektorů pUC57-mini provedla společnost Genscript Biotech. Z vektorů pUC57-mini byly oba

geny vyštěpeny restrikčními enzymy a přímo vloženy do vektoru pTetRaII. V případě Ku proteinu byly s genem do vektoru vloženy i komerčně nasyntetizované UTR oblasti.



**Obrázek 21:** Konstrukt pro tvorbu exprese mykobakteriálních genů pro ligázu LigD s V5 tagem (modře) a Ku protein s BAP tagem (růžově). K oběma genům byla přidána jaderná lokalizační sekvence (2340NLS).

## 4.3 Příprava konstruktů

### 4.3.1 Amplifikace genů

Inserty použité pro vytvoření nových konstruktů byly amplifikovány pomocí PCR (polymerase chain reaction). Složení PCR reakce a základní PCR program uvádí Tabulky 2 a 3.

Při amplifikaci genů pro OCT, GL50803\_9115, MOMP270 a všech „UTR“ oblastí byla templátem v PCR reakci genomová DNA získaná z plně narostlé 7ml kultury trofozoitů pomocí kitu Genomic DNA Mini Kit (Geneaid).

Gen pro tetracyklinový represor TetR byl amplifikován z plasmidu označovaného jako „TetR“ pocházejícího z laboratoře A. Hehla (vektor měl sloužit pro expresi TetR represoru v buňkách *G. intestinalis*). Sekvence amplifikovaného genu byla ověřena sekvenací a je uvedena v Příloze 3.

Templátem pro amplifikaci genu pro luciferázu NanoLuc byl plasmid pUCNanoLuc, který nám poskytl Mgr. Anna Novák Vanclová, Ph.D. Sekvence amplifikovaného genu ověřená sekvenací je uvedena v příloze (Příloha 4).

V případě amplifikace genu pro apoptotický protein Bak1 z genomu *Homo sapiens* (XM\_011514779.3) byla jako templát použita cDNA získaná z kultury lidských fibroblastů, kterou nám dali k dispozici pracovníci Laboratoře invazivity nádorových buněk v Biocevu (vedoucí doc. Brábek).

Kazeta pro transkripci guideRNA a gen pro PAC (s příslušným promotorem a terminátorem), které byly použity při konstrukci vektoru pTGuide, byly amplifikovány z vektoru „Cas9U6g1pac“ (McInally et al., 2019). Stejný plasmid byl použit jako templát při amplifikaci genu pro Cas9 (optimalizovaného pro expresi v *G. intestinalis*) taktéž s příslušnými UTR oblastmi.

U genu pro resistenci vůči blasticidinu (i s příslušnými UTR oblastmi) byl jako templát použit plasmid pUC57-mini\_T7RNAP\_V5, který byl získán komerční syntézou.

**Tabulka 2:** Složení PCR reakce

| Složka                                                | Množství do 25µl reakce   | Množství do 50µl reakce   |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 5X Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs)           | 5 µl                      | 10 µl                     |
| 10 mM dNTPs                                           | 0,5 µl                    | 1 µl                      |
| 10 µM Forward Primer                                  | 1,25 µl                   | 2,5 µl                    |
| 10 µM Reverse Primer                                  | 1,25 µl                   | 2,5 µl                    |
| DNA templát                                           | dle typu a konc. templátu | dle typu a konc. templátu |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,25 µl                   | 0,5 µl                    |
| dH <sub>2</sub> O                                     | doplněno do 25 µl         | doplněno do 50 µl         |

**Tabulka 3:** Základní PCR program (pro Q5 DNA polymerázu)

| Teplota  | Čas         |                      |
|----------|-------------|----------------------|
| 98 °C    | 30 s        | počáteční denaturace |
| 98 °C    | 10 s        | 30 cyklů             |
| 50–72 °C | 30 s        |                      |
| 72 °C    | 20–30 s/kbp |                      |
| 72 °C    | 2 min       | závěrečná syntéza    |
| 4 °C     | ∞           |                      |

V případě malého výtěžku byla PCR reakce optimalizována úpravou teploty annealing fáze, případně byl použit PCR program „Q5gradient“ (Tab. 4).

**Tabulka 4:** Program „Q5gradient“

| Teplota | Čas   |                                                                                     |
|---------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 98 °C   | 1 min | počáteční denaturace                                                                |
| 98 °C   | 10 s  | 20 cyklů (od druhého cyklu s každým cyklem klesá teplota annealing fáze (*) o 1 °C) |
| 65 °C * | 20 s  |                                                                                     |
| 72 °C   | 1 min |                                                                                     |
| 98 °C   | 10 s  | 10 cyklů                                                                            |
| 55 °C   | 20 s  |                                                                                     |
| 72 °C   | 1 min |                                                                                     |
| 72 °C   | 2 min | závěrečná syntéza                                                                   |
| 4 °C    | ∞     |                                                                                     |

#### 4.3.1.1 Použité primery

Všechny sekvenční údaje jsou uvedené v podobě 5'–3'. Jednotlivé tabulky s primery nejsou v této kapitole číslovány.

#### Konstrukty pro otestování T7 RNA polymerázy

| Primery pro EcoRV-T7promotor-OCT-PstI |                                                          |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| OCT_EcoRV_T7_F                        | CATGGATATCTAATACGACTCACTATAGCCATTAATGCCGTTC<br>AAGCAGACC |
| OCT_PstI_R_noS<br>TOP                 | CATGCTGCAGCTCCATCTTGCAGTCATG                             |

| Primery pro EcoRV-T7promotor-GL50803_9115-HAHA-STOP-ApaI |                                                                                         |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Gi_9115_EcoRV_T7_F                                       | CATGGATATCTAATACGACTCACTATAGCATGCAATGCAGGAAAG<br>GCACTTC                                |
| Gi_9115_HAHA_ApaI<br>STOP_R                              | CATGGGGCCCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGCGT<br>AATCTGGAACATCGTATGGGTACTTTTCGCAAAGGAATA |

#### Vektor pTetR

| Primery pro EcoRV-EcoRI-ClaI-XhoI-TetR-STOP-AgeI-ApaI |                                                |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| TetR+RS_F                                             | TGCAGATATCGAATTCATCGATCTCGAGATGTCTAGATTAGATAAA |
| TetR+RS_R                                             | GATCGGGCCCCACCGGTTTAAGACCCACTTTCACA            |

| Primery pro 3'UTR oblast konstruktů: AgeI-3'UTR-ApaI |                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------|
| 3'UTR_OCT_F                                          | CATGACCGGTTTCTTCTGTGTCTTAGTA |
| 3'UTR_OCT_R                                          | GATCGGGCCCTACGTTGATTCCCGGATG |

| Primery pro 5'UTR oblast konstruktů: ClaI-5'UTR-XhoI          |                              |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Barevně vyznačeno: restrikční místa pro ClaI a XhoI (červená) |                              |
| 5'UTR_OCT_F                                                   | TACCATCGATGTCAGCTTCATTTTATT  |
| 5'UTR_OCT_R                                                   | TGGACTCGAGTTTAATTTTCAGCCTCTA |

| Primery pro EcoRV-T7promotor-tetO-tetO-GL50803_9115-HAHA-STOP-EcoRI |                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T7_TetO_G6PI_F                                                      | CCATGATATCTAATACGACTCACTATAGTCCCTATCAGTGATAGAGAC<br>ATGCATCCCTATCAGTGATAGAGAATGCAGGAAAGGCACTTC |
| T7_TetO_G6PI_R                                                      | CATGGAATTC TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGCGTAA<br>TCTGGAACATCGTATGGGTACTTTTCGCAAAGGAATA      |

|                                                                              |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Primery pro 3'UTR oblast genu GL50803_9115: <b>EcoRI</b> -3'UTR- <b>ClaI</b> |                                         |
| 3'UTR_GPI_F                                                                  | CCAT <b>GAATTC</b> TTGATTTCGCAGTAAATT   |
| 3'UTR_GPI_R                                                                  | ATGG <b>ATCGATT</b> TGTTGGGCACGGCGTTTCG |

|                                                                  |                                                                          |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Primery pro <b>XhoI</b> -SV40NLS-TetR- <b>AgeI</b> - <b>ApaI</b> |                                                                          |
| XhoI_SV40NLS_Te<br>tR_F                                          | TGCA <b>CTCGAG</b> ATGA <b>AAGAAGAAGCGCAAGGT</b> GTCTAGATTA<br>GATAAAAGT |
| TetR+RS_R                                                        | GATC <b>GGGCCCACCGGT</b> TTAAGACCCACTTTCACA                              |

|                                                                                                      |                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primery pro Bak1 (bez tagu): <b>EcoRV</b> -T7promotor- <i>tetO</i> - <i>tetO</i> -Bak1- <b>EcoRI</b> |                                                                                                                   |
| Bak<br>1_F                                                                                           | CATG <b>GATATCTA</b> ATACGACTCACTATAGTCCCTATCAGTGATAGAGACATG<br>CAT <b>CCCTATCAGTGATAGAGA</b> AATGGCTTCGGGGCAAGGC |
| Bak<br>1_R                                                                                           | TGCAG <b>AATTCT</b> CATGATTTGAAGAATCTTCGTACCACAAACTGGCCCAACA<br>GAA                                               |

|                                                                                                                   |                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primery pro Bak1 (s dvěma HA tagy): <b>MluI</b> -HAHA-Bak1- <b>EcoRI</b>                                          |                                                                                                                  |
| MluI_HAH<br>A_Bak1_F                                                                                              | CATG <b>ACGCGT</b> ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTACCCA<br><b>TACGATGTTCCAGATTACGCT</b> GCTTCGGGGCAAGGCCCA       |
| Bak1_R                                                                                                            | TGCAG <b>AATTCT</b> CATGATTTGAAGAATCTTCGTACCACAAACTGGCC<br>CAACAGAA                                              |
| Oligonukleotid obsahující regulační oblast:<br><b>EcoRV</b> -T7 promotor- <i>tetO</i> - <i>tetO</i> - <b>MluI</b> |                                                                                                                  |
| T7TetOTet<br>O_MluI                                                                                               | TGCAG <b>GATATCTA</b> ATACGACTCACTATAGTCCCTATCAGTGATAGAG<br><b>ACATGCATCCCTATCAGTGATAGAGA</b> <b>ACGCGT</b> GATC |

|                                                                                                                                       |                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primery pro „MOMP270“ ve vektoru pTetR:<br><b>EcoRV</b> -T7promotor- <i>tetO</i> - <i>tetO</i> -MOMP270- <b>BA</b> Ptag- <b>EcoRI</b> |                                                                                                                    |
| MOMP<br>270_F                                                                                                                         | TGCAG <b>GATATCTA</b> ATACGACTCACTATAGTCCCTATCAGTGATAGAGACA<br>TGCAT <b>CCCTATCAGTGATAGAGA</b> AATGCCGGCTCACAGACAC |
| MOMP<br>270_R                                                                                                                         | GATC <b>GAATTCTTAC</b> TCGTGCCATTCTATCTTCTGAGCCTCAAAGATGTCA<br><b>TTTAGGCCCTCCTCTTTTTCCTCATC</b>                   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Primery pro amplifikaci prvních 150 párů bazí genu pro G-6-PI (GL50803_9115) a genu „MOMP270“, které byly spojeny metodou fúzní PCR (komplementární části jsou v sekvencích primerů vyznačeny <u>podtržením</u>) a poté vloženy do vektoru pTetR (který již obsahoval regulační oblast s T7 promotorem).</p> <p>Do genu G-6-PI byla zavedena mutace v rámci prvního ATG kodónu (byl zaměněn za <u>ATC</u>).</p> <p>Výsledný produkt: <b>MluI</b>-G-6-PI(105bp)-<b>AflII</b>-MOMP270-<b>BAP tag</b>-<b>EcoRI</b></p> |                                                                                 |
| AflII_MOMP35_270_F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | AACGCTTAAGATGCCGGCTCACAGACAC                                                    |
| MOMP270_R                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | GATCGAATTCTTACTCGTGCCATTCTATCTTCTGAGCCTCA<br>AAGATGTCATTTAGGCCCTCCTCTTTTCCTCATC |
| MluI_G6PI105_F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | TGCAACGCGTATCCAGGAAAGGCACTTCCG                                                  |
| G6PI105_AflII_R_overlap.to.MOMP270                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | GTCTGTGAGCCGGCATCTTAAGCGTTCCTGCGCTCGCGC                                         |

### Vektor pTetRall (inducibilní konstrukt s NanoLuc)

|                                                                                                                                |                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Primery pro 5'UTR oblast genu OCT (GL50803_10311): <b>EcoRV</b> -5'UTR- <b>AflII</b> - <i>tetO</i> - <b>PstI</b> - <b>MluI</b> |                                                                 |
| EcoRV_5UTROCT300_F                                                                                                             | CATAGATATCACAGCCCCGGCTGACGCG                                    |
| 5UTROCT_R_AflII_TetO_PstI_MluI                                                                                                 | CATGACGCGTCTGCAGTCTCTATCACTGATAGGGACTTA<br>AGTTTAATTTTCAGCCTCTA |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Primery pro přípravu další varianty regulační oblasti (s pěti operátory) NanoLuc (komplementární přesah sloužící ke spojení fúzní PCR je vyznačen <u>podtržením</u>)</p> <p><b>AflII</b>-<i>tetO</i>-<i>tetO</i>-<b>PstI</b></p> <p><b>PstI</b>-<i>tetO</i>-<i>tetO</i>-<i>tetO</i>-<b>MluI</b></p> |                                                                                           |
| TetO1                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CATGCTTAAGTCCCTATCAGTGATAGACATCCATCCCTATCAGTGATAG<br>AGACTGCAGTCCCTATCAGTG                |
| TetO2                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | GATCACGCGTTCTCTATCACTGATAGGGATGGATGTCTCTATCACTGATAG<br>GGATGGATGTCTCTATCACTGATAGGGACTGCAG |

|                                                                   |                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primery pro <b>MluI</b> -NanoLuc- <b>HAHA</b> -STOP- <b>EcoRI</b> |                                                                                           |
| MluI_NanoLuc_F                                                    | GATCACGCGTATGGTCTTCACACTCGAAGATTTCGTTGGGGACTG<br>GCGA                                     |
| HAHA_NanoLuc_EcoRI_R                                              | CATGGAATTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGCG<br>TAATCTGGAACATCGTATGGGTACGCCAGAATGCGTTCGCA |

|                                                                                     |                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Primery pro 3'UTR oblast genu OCT (GL50803_10311): <b>EcoRI</b> -3'UTR- <b>ClaI</b> |                              |
| EcoRI_3utrOCT294_F                                                                  | GATCGAATTCTTCTTGTGTCTTAGTA   |
| 3UTROCT294_ClaI_R                                                                   | GATCATCGATTGTTAATTGTCTTCAGGT |

### Příprava vektorů pro *cwp1* knock-out

|                                                                                                                                           |                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Primery pro konstrukt <b>KpnI</b> -5'UTR(genu pro MDH)-Cas9-SV40NLS-3xHA-2340NLS-3'UTR (genu pro alfa-tubulin)- <b>PacI</b> - <b>MluI</b> |                                                 |
| Cas9(pON)_F                                                                                                                               | CATG <b>GGTACCC</b> ACCCTTGTTTCTATAATG          |
| Cas9(pON)_R                                                                                                                               | CATG <b>ACGCGTTTAATTAA</b> AGGATGGACCAACGCCGTTG |

|                                                                                             |                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Primery pro 5'UTR oblast genu <i>cwp1</i> (988bp)<br><b>MluI</b> -5'UTRoblast- <b>AvrII</b> |                                           |
| 5'UTR_CWP1_F                                                                                | TGCA <b>ACGCGT</b> ATGTTAGATATTGTTTCGC    |
| 5'UTR_CWP1_R                                                                                | GATC <b>CCCTAGGCCCT</b> GATATTTTATTTCTGTG |

|                                                                                                          |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Primery pro 3'UTR oblast genu <i>cwp1</i> (998bp)<br><b>ClaI</b> -3'UTRoblast- <b>PacI</b> - <b>ApaI</b> |                                                |
| 3'UTR_CWP1_F                                                                                             | GATC <b>ATCGATC</b> CTAAACGGTAGCCACGAG         |
| 3'UTR_CWP1_R                                                                                             | TGCAG <b>GGCCCTTAATTAA</b> GTTGCAGACCAAGCTTCCG |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Primery pro amplifikaci kazety pro transkripci guideRNA a PAC genu (s příslušnými UTR oblastmi)<br>PCR produkt: <b>AvrII</b> -5'UTR (genu pro $\gamma$ -giardin)-PAC-3'UTR (genu pro GDH)-KpnI-5'UTR (genu pro U6 snRNA)-BbsI-BbsI-guideRNAscaffold-3'UTR (genu pro U6 snRNA)- <b>ClaI</b> |                                            |
| gRNAkonstrukt_F                                                                                                                                                                                                                                                                            | GATC <b>CCCTAGGGT</b> GATCAAATGCCTTCGAGCG  |
| gRNAkonstrukt_R                                                                                                                                                                                                                                                                            | TGCA <b>ATCGATG</b> TACCTTATAAGACAACATCAGC |

### Příprava vektorů pro testování c-NHEJ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Primery pro amplifikaci kazety pro transkripci guideRNA a PAC genu (s příslušnými UTR oblastmi)<br>PCR produkt: <b>MluI</b> -5'UTR (genu pro $\gamma$ -giardin)-PAC-3'UTR (genu pro GDH)-KpnI-5'UTR (genu pro U6 snRNA)-guideRNA492+scaffold-3'UTR (genu pro U6 snRNA)- <b>PacI</b> |                                              |
| NHEJ_PAC_guide_MluI_F                                                                                                                                                                                                                                                               | AAAC <b>ACGCGT</b> GTGATCAAATGCCTTCGAG       |
| NHEJ_PAC_guide_PacI_R                                                                                                                                                                                                                                                               | GATC <b>TTAATTAA</b> GTACCTTATAAGACAACATCAGC |

|                                                                                                                                                                                      |                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Primery pro amplifikaci genu pro blasticidinovou resistenci s UTR oblastmi<br>Produkt: <b>MluI</b> -5'UTR (pyruvát dikinázy)-blasticidin res. -3'UTR (pyruvát dikinázy)- <b>KpnI</b> |                                            |
| BlastDoNHEJ_MluI_F                                                                                                                                                                   | GATC <b>ACGCGT</b> ATGTACTTTCTAACAGAACTCC  |
| BlastDoNHEJ_KpnI_R                                                                                                                                                                   | AAAC <b>GGTACCT</b> ACGTTCTTCCGCTCATGATACC |

### 4.3.2 Optimalizace kodónového složení genů

Sekvence genů pro Ku a LigD z genomu *Mycobacterium tuberculosis* byly optimalizovány pro expresi v buňkách *G. intestinalis*. Optimální kodónové složení sekvence bylo stanoveno pomocí nástroje Reverse translate v rámci Sequence Manipulation Suite ([http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)). Pro optimalizaci byla použita tabulka četnosti jednotlivých kodónů pro *Giardia intestinalis* [gbinv] sestavená na základě 367 kódujících sekvencí (viz Příloha 6) uvedená v databázi Codon Usage Database (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>).

### 4.3.3 Klonování

#### 4.3.3.1 Izolace PCR produktů

Produkty PCR reakce byly rozděleny pomocí horizontální elektroforézy za použití 0,7–1,5% agarózových gelů a byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Za účelem vizualizace bylo do gelu přidáno barvivo SYBR Safe (Invitrogen). Před nanesením PCR produktů na gel k nim byl přidán TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Velikost PCR produktů byla určena pomocí standardu O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Ready-to-Use 100–10,000 bp (Thermo Scientific) nebo (v případě produktů menších velikostí) O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use 25–700 bp (Thermo Scientific). Fragmenty vybrané velikosti byly z gelu izolovány pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

#### 4.3.3.2 Restrikční reakce

DNA produkty izolované z gelu a plasmidy byly štěpeny restrikčními enzymy (New England BioLabs). Trvání a teplota inkubace restrikční reakce stejně jako typ použitého restrikčního pufru byly voleny dle doporučení výrobce enzymu. Produkty restrikční reakce byly přečištěny pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) (v případě insertů) či nejprve vizualizovány na agarózovém gelu, ze kterého byly izolovány stejným kitem (v případě plasmidů).

#### 4.3.3.3 Precipitace DNA

V některých případech pokusy o vložení insertu do plasmidu selhaly, pravděpodobně v důsledku malého výtěžku PCR reakce nebo velkých ztrát při izolaci DNA z agarózového gelu a přečištění restrikční reakce. V těchto případech byl použit následující postup. Po skončení PCR reakce byl odebrán malý vzorek produktu, jehož velikost byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy a UV transiluminátoru. Zbytek reakce byl přečištěn metodou srážení DNA (viz dále). Tento postup byl v některých případech aplikován i při izolaci DNA insertu po restrikční reakci.

K PCR/restrikční reakci byl přidán 2,5x větší objem 96% etanolu, obsah zkumavky byl důkladně promíchán, zkumavka byla ponořena do tekutého dusíku a následně uložena na 20 minut do mrazáku (-20 °C). Poté byla zkumavka stočena (30 000 x g, 30 minut při 4 °C). Následně byla opatrně pipetou odsána většina supernatantu a pelet byl opět stočen (30 000 x g, 30 minut při 4 °C). Nakonec byla opatrně pipetou odstraněna veškerá tekutina a pelet byl ponechán v otevřené zkumavce, aby se odpařily zbytky etanolu. Suchý pelet byl resuspendován v destilované vodě.

#### 4.3.3.4 Ligace

Ligační reakce byla připravena dle Tabulky 5. Reakce probíhala přes noc při teplotě 16 °C. U konstruktů, které se nepodařilo vložit do vektoru napoprvé, byl aplikován alternativní postup: ligační reakce byla cca 1–2 hodiny inkubována ve 4 °C a poté přes noc při teplotě 16 °C.

**Tabulka 5:** Složení ligační reakce

| Složka                                       | Množství     |
|----------------------------------------------|--------------|
| T4 DNA ligáza (New England BioLabs)          | 1 µl         |
| pufr pro T4 DNA ligázu (New England BioLabs) | 2 µl         |
| vektor (po restrikci a přečištění)           | 0,5 – 2 µl   |
| insert (po restrikci a přečištění)           | 15 – 16,5 µl |
| Celkový objem                                | 20 µl        |

#### 4.3.2.5 Přidávání nových klonovacích míst do plasmidů

Zavedení nových klonovacích míst (multiple cloning sites) rozeznávaných restrikními enzymy do vektorů pTG a pONDRA bylo dosaženo PCR reakcí, při které byl amplifikován celý plasmid či jeho část pomocí primerů obsahujících příslušná restrikní místa. Získaný produkt byl poté štěpen enzymem, který rozeznal restrikní místo na obou koncích PCR produktu, a následná ligace dala vzniknout cirkulární molekule. Použité primery jsou uvedeny v Tabulkách 6 a 7.

**Tabulka 6:** Primery pro přípravu vektoru pTGuide

|                                                                                                                                                                                             |                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Primery pro přidání MCS do plasmidu pTG<br>PCR produkt: <b>MluI-AvrII-ClaI-PacI</b> -pTG (plasmid bez genu pro PAC a příslušných UTR oblastí a bez <i>oct</i> promotoru)- <b>MluI-AvrII</b> |                                                                       |
| pTG_MluAvrClaPa<br>c_F                                                                                                                                                                      | GATC <b>ACGCGT</b> CCTAGGATCGATT <b>TAATTAAGGGCCCGACAC</b><br>GTACCGC |
| pTG_MluI_R                                                                                                                                                                                  | TGCAC <b>CTAGGACGCGT</b> CAGCTTTTGTTCCTTTAGTG                         |

**Tabulka 7:** Primery pro přípravu vektoru pONDRAcas9

|                                                                                                                                |                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Primery pro přidání MCS do plasmidu pONDRA<br>PCR produkt: <b>MluI</b> -pONDRA(bez promotorové oblasti)- <b>KpnI-PacI-MluI</b> |                                                            |
| pONKpnIPacIMluI<br>_F                                                                                                          | CATG <b>ACGCGT</b> CCAGCTTTTGTTCCTTTAG                     |
| pONKpnIPacIMluI<br>_R                                                                                                          | CATG <b>ACGCGT</b> TTAATTAAGGTACCGTAACGAACCGCTAGAA<br>GAGC |
| Primery pro ověření přítomnosti MCS vloženého do vektoru pONDRA                                                                |                                                            |
| NeoCTRL_F                                                                                                                      | GCTTTTCTGGATTCATCG                                         |
| KpnIPacIMluICTRL_<br>R                                                                                                         | GCGTTTAATTAAGGTACC                                         |

### 4.3.3.6 Klonování více fragmentů

#### 4.3.3.6.1 Fúzní PCR

V případě fúzního konstruktů obsahujícího část genu pro G-6-PI a gen pro „MOMP270“ byla (podobně jako při tvorbě regulační oblasti vektoru pTetRaII) použita metoda fúzní PCR. Nejprve byly amplifikovány dva inserty, které obsahovaly komplementární sekvenci v místě, kde měly být inserty spojeny. Poté byla připravena PCR reakce, při které došlo ke spojení těchto dvou fragmentů na základě komplementarity a amplifikaci obou insertů jako celku.

Postup:

- 1) Oba spojované inserty byly zvlášť amplifikovány
- 2) Byla připravena PCR reakce (Tab. 8 a 9)

**Tabulka 8:** Složení reakce pro fúzní PCR (\* na základě předchozí vizuální analýzy množství DNA obou insertů na agarózovém gelu byl do reakce přidán takový objem, aby množství DNA bylo přibližně stejné)

| Složka                                                | Množství do 25µl reakce |
|-------------------------------------------------------|-------------------------|
| 5X Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs)           | 5 µl                    |
| 10 mM dNTPs                                           | 0,5 µl                  |
| insert č.1                                            | *                       |
| insert č.2                                            | *                       |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,25 µl                 |
| dH <sub>2</sub> O                                     | doplněno do 25 µl       |

**Tabulka 9:** Program pro fúzní PCR

| Teplota  | Čas         |                      |
|----------|-------------|----------------------|
| 98 °C    | 30 s        | počáteční denaturace |
| 98 °C    | 10 s        | 10 cyklů             |
| 50–72 °C | 30 s        |                      |
| 72 °C    | 20–30 s/kbp |                      |
| 72 °C    | 2 min       | závěrečná syntéza    |
| 4 °C     | ∞           |                      |

- 3) Po skončení PCR programu byly do reakce přidány primery pro amplifikaci fúzní molekuly DNA a proběhla PCR reakce dle následujícího programu (Tab. 10 a 11)

**Tabulka 10:** Složky doplněné do reakce z Tabulky 8

| Složka                                   | Množství do 25 $\mu$ l reakce |
|------------------------------------------|-------------------------------|
| 10 $\mu$ M Forward Primer (insertu č. 1) | 1,25 $\mu$ l                  |
| 10 $\mu$ M Reverse Primer (insertu č. 2) | 1,25 $\mu$ l                  |

**Tabulka 11:** program pro druhý krok fúzní PCR

| Teplota  | Čas         |                      |
|----------|-------------|----------------------|
| 98 °C    | 30 s        | počáteční denaturace |
| 98 °C    | 10 s        | 25 cyklů             |
| 50–72 °C | 30 s        |                      |
| 72 °C    | 20–30 s/kbp |                      |
| 72 °C    | 2 min       | závěrečná syntéza    |
| 4 °C     | $\infty$    |                      |

#### 4.3.3.6.2 Spojování fragmentů ligací a následnou PCR

U konstruktů, které se skládaly z více insertů, jež bylo nutno do vektoru klonovat postupně, bylo v několika případech problematické či dokonce nemožné standartně používanými metodami klonování dospět k žádanému výsledku. Příkladem byla konstrukce vektoru pTGuide, ve kterém bylo nedopatřením u jednoho z insertů zvoleno restrikční místo ClaI. Fragment s tímto restrikčním místem (ClaI-3'UTR CWP1-PacI-ApaI) sice mohl být do vektoru úspěšně vložen, nicméně po namnožení tohoto plasmidu v buňkách *E. coli* kmene TOP10, již výsledný plasmid v tomto místě nebylo možné štěpit za účelem vložení dalšího insertu (pravděpodobně z důvodu blokování restrikčního místa Dam metylací adeninu). Aby nebylo nutné objednávat jiné primery, byl aplikován alternativní postup, kterým bylo možné nejprve dva inserty, mezi kterými se nevhodně zvolené restrikční místo nacházelo, ligovat dohromady, výslednou fúzní molekulu amplifikovat pomocí PCR a teprve poté vložit do vektoru, který byl namnožen v bakteriálních buňkách. Stejná strategie byla aplikována i při konstrukci vektoru pTetRaII. Postup byl následující:

- 1) Pomocí PCR byly amplifikovány insert č. 1 a insert č. 2
- 2) Oba inserty byly inkubovány s enzymem, jehož restrikční místo se ve výsledném konstruktu nachází mezi insertem č. 1 a insertem č.2 (u výše zmíněného příkladu ClaI). Produkty restrikční reakce byly přečištěny (kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) nebo precipitací s etanolem)
- 3) Insert č. 1 a insert č. 2 byly použity jako templáty jedné ligační reakce
- 4) Produkt ligace byl amplifikován pomocí PCR reakce (např. pomocí Forward primeru, použitého při amplifikaci insertu č.1 a Reverse primeru použitého při amplifikaci insertu č.2)

5) PCR produkt správné velikosti byl izolován z gelu, inkubován s příslušnými restrikčními enzymy a ligován do cílového vektoru

#### 4.3.3.7 Transformace

Celá ligační reakce byla přidána ke kompetentním bakteriím *E. coli* kmene TOP 10 a byla provedena transformace a výsev na plotny se selekčním antibiotikem (viz kapitola 4.1.1).

#### 4.3.3.8 Testování bakteriálních kolonií

Narostlé kolonie na plotnách byly nejprve jednotlivě přeneseny do zkumavek se sterilní destilovanou vodou a byly v ní resuspendovány. Z výsledné suspenze byl odebráno 10 µl do mikrozkušavky, která byla v cycleru zahřívána dle následujícího programu (Tab. 12). Zbytek buněčné suspenze byl uložen do lednice.

**Tabulka 12**

| Teplota | Čas  |
|---------|------|
| 95 °C   | 15 s |
| 45 °C   | 15 s |
| 95 °C   | 15 s |
| 45 °C   | 15 s |
| 15 °C   | ∞    |

Následně byla provedena PCR reakce (Tab. 13 a 14). Jako testovací primery pro ověření přítomnosti úspěšně integrovaného genu zájmu byly ve většině případů použity primery, které předtím sloužily k amplifikaci tohoto genu. V případech, kdy bylo nutné použít pro detekci insertu jiné primery, byly použity primery uvedené v tabulce níže. Výsledek PCR reakce byl po rozdělení pomocí agarózové elektroforézy vizualizován UV transiluminátorem.

**Tabulka 13:** Složení PCR reakce pro testování kolonií

| Složka                              | Množství |
|-------------------------------------|----------|
| Emerald PCR Master Mix (Takara Bio) | 12,5 µl  |
| 10 µM Forward primer                | 0,5 µl   |
| 10 µM Reverse primer                | 0,5 µl   |
| bakterie                            | 10 µl    |
| dH <sub>2</sub> O                   | 1,5 µl   |
| Celkový objem                       | 25 µl    |

**Tabulka 14:** PCR program pro testování kolonií

| Teplota | Čas       |                      |
|---------|-----------|----------------------|
| 98 °C   | 2 min     | počáteční denaturace |
| 98 °C   | 10 s      | 30 cyklů             |
| 60 °C   | 30 s      |                      |
| 72 °C   | 1 min/kbp |                      |
| 72 °C   | 4 min     | závěrečná syntéza    |
| 4 °C    | ∞         |                      |

Po otestování kolonií pomocí PCR bylo vybráno několik pozitivních kolonií (s PCR produktem správné velikosti) a tyto kolonie, resp. z nich vzniklá buněčná suspenze, byly vloženy do 5 ml LB média s obsahem selekčního antibiotika ampicilinu o koncentraci 100 µg/ml. Kultura byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C na třepačce (220 rpm). Druhý den byla z narostlé kultury izolována plasmidová DNA pomocí kitu High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid).

Úspěšnost klonování byla ověřena restrikční reakcí následujícího složení (Tab. 15). Produkt restrikční reakce byl rozdělen a vizualizován na agarózovém gelu.

**Tabulka 15:** Složení reakce pro kontrolní restrikci

| Složka                                      | Množství |
|---------------------------------------------|----------|
| Plasmidová DNA                              | 5 µl     |
| FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific) | 2 µl     |
| Restrikční enzym 1                          | 0,5 µl   |
| Restrikční enzym 2                          | 0,5 µl   |
| dH <sub>2</sub> O                           | 12 µl    |
| Celkový objem                               | 20 µl    |

Koncentrace izolované plasmidové DNA byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), aby mohla být připravena sekvenační reakce. Pro sekvenaci byly použity primery uvedené výše či sekvenační primery uvedené zde (Tab. 16 –18).

**Tabulka 16:** Primery pro Cas9

| Primery pro ověření sekvence Cas9 | 5'–3'              |
|-----------------------------------|--------------------|
| Cas9seq500_F                      | CATATCATGAAAAGTACC |
| Cas9seq1000_F                     | CTCCTATCTGACATACTG |
| Cas9seq1500_F                     | CACAGTTTACTTTACGAG |
| Cas9seq2000_F                     | AAAGAGCGACGGCTTCGC |
| Cas9seq2500_F                     | AACCGAGGGAAAAGTGAC |
| Cas9seq3000_F                     | AATCACTCTGGCAAACGG |
| Cas9seq3500_F                     | AAATACGTGAATTTCTG  |
| Cas9seq600_R                      | TCGACATCCGAGTTGTCC |

**Tabulka 17:** Primery pro LigD

| Primery pro ověření sekvence LigD | 5'–3'                      |
|-----------------------------------|----------------------------|
| LigDnlsV5_F (AflII)               | CATGCTTAAGATGCCAGAGAAGAAGC |
| LigD_R (EcoRI)                    | GATCGAATTCTTACTCGCGGAC     |
| LigDseq1_F                        | TTCTTCGAGAAGCAGCTC         |
| LigDseq2_F                        | TTACGACGAGGTCCTCAC         |
| LigDseq3_F                        | ACACCGAGAAGTTCCACG         |
| LigDseq4_F                        | GTCAAGGACAAGCACTGG         |

**Tabulka 18:** Primery pro Ku

| Primery pro ověření sekvence Ku | 5'–3'                   |
|---------------------------------|-------------------------|
| KuUTRsNLSbap_F                  | CATGATCGATAGATCTACTGTGG |
| KuUTRsNLSbap_R                  | GATCGGGCCCGCTAGCCTGCAC  |

#### 4.3.3.9 Design a klonování guideRNA

Vhodné spacery komplementární k *cwpI* lokusu byly navrženy a vloženy do vektoru pTGuide dle následujícího protokolu. Gen pro druhou část molekuly guideRNA, tzv. scaffold, byl již v rámci vektoru obsažen.

1) V prostředí platformy Benchling (<https://www.benchling.com>) byly dle sekvence *cwpI* genu vybrány vhodné spacer sekvence, komplementární k sekvenci tohoto genu. Byly hledány spacery pro použití jako „single guideRNA“ (výsledný vektor měl umožnit transkripci pouze jediné guideRNA) dlouhé 20 párů bází a zároveň komplementární k sekvenci v rámci *cwpI* genu, na jejímž 3' konci se nachází PAM sekvence 5'-NGG-3' (tedy kompatibilní s použitím SpCas9 ze *Streptococcus pyogenes*). U vybraných sekvencí byly pomocí nástroje EuPaGDT (Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool) zjištěny případné nespecifické cíle (off-targets) v genomu *G. intestinalis*, ke kterým by konkrétní guideRNA mohla být také komplementární. Nakonec bylo ověřeno, zda vybrané sekvence neobsahují restrikční místo pro BbsI (tímto restrikčním enzymem je štěpen plasmid, aby do něj mohl být spacer vložen). Ke každému spaceru byla objednána syntéza dvou komplementárních molekul DNA, z nichž k jedné z nich (F) byla na 5' konec přidána sekvence CGGC a k druhé (R) byla na 5' konec přidána sekvence AAAC. Po asociaci komplementárních oligonukleotidů tyto přesahy slouží k ligaci do vektoru naštěpeného pomocí BbsI. Pro tento experiment byly vybrány tři různé spacery (označované jako 96, 492 a 645 dle očekávaného místa štěpení Cas9 endonukleázou v rámci *cwpI* genu), jejichž sekvence jsou uvedeny v Tabulce 19.

**Tabulka 19:** Oligonukleotidy pro klonování spacerů do vektoru pTGuide

| Název      | Sekvence (5'–3')         |
|------------|--------------------------|
| CWP1_492_F | CGGCACAGCTGATTGCAGTCTAGG |
| CWP1_492_R | AAACCCTAGACTGCAATCAGCTGT |
| CWP1_645_F | CGGCGATGTCGACTGTGAGAACTG |
| CWP1_645_R | AAACCAGTTCTCACAGTCGACATC |
| CWP1_96_F  | CGGCGAAATCTACGATGCCACTGA |
| CWP1_96_R  | AAACTCAGTGGCATCGTAGATTTC |

2) Oligonukleotidy byly rozpuštěny ve sterilní destilované vodě, aby výsledná koncentrace byla 100  $\mu\text{M}$ , a byly přidány do reakce umožňující asociaci komplementárních oligonukleotidů (Tab. 20). Směs byla inkubována při 95 °C po dobu 5 minut v ohřívacím blokovém termostatu. Poté byl termostat vypnut a reakční směs ponechána uvnitř, aby pomalu vychladla (cca 2,5 hodiny). Poté byly zkumavky umístěny na led.

**Tabulka 20:** Reakce pro spárování komplementárních oligonukleotidů

| Složka                                       | Množství         |
|----------------------------------------------|------------------|
| dH <sub>2</sub> O                            | 14 $\mu\text{l}$ |
| Forward oligo (100 $\mu\text{M}$ )           | 2 $\mu\text{l}$  |
| Reverse oligo (100 $\mu\text{M}$ )           | 2 $\mu\text{l}$  |
| Pufr pro T4 DNA ligázu (New England BioLabs) | 2 $\mu\text{l}$  |
| Celkový objem                                | 20 $\mu\text{l}$ |

3) Byla připravena reakce, při které došlo ke štěpení plasmidu a ligaci s příslušnými oligonukleotidy (Tab. 21). Reakční směs byla vložena do cycleru, kde byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin a poté při 65 °C po dobu 10 minut (aby došlo k deaktivaci ligázy a restrikčních enzymů).

**Tabulka 21:** Složení restrikčně-ligační reakce

| Složka                                        | Množství         |
|-----------------------------------------------|------------------|
| dH <sub>2</sub> O                             | 14 $\mu\text{l}$ |
| NEBuffer™2.1 (New England BioLabs)            | 2 $\mu\text{l}$  |
| plasmid (100ng/ $\mu\text{l}$ )               | 1 $\mu\text{l}$  |
| guideRNA oligonukleotidy (z předchozí reakce) | 1 $\mu\text{l}$  |
| BbsI (New England BioLabs)                    | 1 $\mu\text{l}$  |
| T4 DNA ligáza (New England BioLabs)           | 1 $\mu\text{l}$  |
| Celkový objem                                 | 20 $\mu\text{l}$ |

4) Byla provedena transformace kompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 (viz kapitola 4.1.1) za přidání 2 µl z předchozí restrikčně-ligační reakce. Bakterie byly rozetřeny na plotnu s obsahem selekčního antibiotika ampicilinu (Sigma) a byly inkubovány v termostatu při 37 °C přes noc.

5) Dvě vybrané kolonie byly přeneseny do 5 ml LB média s obsahem ampicilinu (100 µg/ml) a inkubovány na třepačce (220 rpm) při 37 °C přes noc. Poté byla z bakterií izolována plasmidová DNA pomocí kitu High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) a byla provedena eluce izolované DNA do 30 µl dH<sub>2</sub>O. Pomocí přístroje NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) byla stanovena koncentrace DNA a integrace spacer DNA do plasmidu byla ověřena sekvenací (Tab. 22).

**Tabulka 22**

| Primery pro ověření sekvence spacer DNA vložené do vektoru pTGuide |                                   |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| gRNAkonstruktSEQ1_F                                                | GGTGCATGACCCGCAAGC                |
| gRNAkonstrukt_R                                                    | TGCAATCGATGTACCTTATAAGACAACATCAGC |

#### 4.3.4 Transfekce buněk *G. intestinalis*

##### 4.3.4.1 Příprava plasmidové DNA na transfekci

Plasmidy, jež dle výsledků sekvenace odpovídaly navrženému konstrukt, byly namnoženy v kompetentních bakteriích *E. coli* kmene TOP 10. Z 75 ml narostlé bakteriální kultury (přes noc, při teplotě 37 °C, na třepačce (220 rpm), v LB médiu s obsahem ampicilinu o koncentraci 100 µg/ml) byla izolována plasmidová DNA pomocí kitu Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Získaná plasmidová DNA byla použita na transfekci buněk *G. intestinalis* metodou elektroporace (viz kapitola 4.1.2).

##### 4.3.4.2 Elektroporace PCR produktem

Za účelem maximálního zjednodušení procesu odstraňování kopií genů z genomu pomocí CRISPR-Cas9 technologie (a následné homologní rekombinace) byla testována možnost transfekovat Cas9 buňky nikoliv celým plasmidem pTGuide, ale pouze jeho částí v lineární podobě obsahující kazetu pro transkripci guideRNA, gen pro selekční marker (PAC) a příslušná homologní raménka nutná pro integraci do genomu v místě vytvořeného zlomu. Tento úsek vektoru byl amplifikován pomocí PCR reakce. Abychom zjistili, jak dlouhá homologní raménka stačí na integraci konstrukt do genomu a odstranění všech kopií *cwpI* genu, transfekovali jsme buňky několika verzemi zmíněného konstrukt s různými délkami těchto ramének (označovaných jako 5'UTR a 3'UTR CWP1 oblasti; Tab. 23).

Při navrhování primerů bylo dbáno na optimální vlastnosti jednotlivých primerů a kompatibilitu v rámci konkrétní dvojice primerů. Z toho důvodu nemohla být délka 5'UTR a 3'UTR oblasti (tj. homologních ramen) v rámci jednoho konstrukt stejná. Vzniklé PCR produkty jsou v této práci označovány dle Tabulky 23. Sekvence primerů použitých k amplifikaci jednotlivých konstruktů uvádí Tabulka 24.

**Tabulka 23**

| Označení PCR produktu | přesná délka 5'UTR | přesná délka 3'UTR |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| <b>1000</b>           | 988                | 998                |
| <b>800</b>            | 809                | 810                |
| <b>700</b>            | 713                | 716                |
| <b>600</b>            | 620                | 604                |
| <b>500</b>            | 500                | 482                |
| <b>400</b>            | 416                | 444                |
| <b>300</b>            | 328                | 322                |
| <b>200</b>            | 223                | 230                |
| <b>150</b>            | 133                | 150                |
| <b>50</b>             | 88                 | 69                 |

**Tabulka 24**

| Označení PCR produktu | Název primeru | Sekvence (5'–3')                          |
|-----------------------|---------------|-------------------------------------------|
| 1000                  | 5'UTR_CWP1_F  | TGCAACGCGTATGTTAGATATTGTTCGC              |
|                       | 3'UTR_CWP1_R  | TGCAGGGCCCTTAATTAAGTTGCAGACCAAGCTTC<br>CG |
| 800                   | HA 809_F      | TATGATTGCTGCTCAAGC                        |
|                       | HA 810_R      | CGATTAAGGAGGATAACG                        |
| 700                   | HA 713_F      | GATAGCTTCCAACTTTGG                        |
|                       | HA 716_R      | ATTGGTTGAACTTCTTCG                        |
| 600                   | HA 620_F      | GGTGGCTGCTAATAAAGG                        |
|                       | HA 604_R      | AAGCAGTACAGGACTATC                        |
| 500                   | HA 500_F      | TATCTGCAAGCTCTTAGC                        |
|                       | HA 482_R      | TCAGGAGCAACACTACAG                        |
| 400                   | HA 416_F      | TTCTCTTGACTGTGTTCG                        |
|                       | HA 444_R      | GTCACGTACCAGTTATCC                        |
| 300                   | HA 328_F      | CTTCTGCTGGCAATTGAG                        |
|                       | HA 323_R      | CTCTACGGAGACTTTCTC                        |
| 200                   | HA 223_F      | AGGACATGGGTCGATGTG                        |
|                       | HA 230_R      | TCACAGGAGGCCATAGAG                        |
| 150                   | HA 133_F      | TCATTCTCTTGTTCTAGC                        |
|                       | HA 150_R      | AACGATCAGCAAGTTCTG                        |
| 50                    | HA 88_F       | GGCTAACAGTCTACAGTC                        |
|                       | HA 69_R       | CCCATATTCTGTAAATGC                        |

Za předpokladu, že pro transfekci PCR produktem bude třeba zhruba stejné množství DNA jako při transfekci plasmidem, při které se k buňkám do elektroporační kyvety přidává 25–100 µg DNA, jsme se pokoušeli získat alespoň řádově podobné množství PCR produktu. Postup, jak docílit žádaného výtěžku PCR reakce a minimalizovat ztráty způsobené izolací PCR produktu z gelu, musel být optimalizován.

Největší množství DNA bylo získáno za použití následujícího postupu:

1) V prvním kroku byly připraveny tři PCR reakce (složení a PCR program viz část Amplifikace genů) o objemu 25 µl a pro každou z těchto reakcí byla nastavena jiná teplota annealing fáze (v případě, že už bylo známo, jaká je optimální teplota pro danou dvojici primerů, tak byla připravena pouze jedna reakce). Produkty reakce byly rozděleny pomocí agarózové elektroforézy a vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Fragment žádané velikosti byl z gelu izolován za použití kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). DNA byla eluována 30 µl elučního pufru obsaženého ve zmíněném kitu.

2) Následně byly připraveny tři PCR reakce o objemu 50 µl, přičemž do každé z nich bylo přidáno 5 µl produktu PCR reakce z prvního kroku, který měl sloužit jako templát. Po skončení PCR byly 3 µl produktu vizualizovány na agarózovém gelu. Pokud byl získán pouze fragment žádané velikosti, byl zbytek PCR produktu (produkt všech tří PCR reakcí dohromady) přečištěn srážením s 96% EtOH a eluován do 50 µl vody. Koncentrace DNA v eluci byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a celý objem byl použit na transfekci buněk.

### **4.3.5 Testování vytvořených buněčných linií**

#### **4.3.5.1 Indukce exprese tetracyklinem**

Pro indukci exprese bylo při experimentech používáno antibiotikum tetracyklin (Sigma Aldrich) nejčastěji o koncentraci 5 µg/ml. Indukce probíhala po dobu 48 hodin a poté byl z buněk připraven buněčný lyzát. U experimentů, u kterých byla použita jiná koncentrace tetracyklinu či jiná doba inkubace s tetracyklinem, jsou konkrétní hodnoty uvedeny (viz Výsledky).

#### **4.3.5.2 Inhibice NHEJ dráhy pomocí inhibitoru Scr7**

U eukaryotických buněk se pro inhibici c-NHEJ dráhy používá inhibitor Scr7, který brání vazbě mezi molekulou DNA a DNA vazebnou doménou DNA ligázy IV (Srivastava et al., 2012; Yeh et al., 2019). V této práci byl použit roztok Scr7 pyrazinu (Sigma Aldrich) v DMSO k inhibici bakteriální ligázy LigD. Po otestování vlivu různých koncentrací tohoto inhibitoru na růst buněk (viz Výsledky), byl v rámci experimentu použit inhibitor o 50 µM koncentraci. Tento inhibitor byl k buňkám přidán již dva dny před elektroporací pTGuideNHEJblast vektoru. Po elektroporaci byl k buňkám inhibitor také přidán.

#### **4.3.5.3 Izolace RNA, 5'RACE**

RNA byla z buněk nesoucích plasmid pTetR s genem pro G-6-PI a zároveň plasmid pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS a z buněk obsahujících pouze první ze zmíněných vektorů izolována po indukci tetracyklinem (5 µg/ml; 48 hodin) pomocí kitu NucleoSpin RNA

(Macherey-Nagel). Získaná RNA byla zpracována pomocí kitu FirstChoice RLM-RACE Kit (Invitrogen). Po reverzní transkripci byla připravena PCR reakce s obsahem vnějších primerů - tzv. „Outer 5'RACE Primers“ pro první krok amplifikace genu zájmu (G-6-PI). „5'RACE Outer primer\_F“ komplementární k sekvenci adaptéru, který byl ligován k molekulám mRNA, byl součástí kitu FirstChoice RLM-RACE Kit (Invitrogen) a jeho sekvence je stejně jako sekvence primeru specifického pro gen G-6-PI uvedena v Tabulce 25. Složení reakce uvádí Tabulka 26. Pro amplifikaci byl použit program doporučený výrobcem kitu (Tab. 27).

**Tabulka 25**

| Vnější (outer) primery pro 5'RACE      |  |                           |
|----------------------------------------|--|---------------------------|
| 5'RACE Outer Primer_F (obsažen v kitu) |  | CTGATGGCGATGAATGAACACTG   |
| 5'RACE gene-specific outer primer_R    |  | TCCATCCTAAGATTGTAGTGATCCA |

**Tabulka 26:** Složení PCR reakce - 5'RACE (1. krok)

| Složka                                                | Množství |
|-------------------------------------------------------|----------|
| Produkt reverzní transkripce                          | 1 µl     |
| 10X PCR Buffer (obsažen v kitu)                       | 5 µl     |
| dNTP mix (obsažen v kitu)                             | 4 µl     |
| 5' RACE gene-specific outer primer_R (10 µM)          | 2 µl     |
| 5' RACE Outer Primer_F (obsažen v kitu)               | 2 µl     |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,6 µl   |
| dH <sub>2</sub> O (nuclease-free)                     | 35,4 µl  |
| Celkový objem                                         | 50 µl    |

**Tabulka 27:** PCR program - 5'RACE (platí pro první i druhý krok amplifikace)

| Teplota | Čas   |                        |
|---------|-------|------------------------|
| 94 °C   | 3 min | počáteční denaturace   |
| 94 °C   | 30 s  | 35 cyklů (amplifikace) |
| 60 °C   | 30 s  |                        |
| 72 °C   | 30 s  |                        |
| 72 °C   | 7 min | závěrečná syntéza      |
| 4 °C    | ∞     |                        |

Druhý krok (Inner 5' RLM-RACE PCR) amplifikace byl proveden za pomoci vnitřních (inner) primerů (Tab. 28 a 29) opět dle programu doporučeného výrobcem kitu (Tab. 27). Reverzní inner primer specifický pro gen G-6-PI byl záměrně navržen tak, aby obsahoval restrikční místo (pro MluI), které by umožnilo zaklonování finálního produktu do plasmidu. Forward primer, který je součástí kitu, obsahoval restrikční místo pro BamHI. Byla připravena i kontrolní reakce bez obsahu templátu. Pro amplifikaci byl použit stejný program jako v předchozím kroku.

**Tabulka 28**

| Vnitřní (inner) primery pro 5' RACE       |                                             |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 5' RACE Inner Primer_F (obsažen v kitu)   | CGC <b>GGATCC</b> GAACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG  |
| 5' RACE gene-specific inner primer_MluI_R | TGCA <b>ACGCGT</b> CCGTTGGGTGCTTAGTAACATTAA |

**Tabulka 29:** Složení PCR reakce - 5' RACE (2. krok)

| Složka                                                | Množství |
|-------------------------------------------------------|----------|
| Produkt předchozí (outer) PCR reakce                  | 2 µl     |
| 10X PCR Buffer (obsažen v kitu)                       | 5 µl     |
| dNTP mix (obsažen v kitu)                             | 4 µl     |
| 5' RACE gene-specific inner primer_MluI_R (10 µM)     | 2 µl     |
| 5' RACE Inner Primer_F (obsažen v kitu)               | 2 µl     |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,6 µl   |
| dH <sub>2</sub> O (nuclease-free)                     | 34,4 µl  |
| Celkový objem                                         | 50 µl    |

Pro kontrolu bylo 10 µl produktu každé z reakcí smícháno s 5 µl DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific) a výsledná směs byla nanesena na 2% agarózový gel s obsahem barviva SYBR Safe (Invitrogen). Po provedení elektroforézy byl výsledek vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

Po neúspěšném pokusu o amplifikaci produktu 5' RACE jsme použili jiný protokol. Pro oba vzorky (po reverzní transkripci) byly v obou krocích připraveny tři reakce, přičemž u každé z nich byla nastavena jiná teplota annealing fáze. Dále byl místo pufru doporučeného výrobcem kitu FirstChoice RLM-RACE Kit (Invitrogen) použit pufr určený pro Q5 polymerázu. PCR program byl též přizpůsoben použití této DNA polymerázy (Tab. 30–32).

**Tabulka 30:** První krok 5'RACE

| Složka                                                | Množství |
|-------------------------------------------------------|----------|
| Produkt reverzní transkripce                          | 1 µl     |
| 5X Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs)           | 5 µl     |
| 10 mM dNTPs                                           | 0,5 µl   |
| 5' RACE gene-specific outer primer_R (10 µM)          | 1,25 µl  |
| 5' RACE Outer Primer_F (součást kitu)                 | 1,25 µl  |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,25 µl  |
| dH <sub>2</sub> O (nuclease-free)                     | 15,75 µl |
| Celkový objem                                         | 25 µl    |

**Tabulka 31:** Druhý krok 5'RACE

| Složka                                                | Množství |
|-------------------------------------------------------|----------|
| Produkt předchozí (outer) PCR reakce                  | 2 µl     |
| 5X Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs)           | 5 µl     |
| 10 mM dNTPs                                           | 0,5 µl   |
| 5' RACE gene-specific inner primer_MluI_R (10 µM)     | 1,25 µl  |
| 5' RACE Inner Primer_F (součást kitu)                 | 1,25 µl  |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) | 0,25 µl  |
| dH <sub>2</sub> O (nuclease-free)                     | 14,75 µl |
| Celkový objem                                         | 25 µl    |

**Tabulka 32:** PCR program pro 5'RACE

| Teplota       | Čas    |                        |
|---------------|--------|------------------------|
| 98 °C         | 30 min | počáteční denaturace   |
| 98 °C         | 10 s   | 35 cyklů (amplifikace) |
| 55, 60, 65 °C | 30 s   |                        |
| 72 °C         | 1 min  |                        |
| 72 °C         | 2 min  | závěrečná syntéza      |
| 4 °C          | ∞      |                        |

Produkt druhého kroku (Inner 5' RLM-RACE PCR) amplifikace byl nanesen na 2% agarózový gel, elektroforeticky rozdělen a vizualizován. Fragment odpovídající velikosti byl izolován z gelu a byl vložen do pJET vektoru (CloneJET PCR Cloning Kit – Thermo Scientific; Tab. 33).

**Tabulka 33:** Ligace produktu 5'RACE do vektoru pJET

| Složka                                        | Množství |
|-----------------------------------------------|----------|
| 2X Reaction Buffer (CloneJET PCR Cloning Kit) | 10 µl    |
| produkt 5'RACE (inner PCR reakce)             | 8 µl     |
| pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl)       | 1 µl     |
| T4 DNA ligáza                                 | 1 µl     |
| Celkový objem                                 | 20 µl    |

Transformací kompetentních bakterií *E. coli* kmene TOP 10 byly získány kolonie a ze tří z nich byla izolována plasmidová DNA, která byla následně sekvenována. Pro sekvenaci byly použity primery obsažené v kitu CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific).

#### 4.3.5.4 Testování *cwp1* knock-outu

##### 4.3.5.4.1 Test integrace konstruktů do genomu a přítomnosti genu *cwp1*

Pro otestování transfekovaných trofozoitů *G. intestinalis* byl z 7ml plně narostlé kultury (tvořící monolayer na stěně zkumavky) Pasteurovou pipetou odstraněn pelet mrtvých buněk, kultura byla vychlazená, stočena (10 minut, 1000 x g a 4 °C), byl vylit supernatant, pelet byl resuspendován ve vychlazeném sterilním PBS a následně byla suspenze opět stočena (10 minut, 1000 x g a 4 °C) a odstraněn supernatant. Dále bylo postupováno dle protokolu pro izolaci genomové DNA pomocí kitu Genomic DNA Mini Kit (Geneaid).

Izolovaná DNA byla testována metodou PCR na přítomnost konstruktů integrovaného do genomu a též na přítomnost genu *cwp1*.

Primery pro otestování úspěšné integrace konstruktů do genomu (Tab. 34) byly navrženy tak, že jeden z primerů měl nasedat v rámci genomu do oblasti upstream od genu *cwp1*, a sice do části, která nebyla přítomna na plasmidu pTGuide, a druhý z primerů byl komplementární k sekvenci přítomné na vektoru pTGuide (konkrétně v 5'UTR oblasti genu pro PAC). Pro účely ověření integrace konstruktů do genomu byl použit základní PCR program a složení reakce doporučené pro Q5 DNA polymerázu (viz část Amplifikace). Templátem pro reakci bylo 0,5 µl genomové DNA.

**Tabulka 34**

| Primery pro ověření integrace konstruktů do genomu |                    |
|----------------------------------------------------|--------------------|
| gRNAkonstTEST_F                                    | GTAGCCGCTGAACAAGAG |
| gRNAkonstTEST_R                                    | AACAGGTCAGACATACGC |

Primery pro ověření přítomnosti *cwp1* genu (Tab. 35) laskavě poskytla Mgr. Lenka Marková (tyto primery nebyly primárně určeny k ověření přítomnosti *cwp1* v genomu, nýbrž k amplifikaci a klonování a z toho důvodu obsahují sekvence a restrikční místa, jež nejsou pro tento experiment relevantní). Pro ověření přítomnosti genu *cwp1* byl použit PCR program „gradient Q5“ (Tab. 36). Složení PCR reakce odpovídalo doporučenému složení reakce pro Q5 DNA polymerázu. Jako templát byla použito 0,5 µl genomové DNA.

**Tabulka 35**

| Primery pro ověření přítomnosti <i>cwp1</i> genu |                                                                                  |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ApaI_STOP_B<br>AP_CWP1_R                         | GATCGGGCCCTCACTCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAG<br>ATGTCGTTTAGACCAGGCGGGGTGAGGCAGTA |
| EcoRV_5UTR_<br>CWP1                              | GATCGATATCACAACGGCTTACTAAATC                                                     |

**Tabulka 36:** PCR program pro detekci genu *cwp1*

| Teplota | Čas   |                                                                                              |
|---------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 98 °C   | 30 s  | počáteční denaturace                                                                         |
| 98 °C   | 8 s   | 20 cyklů (od druhého cyklu<br>s každým cyklem klesá<br>teplota annealing fáze (*) o 1<br>°C) |
| 65 °C*  | 15 s  |                                                                                              |
| 72 °C   | 45 s  |                                                                                              |
| 98 °C   | 8 s   | 15 cyklů                                                                                     |
| 45 °C   | 15 s  |                                                                                              |
| 72 °C   | 45 s  |                                                                                              |
| 72 °C   | 5 min | závěrečná syntéza                                                                            |
| 15 °C   | ∞     |                                                                                              |

#### 4.3.5.4.2 Detekce CWP1

Přítomnost proteinu CWP1 byla na western blotu i mikroskopických preparátech detekována monoklonální myší protilátkou označovanou jako „A300“ z kitu Giardia-a-Glo Comprehensive Kit (Waterborne). Dle výrobce kitu se jedná o protilátku proti epitopům vnější stěny cysty *G. intestinalis*.

#### 4.3.5.4.3 Příprava buněk na analýzu proteomu hmotnostní spektrometrií

Zda skutečně došlo k odstranění všech funkčních kopií *cwp1* genu, bylo ověřeno srovnáním proteomu buněk kontrolních (linie Cas9) a buněk obsahujících jak Cas9, tak i pTGuide vektor, (byla vybrána linie, u které byl *cwp1* knock-out potvrzen pomocí PCR). Buňky testované i kontrolní linie byly naočkovány do tří 7 ml zkumavek s TYI-S-33 (s obsahem selekčních antibiotik). Poté, co buňky utvořily na stěně zkumavky souvislý nárůst, bylo staré médium odstraněno a bylo nahrazeno „Uppsala“ encystačním médiem s obsahem žluči (viz Encystace). Po 25 hodinách byly buňky vychlazeny na ledu, stočeny (10 minut, 1000 x g a 4 °C), promyty

vychlazeným PBS a znovu stočeny (10 minut, 1000 x g a 4 °C). Výsledný pelet (tři pelety od každé z linií) byl udržován na ledu a odnesen do Laboratoře hmotnostní spektrometrie v Biocevu, kde byla provedena celková analýza proteinového složení vzorku na hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion a vyhodnocení získaných dat.

#### **4.3.5.5 Analýza vzniku mutací v místě štěpení Cas9**

Abychom zjistili, zda při vzniku zlomů způsobených Cas9 endonukleázou a případné opravě těchto zlomů došlo ke vzniku mutací v rámci *cwp1* genu, museli jsme tuto část genomu nechat osekvenovat. Sekvence *cwp1* lokusu byla provedena nepřímou – nejprve byl celý gen *cwp1* amplifikován ze získané genomové DNA (0,5 µl do 25µl reakce) pomocí primerů ApaI\_STOP\_BAP\_CWP1\_R a EcoRV\_5UTR\_CWP1 (sekvence primerů, složení reakce a PCR program „gradient Q5“ viz výše). Produkt byl vizualizován pomocí agaróзовé elektroforézy a fragment žádané velikosti vyříznut a izolován z gelu kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Po stanovení koncentrace DNA byla získaný PCR produkt odeslán na sekvenaci.

#### **4.3.5.6 Příprava buněčného lyzátu pro SDS elektroforézu**

Buněčný lyzát byl získán následujícím postupem: narostlá kultura trofozoitů či encystujících buněk byla vychlazená, stočena (10 minut, 1000 x g a 4 °C), supernatant vylit, pelet resuspendován ve vychlazeném sterilním PBS, opět stočen (10 minut, 1000 x g a 4 °C), supernatant odstraněn a zbylý pelet buněk byl resuspendován v 50–60 µl 1x koncentrovaného vzorkového pufru. Následně byl vzorek inkubován 10 minut při teplotě 95 °C. Lyzáty byly skladovány v mrazáku (-20 °C).

#### **4.3.5.7 SDS PAGE elektroforéza**

Vzorky byly nanášeny na 12–15% polyakrylamidový gel. Jako elektrolyt byl použit Tris-glycinový SDS pufr (Biorad). Pro účely následné analýzy velikosti proteinů bylo na gel vedle vzorků naneseno i 5 µl standardu molekulových hmotností PageRuler (Thermo Scientific). V jednom případě byl použit standard Color Prestained Protein Standard, Broad Range, 11–245 kDa (New England Biolabs). Dokud vzorky na gelu nedosáhly hranice mezi zaostřovací a rozdělovací částí gelu, probíhala elektroforéza pod napětím 90 V. Poté bylo napětí zvýšeno na 180 V.

#### **4.3.5.8 Western blot**

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Amersham) pomocí blotovacího přístroje Fastblot B44 (Biometra). Rovnoměrné přebílení proteinů bylo ověřeno pomocí barviva Ponceau S, které bylo po obarvení z membrány odmyto destilovanou vodou. Membrána byla inkubována 1 hodinu v blokovacím roztoku (5% roztoku odtučněného mléka rozpuštěného v PBS s přísadkou detergentu Tween 20 (Sigma; 150 µl na 100 ml mléka)) na kývačce při pokojové teplotě. Poté byla membrána ponořena do blokovacího roztoku s obsahem primární protilátky (ředění protilátek dle Tabulky 37) a inkubována 1 hodinu na rotátoru. Následovalo promytí membrány v blokovacím roztoku (3x po dobu 15 minut na kývačce). Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku

(ředění dle Tabulky 38) po dobu 1 hodiny na rotátoru. Nakonec byla membrána promyta PBS (3x po dobu 15 minut).

Na membránu byl nanesen substrát pro křenovou peroxidázu (HRP) Immobilon Crescendo či Immobilon Forte (Millipore) a proteiny na membráně byly vizualizovány pomocí přístroje Amersham Imager 600. Alternativně byla pro vizualizaci proteinů použita sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP). V takových případech byla membrána po promytí PBS inkubována s roztokem obsahujícím substrát alkalické fosfatázy 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP) a Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT) dokud nebylo dosaženo změny zbarvení membrány.

**Tabulka 37:** Přehled použitých primárních protilátek včetně ředění

| Protilátka          | Zvíře  | Ředění | Výrobce                     |
|---------------------|--------|--------|-----------------------------|
| $\alpha$ -HA        | myš    | 1:1000 | Exbio                       |
| $\alpha$ -HA        | krysa  | 1:1000 | Roche                       |
| $\alpha$ -HA        | králík | 1:1000 | Santa Cruz<br>Biotechnology |
| $\alpha$ -V5        | krysa  | 1:1000 | Abcam                       |
| $\alpha$ -V5        | myš    | 1:1000 | Sigma                       |
| $\alpha$ -V5        | králík | 1:1000 | Sigma                       |
| $\alpha$ -CWP1 A300 | myš    | 1:500  | Waterborne                  |
| $\alpha$ -BAP       | králík | 1:1000 | Genscript                   |
| $\alpha$ -BAP       | myš    | 1:1000 | Genscript                   |
| $\alpha$ -GiSec20   | králík | 1:1000 | Eurogentec                  |

**Tabulka 38:** Sekundární protilátky

| Protilátka           | Ředění | Výrobce    |
|----------------------|--------|------------|
| $\alpha$ -krysa-HRP  | 1:2000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -myš-HRP    | 1:2000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -králík-HRP | 1:2000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -myš-AP     | 1:2000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -králík-AP  | 1:2000 | Invitrogen |

#### 4.3.5.9 Barvení gelu Coomassie Brilliant Blue

Pro kontrolu, že bylo při SDS elektroforéze do všech jamek nanášeno zhruba stejné množství proteinů, byl kromě gelu určeného pro přebílování na nitrocelulózovou membránu připraven další gel, na který byly nanášeny stejný objem všech vzorků. Tento gel byl po elektroforéze obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue (Serva). Barvení probíhalo přes noc na kývačce při pokojové teplotě. K vymytí přebytečného barviva byl použit odbarvovací roztok (složení v Tabulce 39), který byl po cca 30 minutách inkubace na kývačce měněn za nový, dokud nebylo dosaženo žádaného odbarvení gelu.

**Tabulka 39:** Složení odbarvovacího roztoku

| Složka          | Množství pro přípravu 1 litru roztoku |
|-----------------|---------------------------------------|
| Metanol         | 500 ml                                |
| Kyselina octová | 100 ml                                |
| voda            | 400 ml                                |

#### **4.3.5.10 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii**

##### **4.3.5.10.1 Fixace buněk metanolem**

Z plně narostlé buněčné kultury *G. intestinalis* bylo Pasteurovou pipetou odsán pelet mrtvých buněk a kultura byla vychlazená, aby se buňky uvolnily ze stěn zkumavky do média. Ze dvou podložních skel a gumové vložky se čtvercovým výřezem byla sestavena anaerobní komůrka, do které byla pomocí injekční stříkačky s 23G jehlou (B. Braun) vpravena vychlazená buněčná suspenze. Aby došlo k přisednutí buněk na obě podložní skla, byla komůrka inkubována 15 minut při teplotě 37 °C a poté byla přetočena a inkubována dalších 20 minut při 37 °C. Následně byla komůrka otevřena, médium bylo vylito a podložní skla ponechána (v orientaci přisedlými buňkami nahoru) částečně zaschnout.

Podložní skla byla ponořena na 5 minut do vychlazeného metanolu (-20 °C), aby došlo k fixaci buněk. Po vyjmutí z metanolu byla skla opatrně osušena (mimo pole s nafixovanými buňkami) a vložena na 5 minut do vychlazeného acetonu (-20 °C) za účelem permeabilizace buněk. Poté byla skla ponechána uschnout při pokojové teplotě.

##### **4.3.5.10.2 Značení preparátů protilátkami a fluorescenční mikroskopie**

Podložní skla s nafixovanými a permeabilizovanými buňkami byla vložena do připravené vlhké komůrky, ve které probíhalo značení protilátkami. Nejprve bylo na každé sklo nanесeno 250 µl blokovacího roztoku (0,25% BSA (Sigma), 0,25% želatina (Sigma), 0,05% Tween 20 (Sigma) v PBS), se kterým byl preparát inkubován po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (v prostředí vlhké komůrky). Po odstranění blokovacího roztoku byl na preparát nanесen blokovací roztok (250 µl) obsahující primární protilátky (ředění stejné jako u western blotu viz výše). S nimi byl preparát inkubován 1 hodinu. Následovalo promytí preparátu PBS (3x inkubováno po dobu 10 minut). Dále byl na preparát nanесen blokovací roztok s obsahem sekundárních protilátek (Tab. 40) a byl s nimi inkubován 1 hodinu. Jak připravený roztok se sekundárními protilátkami, tak preparáty během i po inkubaci s těmito protilátkami byly kvůli obsahu fluorescenčních barviv Alexa Fluor (Invitrogen) udržovány ve tmě. Následně byly preparáty opět promyty PBS (3x 10 minut). Na ne zcela zaschnutý preparát bylo nanесeno 15 µl montovacího média VectaShield s obsahem DAPI (Vector Laboratories). Preparát byl poté ihned přikryt krycím sklem, jež bylo zafixováno na preparátu pomocí laku na nehty. Veškeré preparáty byly pozorovány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse Ti-S.

**Tabulka 40:** Přehled sekundárních protilátek použitých při přípravě preparátů

| Protilátka                       | Ředění | Výrobce    |
|----------------------------------|--------|------------|
| $\alpha$ -myš Alexa Fluor 488    | 1:1000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -krysa Alexa Fluor 488  | 1:1000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -králík Alexa Fluor 488 | 1:1000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -myš Alexa Fluor 594    | 1:1000 | Invitrogen |
| $\alpha$ -králík Alexa Fluor 594 | 1:1000 | Invitrogen |

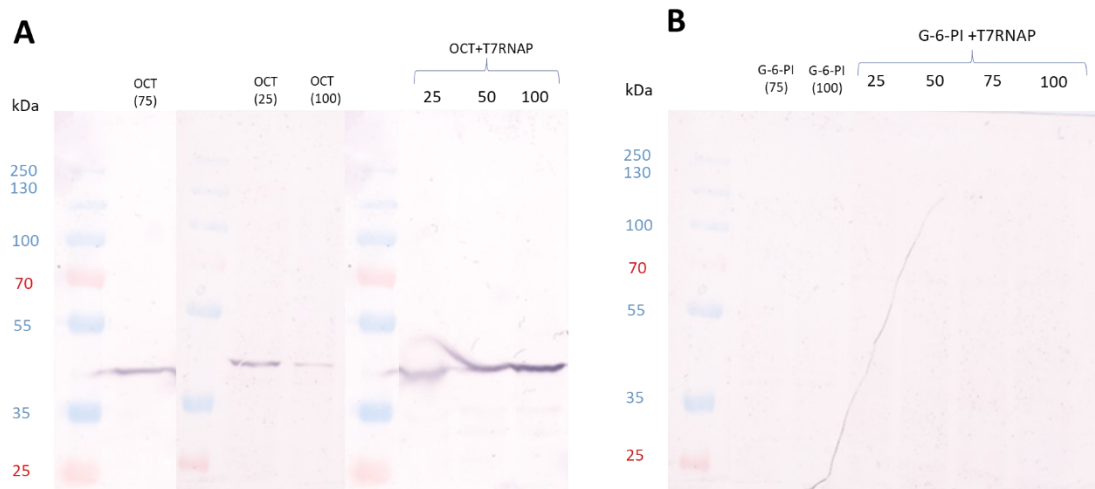
## 5 Výsledky

### 5.1 Inducibilní expresní systém pro *G. intestinalis*

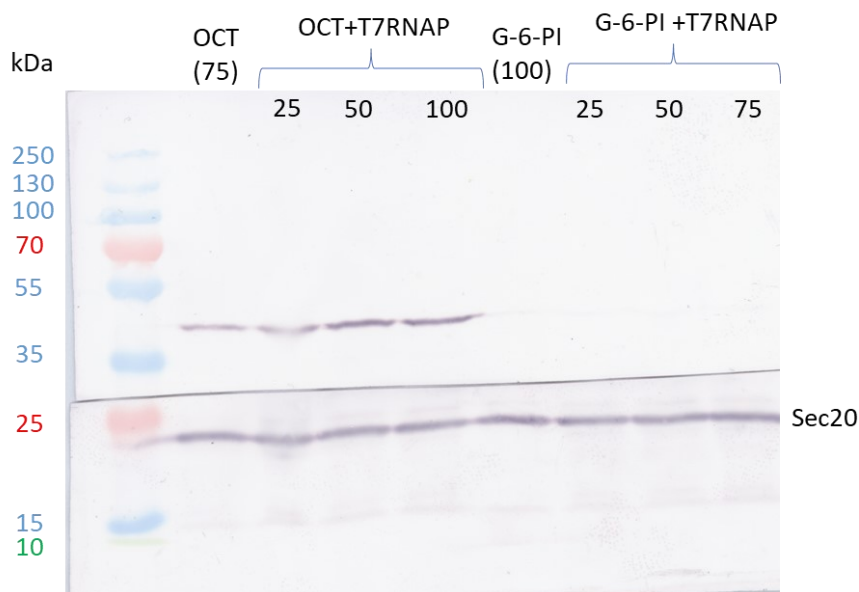
#### 5.1.1 Test aktivity T7 RNA polymerázy

Pro vývoj inducibilního systému, u kterého je exprese regulována na úrovni transkripce interakcí TetR represoru s příslušným operátorem v promotorové oblasti genu, bylo klíčové nejprve otestovat použití promotoru bez operátorů. Jelikož jsme se na počátku rozhodli pro použití T7 promotoru, který je specificky rozeznáván T7 RNA polymerázou, byla nejprve testována exprese genů pod T7 promotorem v buňkách vykazujících expresi T7 RNA polymerázy. V tomto experimentu byl pro expresi T7 RNA polymerázy použit vektor pUC57-mini obsahující gen pro tuto polymerázu s V5 tagem (dále bude v textu označován jako pUC57-mini\_T7RNAP\_V5).

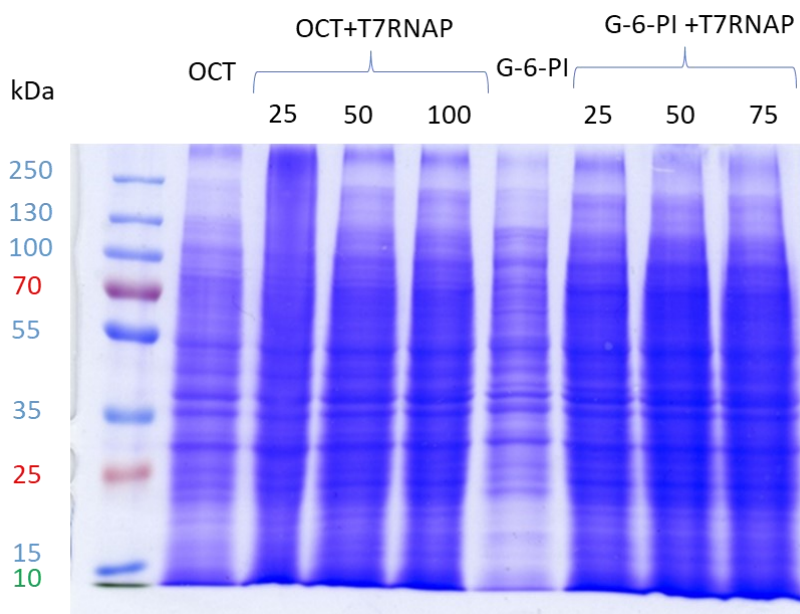
Geny pro G-6-PI a OCT byly amplifikovány primery obsahujícími T7 promotor a byly vloženy do vektoru pTG (za vzniku konstruktů dále v textu označovaných jako „T7promotor-G-6-PI-2xHA“ a „T7promotor-OCT-2xHA“). Úspěšnost klonování byla ověřena kontrolní restrikcí a sekvenováním. Pro transfekci byly použity buňky *G. intestinalis* izolátu WB (ATCC 30957) linie „T7 30“ selektované na přítomnost plasmidu pUC57-mini\_T7RNAP\_V5 (tuto linii vytvořil a expresi T7 RNAP u ní otestoval Mgr. Luboš Voleman, Ph.D.). Po dvou neúspěšných pokusech o transfekci těchto buněk oběma vektory (při každém z nich byly použity tři různé koncentrace plasmidové DNA) byl zvolen jiný postup, a sice nejprve transfekovat buňky konstrukty T7promotor-G-6-PI-2xHA a T7promotor-OCT-2xHA a až poté výsledné vyselektované linie transfekovat vektorem pUC57-mini\_T7RNAP\_V5. Zároveň byl použit jiný izolát buněk (WB C6: ATCC 50803). Tato strategie byla úspěšná a z buněk, které prošly selekcí a narostly po elektroporaci do monolayeru byl připraven buněčný lyzát. Jedna linie od obou konstruktů byla použita pro transfekci vektorem pUC57-mini\_T7RNAP\_V5. Z linií selektovaných na obsah obou plasmidů byl taktéž připraven lyzát. Expres příslušných rekombinantních proteinů u všech získaných linií byla ověřena pomocí SDS-PAGE a western blotu (Obr. 22). Následně byl připraven další western blot (a odpovídající gel barvený Coomassie na Obr. 24), na němž byl též detekován i protein Sec20 použitý jako kontrola celkového množství proteinů ve vzorcích (Obr. 23). U buněk s konstruktem T7promotor-OCT-2xHA byla exprese proteinu zájmu detekována i v nepřítomnosti vektoru s genem pro T7 RNA polymerázu. Naopak u buněk s konstruktem T7promotor-G-6-PI-2xHA nebyla exprese tagované glukóza-6-fosfát izomerázy pozorována ani u jedné linie, nezávisle na přítomnosti vektoru s T7 RNA polymerázou.



**Obrázek 22:** Exprese OCT (**A**) a G-6-PI (**B**) v buňkách obsahujících T7 RNA polymerázu a bez ní. Proteiny na blotu byly značeny myší  $\alpha$ -HA protilátkou. Bloty byly vyvolány pomocí alkalické fosfatázy (AP). Číslo jednotlivých linií (např. OCT (75)) odpovídají množství (v  $\mu$ g DNA) plasmidu použitého při elektroporaci. Na blotu vlevo (**A**) byl pozorován band odpovídající molekulové hmotnosti tagované OCT (39 kDa) a to i u linií bez T7 RNA polymerázy (OCT(25), OCT(75) a OCT(100)). U žádné z linií selektovaných na přítomnost vektoru s tagovanou G-6-PI (**B**) nebyla zjištěna exprese tohoto proteinu.

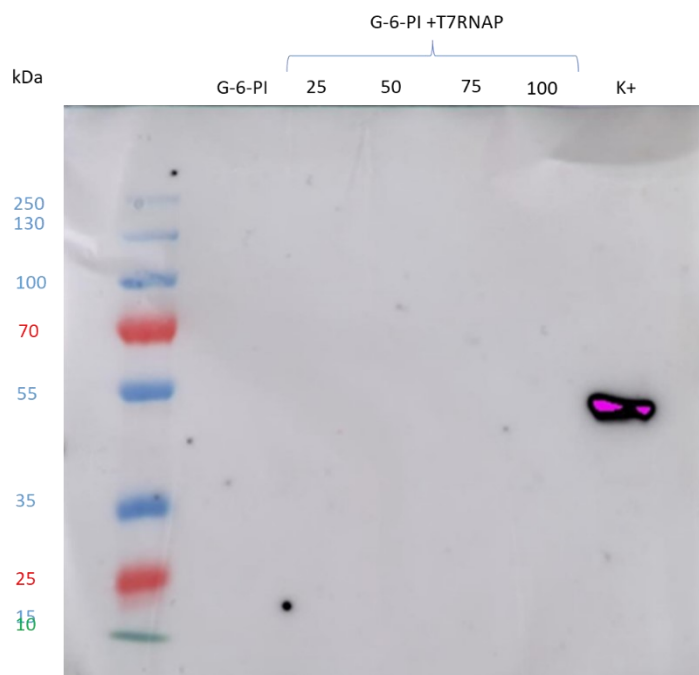


**Obrázek 23:** Testování linií selektovaných na přítomnost konstruktů s genem pro OCT (vlevo) a G-6-PI (vpravo). Značeno myší  $\alpha$ -HA protilátkou (horní půlka blotu) a králičí  $\alpha$ -SEC20 protilátkou (spodní polovina blotu). SEC20 byl použit jako kontrola celkového množství proteinů ve vzorcích. Vývoláno pomocí AP. Čísla jednotlivých linií (např. „OCT (75)“) odpovídají množství (v  $\mu$ g DNA) plasmidu použitého při elektroporaci. Stejně jako na Obrázku 22 se na tomto blotu podařilo detekovat pouze OCT a nikoliv G-6-PI.



**Obrázek 24:** Gel odpovídající blotu na Obrázku 23 barvený Coomassie Brilliant Blue. Čísla linií (25, 50, 75 a 100) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).

Jelikož na blotech u linií selektovaných na přítomnost konstruktu T7promotor-*g-6-pi-2xHA* nebyl detekován protilátkou proti HA tagu žádný signál, byl uskutečněn pokus o detekci proteinů s HA tagem (u stejných vzorků) na membráně pomocí křenové peroxidázy. Ani za použití nejcitlivějšího substrátu (Immobilon Forte (Millipore)) se však žádný protein značený HA tagem detekovat nepodařilo (vyjma pozitivní kontroly; Obr. 25).



**Obrázek 25:** Testování linií selektovaných na přítomnost konstruktu T7promotor-G-6-PI-2xHA a současně vektoru pro expresi T7 RNA polymerázy (kromě prvního vzorku). Jde o stejné vzorky, které byly již na přechozích blotech (Obrázek 22 a 23). Opět byla použita myší  $\alpha$ -HA protilátka, tentokrát však byl blot vyvolán pomocí HRP. Kromě pozitivní kontroly (K+; buňky exprimující  $\beta$ -giardin s HA tagem) nebyl žádný band odpovídající proteinu s HA tagem detekován. Čísla linií (25, 50, 75 a 100) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).

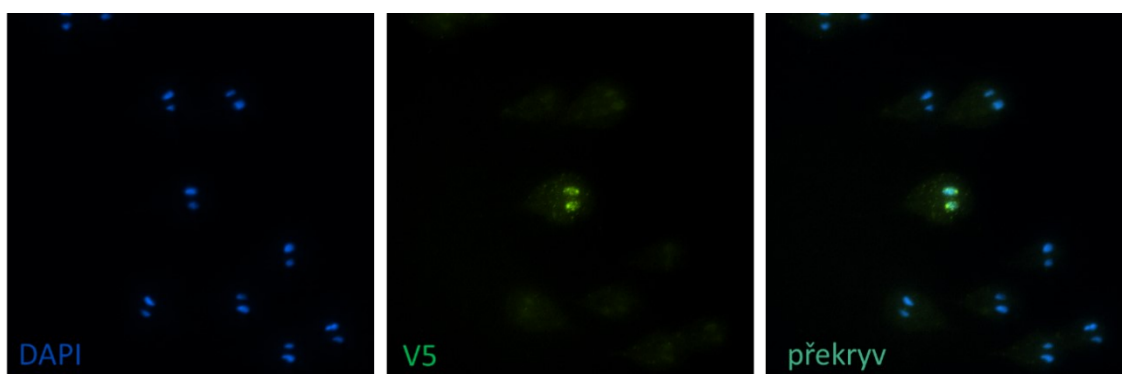
### 5.1.2 Nové vektory pro expresi T7 RNA polymerázy

Byly vytvořeny další verze konstruktů s T7 RNA polymerázou, které na rozdíl od té předchozí (pUC57-mini\_T7RNAP\_V5) obsahovaly jadernou lokalizační sekvenci pocházející z genu GL50803\_2340 označovanou v této práci jako „2340NLS“. Nové konstrukty, které v této práci nesou označení „pUC57-mini\_T7RNAP\_V5\_2340NLS“ a „pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS“ vytvořil Mgr. Luboš Voleman, Ph.D. U následujících experimentů bude vždy uvedeno, který ze zmíněných vektorů byl použit.

#### 5.1.2.1 pUC57-mini\_T7RNAP\_V5\_2340NLS

Tento vektor byl elektroporován do buněk izolátu WB a selektované linie byly testovány na přítomnost V5 tagu na western blotu. U prvních tří získaných linií nebyl na blotu detekován žádný

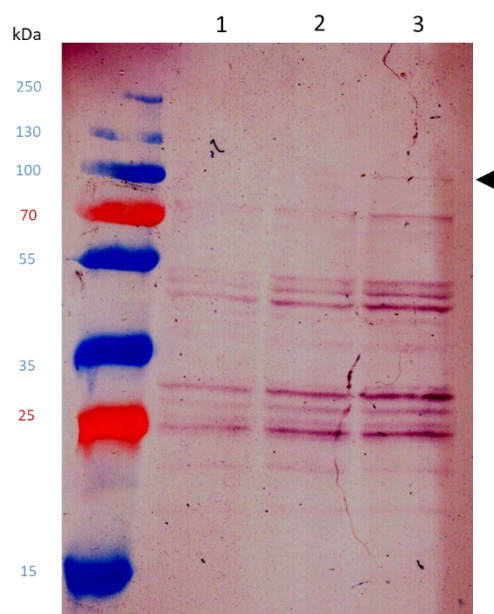
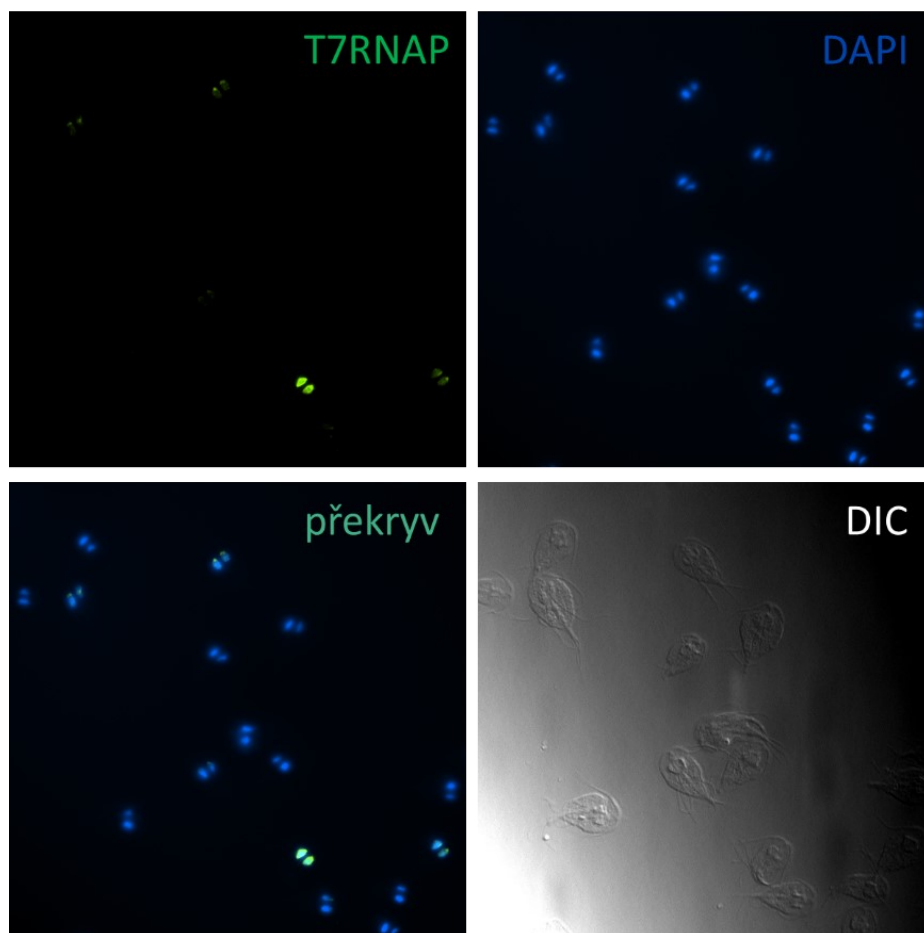
signál. Stejně tak elektroporace vektoru do izolátu WB C6 dala vznik dalším třem liniím, u kterých však též na blotu nebyl detekován žádný signál. Nakonec byly z obou zmíněných elektroporací připraveny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii, na kterých byly také detekovány proteiny s V5 tagem. Při prohlížení preparátů mikroskopem byla sice u všech testovaných linií nalezena pozitivně značená jádra, ale vždy jen v několika buňkách v celém preparátu (Obr. 26). Tento konstrukt proto nebyl použit v žádném dalším experimentu v rámci této diplomové práce.



**Obrázek 26:** Lokalizace T7 RNA polymerázy s V5 tagem (konstrukt pUC57-mini\_T7RNAP\_V5\_2340NLS) v trofozoitech *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. T7RNAP je značena krysí  $\alpha$ -V5 protilátkou (prostřední snímek). Jádra jsou značena modře (DAPI). Na snímcích je patrná jaderná lokalizace T7 RNAP.

#### 5.1.2.2 pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS

Linii buněk s tímto konstruktem vytvořil a otestoval Mgr. Luboš Voleman, Ph.D. V tomto případě byla exprese T7 RNA polymerázy detekována na blotu, avšak většina proteinového signálu byla v podobě bandů o nižší molekulové hmotnosti, než bylo očekávaných 100 kDa (Obr. 27). Tyto bandy pravděpodobně odpovídaly výrazné proteinové degradaci. Na preparátech pro fluorescenční mikroskopii (Obr. 27) byly identifikovány pozitivní buňky ve větším počtu než v případě předchozího konstruktu. Signál byl detekován převážně v jádrech. Linie buněk s tímto konstruktem byla použita v dalších experimentech a bude dále v textu označována jako jaderně lokalizovaná T7 RNA polymeráza.



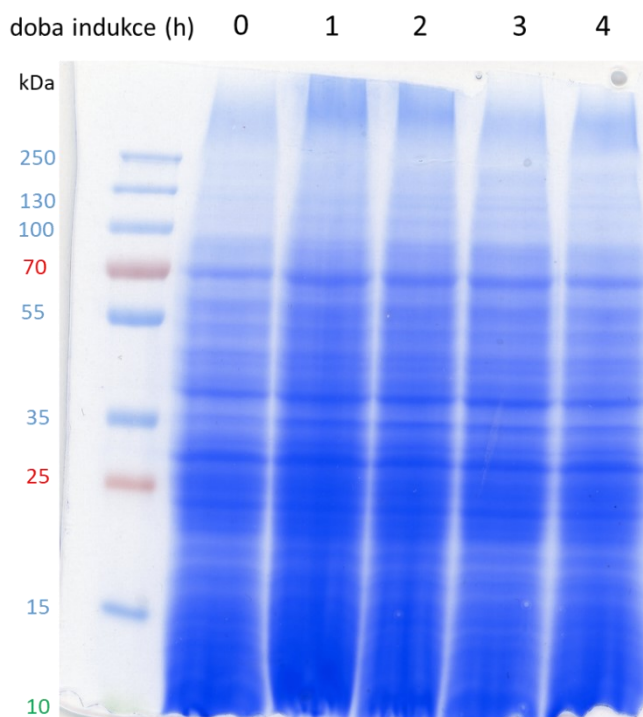
**Obrázek 27:** Exprese a lokalizace T7 RNA polymerázy (konstrukt pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS) v buňkách *G. intestinalis*. Na blotu byl (mimo jiné) vidět i band přibližně odpovídající molekulové hmotnosti T7RNAP (~ 100 kDa; vyznačeno šipkou černé barvy). Fluorescenční mikroskopie potvrdila jadernou lokalizaci T7RNAP, která je na snímcích značena zeleně. Dále jsou vidět modře značená jádra (DAPI) a buňky pod diferenciálním kontrastem (DIC). Blot a snímky poskytl Mgr. Luboš Voleman, Ph.D.

### 5.1.3 Vytvoření vektoru pTetR pro inducibilní expresi

Konstrukt pro inducibilní expresi byl vytvořen z plasmidu pTG, ze kterého byla odstraněna promotorová 5'UTR oblast. Do plasmidu byl vložen gen pro TetR represor (bez tagů) spolu s několika restrikčními místy (EcoRI, ClaI, XhoI, AgeI), díky kterým mohly být do vektoru vloženy další části konstruktů. Následně byly do vektoru integrovány 5'UTR a 3'UTR oblasti genu *oct*, které měly umožnit expresi TetR represoru, a konstrukt T7promotor-*tetO-tetO-g-6-pi-2xHA* s příslušnou 3'UTR oblastí (genu pro G-6-PI). Dále byla připravena varianta konstruktů, ve kterém měl TetR represor na N-terminu jadernou lokalizační sekvenci velkého T antigenu viru SV40 (KKKRKV), neboť tato varianta represoru je dle Sun a kolektivu (2005) při inducibilní expresi účinnější. Tato verze vektoru bude dále označována jako pTetR(SV40NLS). Ani v jednom z konstruktů však TetR represor neměl tag, který by umožnil detekovat jeho expresi a lokalizaci.

### 5.1.4 Kontrolní indukce WB buněk

Nejprve jsme chtěli otestovat možný účinek tetracyklinu na buňky *G. intestinalis*. Vliv tetracyklinu (5 µg/ml) na WB buňky (bez vektoru pro inducibilní expresi) byl sledován na SDS PAGE gelu obarveném barvivem Coomassie Brilliant Blue (Obr. 28). Inkubace buněk v médiu s tetracyklinem probíhala po dobu 1, 2, 3 a 4 hodin. U buněk inkubovaných s tetracyklinem jsme nepozorovali žádnou změnu v proteinovém profilu.

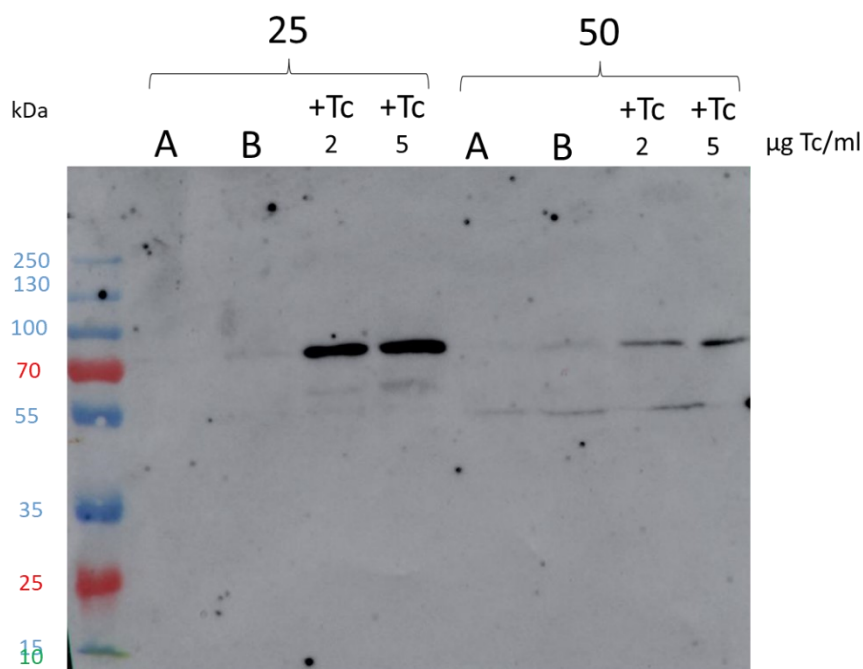


**Obrázek 28:** SDS PAGE gel se vzorky z indukovaných WB buněk barvený Coomassie Brilliant Blue. Indukce tetracyklinem (5 µg/ml) probíhala po dobu 1, 2, 3 a 4 hodin.

### 5.1.5 Testování inducibilní exprese genu *g-6-pi* na plasmidu pTetR

#### a) Exprese za přítomnosti T7 RNA polymerázy

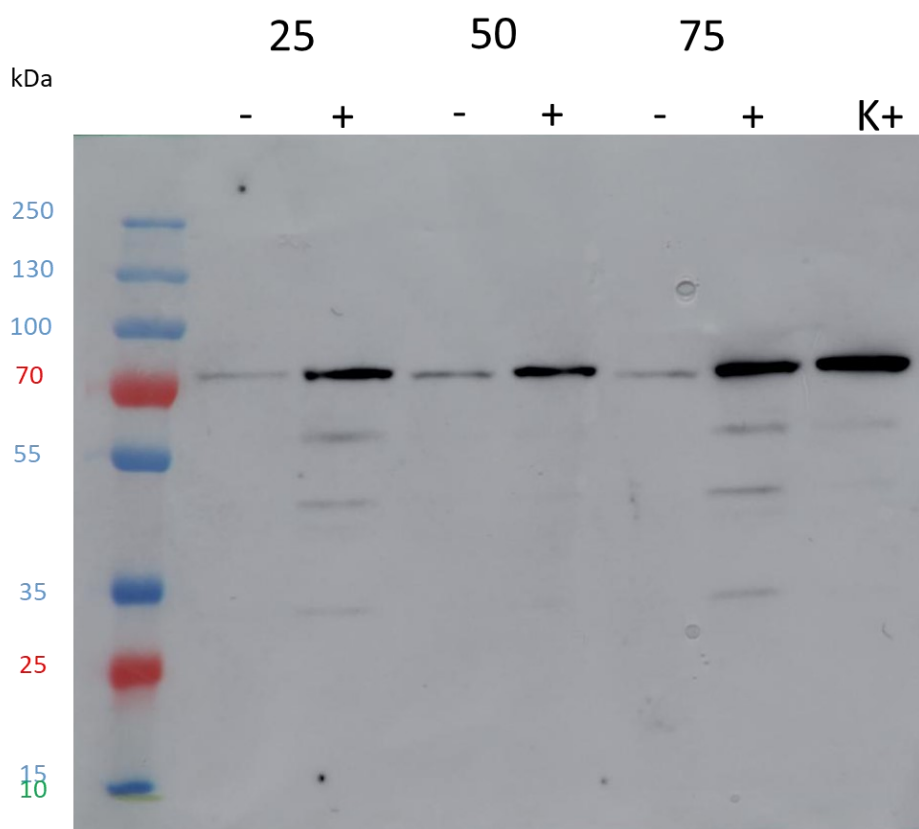
Elektroporací pTetR vektoru do buněk s T7 RNA polymerázou bez jaderného lokalizačního signálu (konstrukt pUC57-mini\_T7RNAP\_V5) byly selekcí získány tři linie buněk, které byly indukovány 48 hodin tetracyklinem o výsledné koncentraci 2 µg/ml a 5 µg/ml. U všech linií byl na lyzátech z indukovaných buněk na western blotu (Obr. 29) detekován signál proteinu o molekulové hmotnosti okolo 70 kDa, což zhruba odpovídalo předpokládané molekulové hmotnosti G-6-PI (67 kDa i s dvěma HA tagy). Při srovnání intenzity signálu u lyzátů z buněk indukovaných a buněk neindukovaných (zejména u linie „25“) je patrné, že se jedná o inducibilní expresi. V tomto případě sice nebylo provedeno měření celkového množství proteinů v lyzátech, nicméně pro přípravu lyzátů bylo vždy použito zhruba stejné množství buněk (plně narostlá kultura) a na gel byl ve všech případech nanesen stejný objem lyzátu.



**Obrázek 29:** Exprese G-6-PI (s HA tagy) byla sledována u buněk s T7RNAP, které byly 48 hodin inkubovány s tetracyklinem o koncentracích 2 µg/ml (+Tc 2) a 5 µg/ml (+Tc 5), a u buněk bez tetracyklinu (A, B). A je vzorek získaný z buněk, které poprvé po elektroporaci vytvořily monolayer. B byl vzorek připravený se stejných buněk, jen o dva dny selekce starších. Číslo „25“ a „50“ označují linie získané elektroporací buněk za použití 25 µg a 50 µg plasmidu pTetR. Proteiny byly značeny krysí α-HA protilátkou a blot byl vyvolán pomocí HRP.

## b) Expresa bez T7 RNA polymerázy

Jako kontrola, že se na inducibilní transkripci skutečně podílí T7 RNA polymeráza, byl proveden experiment, při kterém byl vektor pTetR elektroporován do WB C6 buněk (bez T7 RNA polymerázy). Získané linie byly inkubovány s tetracyklinem (10 µg/ml) po dobu 48 hodin. U všech tří linií byl v lyzátu z buněk po indukci detekován na western blotu signál o stejné molekulové hmotnosti jako v předchozím experimentu s T7RNAP (vzorek z přechozího experimentu (Obr. 29) – linie „25“ indukovaný 5µg Tc/ml – zde sloužil jako pozitivní kontrola). Při srovnání s lyzátem z buněk obsahujících T7 RNA polymerázu (K+ na Obr. 30) je patrné, že množství G-6-PI u indukovaných buněk obsahujících T7RNAP je srovnatelné s množstvím tohoto proteinu u indukovaných buněk bez T7RNAP.

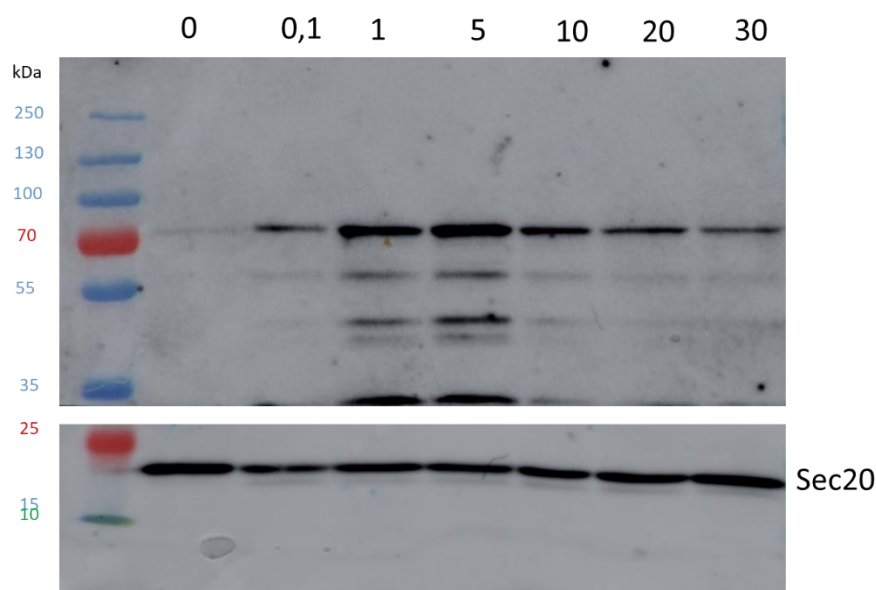


**Obrázek 30:** Expresa G-6-PI (s HA tagy) u buněk bez T7RNAP, které byly 48 hodin inkubovány s tetracyklinem o koncentraci 10 µg/ml („+“) a u buněk bez tetracyklinu („-“). Pozitivní kontrolou K+ je vzorek z přechozího experimentu (Obr. 29) – linie „25“ indukovaná 5µg Tc/ml.

Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou a blot byl vyvolán pomocí HRP. Číslo linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA). U všech linií byl detekován protein stejné velikosti (cca 70 kDa), který zhruba odpovídal předpokládané molekulové hmotnosti G-6-PI (67 kDa).

Jedna z testovaných buněčných linií („75“) byla použita pro další experiment, při kterém bylo zkoumáno, jak se mění množství zkoumaného proteinu v buňkách v závislosti na koncentraci tetracyklinu použitého pro indukci (Obr. 31). Buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin v médiu s tetracyklinem o koncentracích 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml a 30 µg/ml.

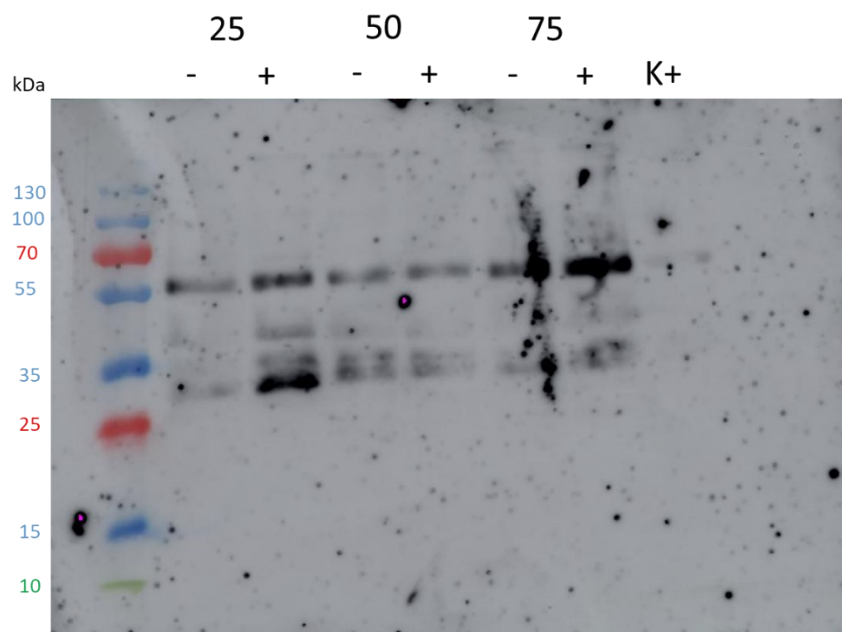
Následně byly z indukovaných a z kontrolních buněk (bez Tc) připraveny lyzáty, které byly testovány metodou imunoblotu. Abychom ověřili, že ve všech vzorcích na blotu bylo zhruba stejné celkové množství proteinů, byl na stejném blotu detekován protein Sec20. Největší množství G-6-PI jsme pozorovali u buněk inkubovaných s tetracyklinem o koncentracích 1 µg/ml a 5 µg/ml.



**Obrázek 31:** Exprese G-6-PI v buňkách bez T7RNAP při různých koncentracích tetracyklinu (čísla nad blotem odpovídají množství přidaného Tc v µg/ml). Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou (horní část blotu) a králičí  $\alpha$ -SEC20 protilátkou (dolní část blotu). Blot byl vyvolán pomocí HRP. Sec20 sloužil jako kontrola celkového množství proteinů ve vzorcích.

### c) Exprese za přítomnosti T7 RNA polymerázy s jaderným lokalizačním signálem

Elektroporace plasmidu pTetR do buněk současně selektovaných na přítomnost vektoru pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS dala vzniknout třem liniím, které byly následně indukovány tetracyklinem (48 hodin, 5 µg Tc/ml). Z indukovaných buněk byl připraven lyzát, ve kterém byly na western blotu detekovány proteiny s HA tagem (Obr. 32). Na tomto blotu nebyl patrný protein o velikosti ~70 kDa, který byl pozorován na předchozích blotech (viz Obrázky 29, 30 a 31). Místo toho byl detekován protein o molekulové hmotnosti 55–60 kDa, který však byl pravděpodobně přítomen i na předchozích blotech (Obr. 29, 30 a 31). Jako kontrola (K<sup>+</sup>) zde byl použit vzorek z indukované linie „75“ bez T7 RNA polymerázy (Obr. 30), u které je patrné výrazně menší množství sledovaného proteinu ve srovnání s lyzáty z indukovaných buněk s T7RNAP (Obr. 32). Za předpokladu, že bylo celkové množství proteinů u srovnávaných vzorků na blotu zhruba stejné, by bylo možné konstatovat, že u buněk s jaderně lokalizovanou T7RNAP dochází k silnější expresi sledovaného proteinu než u buněk bez T7RNAP.

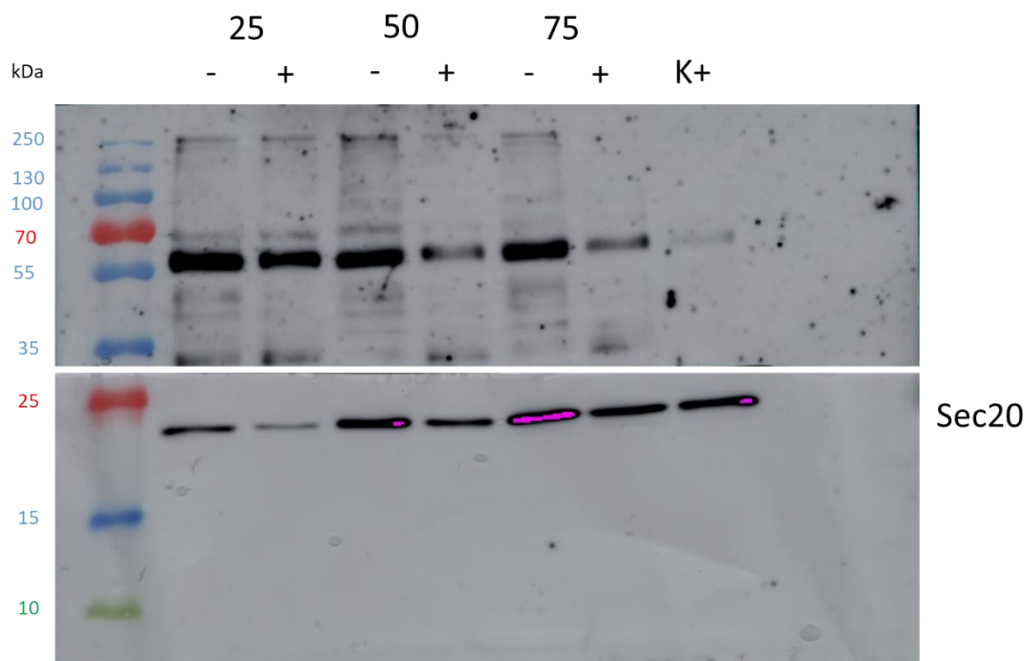


**Obrázek 32:** Expres G-6-PI (s HA tagy) u buněk s jaderně lokalizovanou T7RNAP, které byly 48 hodin inkubovány s tetracyklinem o koncentraci 5 µg/ml („+“) a u buněk bez tetracyklinu („-“). Pozitivní kontrolou je zde vzorek z indukované linie „75“ bez T7 RNA polymerázy (Obr. 30). Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou a blot byl vyvolán pomocí HRP. Číslo linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA).

### 5.1.6 Testování inducibilní exprese *g-6-pi* na plasmidu pTetR(SV40NLS)

#### a) Expres za přítomnosti T7 RNA polymerázy s jadernou lokalizací

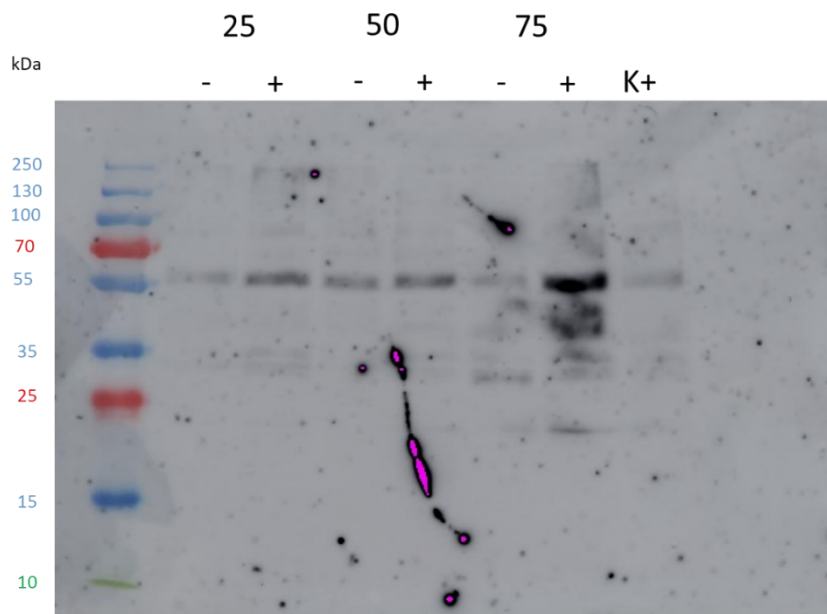
Buňky selektované na přítomnost vektoru s T7 RNA polymerázou a jadernou lokalizační sekvencí byly transfekovány plasmidem pTetR(SV40NLS) a u vzniklých linií byla indukována exprese přidáním tetracyklinu (finální koncentrace 5 µg/ml) po dobu 48 hodin. U těchto linií bylo po indukci více mrtvých buněk, než bylo pozorováno u předchozích indukcí, a v době ukončení indukce exprese tyto buňky netvořily monolayer. Z buněk byly připraveny lyzáty, jež byly po rozdělení SDS PAGE elektroforézou a přenesení na blot testovány na přítomnost proteinů s HA tagem (Obr. 33). Stejně jako v předchozím případě (Obr. 32) nejsilnější band připadal proteinu o molekulové hmotnosti okolo 55–60 kDa. Kontrolním vzorkem (K+ na Obr. 33) byla u tohoto blotu indukovaná linie „25“ obsahující pTetR a pUC57-mini\_T7RNAP\_V5 (Obr. 29). Tato kontrola sloužila ke srovnání množství G-6-PI v buňkách s jaderně lokalizovanou T7 RNA polymerázou a TetR represorem s NLS a v buňkách s T7 RNA polymerázou a TetR bez jaderné lokalizace. Vzhledem ke skutečnosti, že lyzáty nebyly připraveny z plně narostlých kultur, byl pro kontrolu celkového množství proteinů v lyzátech detekován i protein Sec20. Je zřejmé, že u buněk s T7RNAP s jaderným lokalizačním signálem je množství G-6-PI větší než u buněk s T7RNAP bez lokalizačního signálu. Velké množství sledovaného proteinu u neindukovaných buněk svědčí o horší regulaci exprese, než jsme pozorovali u systému, kde ani T7RNAP ani TetR jadernou lokalizační sekvenci neměly (Obr. 29).



**Obrázek 33:** Expres G-6-PI (s HA tagy) na vektoru pTetR(SV40NLS) u buněk s jaderně lokalizovanou T7RNAP, které byly 48 hodin inkubovány s tetracyklinem o koncentraci 5 µg/ml („+“) a u buněk bez tetracyklinu („-“). Pozitivní kontrolou je zde vzorek z indukované linie „25“ obsahující pTetR a pUC57-mini\_T7RNAP\_V5 (Obr. 29). Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou (horní část blotu) a králičí  $\alpha$ -SEC20 protilátkou (dolní část blotu). Blot byl vyvolán pomocí HRP. Číslo linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA). Úbytek sledovaného proteinu i Sec20 po indukci je dán tím, že buňky po indukci začaly ve zvýšené míře umírat a v okamžiku ukončení indukce tak netvořily monolayer.

## b) Expres bez T7 RNA polymerázy

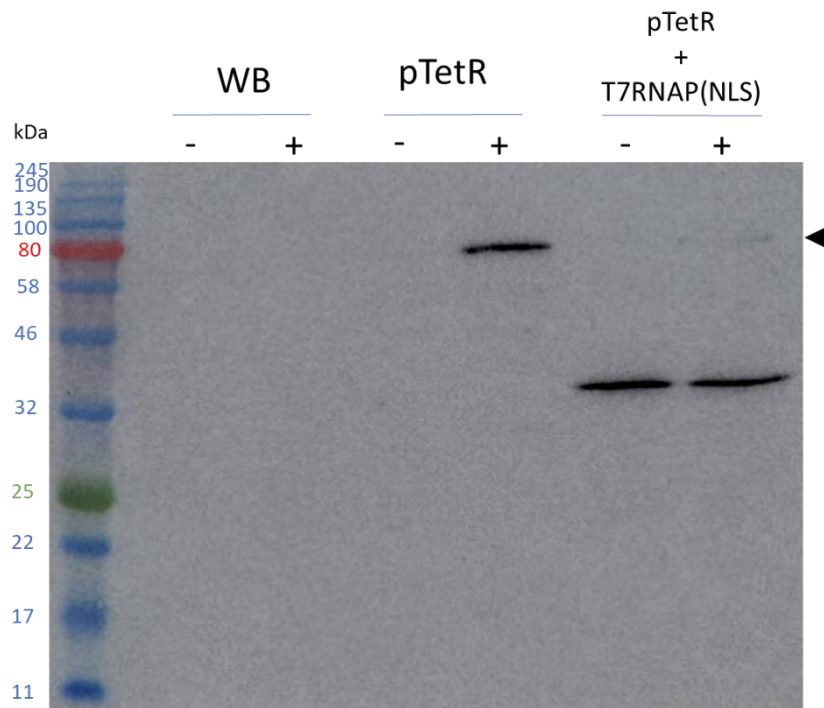
Vektorem pTetR(SV40NLS) jsme transfekovali buňky izolátu WB (bez T7 RNAP) a získali jsme tři linie, jež byly indukovány tetracyklinem (5 µg/ml) po dobu 48 hodin. Buněčné lyzáty byly otestovány pomocí  $\alpha$ -HA protilátky na western blotu (Obr. 34). Pozitivní kontrolou (K+) byl v tomto případě lyzát z indukovaných buněk linie „75“ obsahující vektor pTetR (Obr. 30), aby bylo možné porovnat regulaci exprese sledovaného proteinu za účasti represoru s jadernou lokalizační sekvencí a bez ní. Z blotu je patrné, že množství G-6-PI u těchto kontrolních indukovaných buněk je zde zhruba stejné jako u buněk s jaderným represorem TetR před indukci. Stejně jako u blotů na Obrázcích 32 a 33 zde nebyl detekován protein o očekávané molekulové hmotnosti G-6-PI (~70 kDa), ale byl přítomen protein o molekulové hmotnosti 55–60 kDa, a to i u kontrolního vzorku, u kterého jsme protein správné velikosti na jiném blotu pozorovali (Obr. 30). Na vině by mohla být degradace proteinu v buněčném lyzátu, případně nedokonalý přenos proteinů z gelu na membránu.



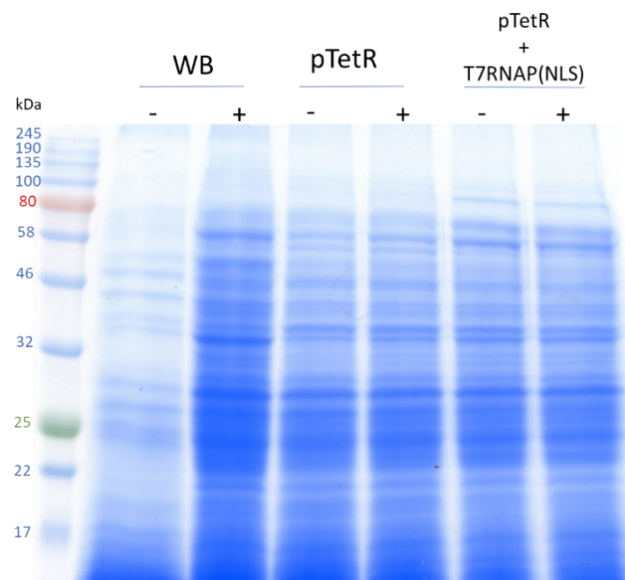
**Obrázek 34:** Exprese G-6-PI (s HA tagy) na vektoru pTetR(SV40NLS) u buněk bez T7RNAP, které byly 48 hodin inkubovány s tetracyklinem o koncentraci 5 µg/ml („+“) a u buněk bez tetracyklinu („-“). Pozitivní kontrolou je zde vzorek z indukované linie „75“ obsahující pouze vektor pTetR (Obr. 30). Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou. Blot byl vyvolán pomocí HRP. Čísla linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA).

### 5.1.7 Srovnání velikostí G-6-PI v buňkách s jadernou T7 RNAP a bez T7RNAP

Na základě výsledků předchozích experimentů, při nichž byly detekovány proteiny různých velikostí, ačkoliv šlo o expresi ze stejného vektoru, byla opakována indukce u dvou linií buněk – buněk s vektorem pTetR (linie „75“ na Obr. 30) a buněk s vektory pTetR a pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS (linie „75“ na Obr. 32). Z indukovaných a kontrolních buněk (48 hodin; 5 µg Tc/ml) byly připraveny lyzáty, jež byly následně testovány metodou imunoblotu (Obr. 35). Na tomto blotu byly testovány i lyzáty z WB buněk (bez jakéhokoliv plasmidu; první dva vzorky na Obr. 35). U linie s jadernou T7 RNA polymerázou (a vektorem pTetR) byla pozorována exprese proteinu o molekulové hmotnosti 32–46 kDa před i po indukci tetracyklinem. Po indukci byl u této linie patrný pouze velmi slabý band odpovídající molekulové hmotnosti ~80 kDa (značeno černou šipkou), jež odpovídá molekulové hmotnosti G-6-PI. Band odpovídající této molekulové hmotnosti byl pozorován i u indukovaných buněk bez T7 RNAP. Výskyt dvou značených proteinů různé molekulové hmotnosti by mohl být důsledkem toho, že v rámci genu *g-6-pi* existuje vnitřní promotor rozeznávaný T7RNAP a díky tomu vzniká kratší transkript, a tedy i protein je zkrácený.



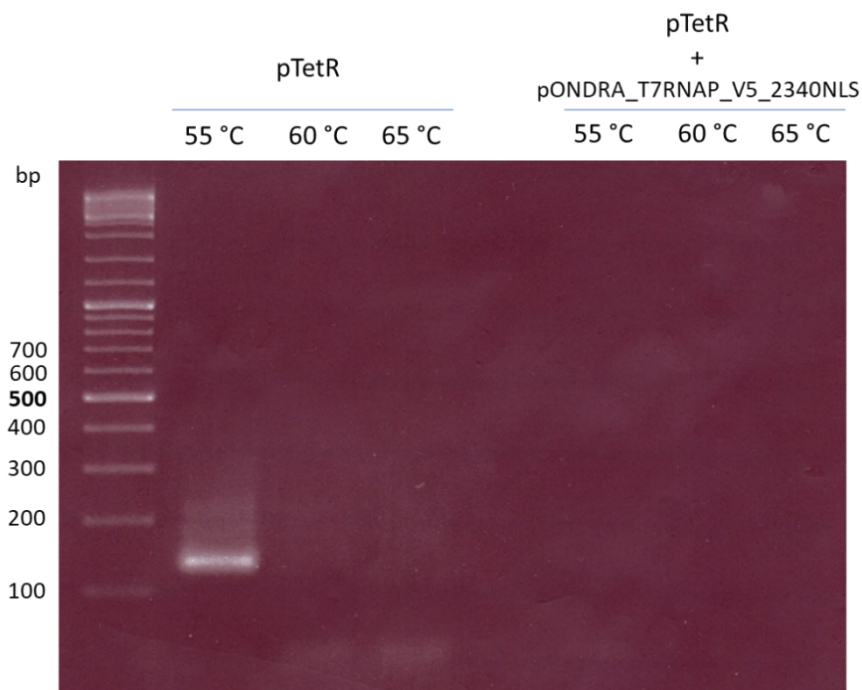
**Obrázek 35:** Srovnání velikosti proteinu značeného HA tagem u linie s vektorem pTetR a linie s vektory pTetR(SV40NLS) a pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS. U obou linií dochází po indukci (+) k expresi proteinu o molekulové hmotnosti cca 80 kDa (černá šipka), přičemž předpokládaná velikost G-6-PI měla být 67 kDa. U druhé zmíněné linie byl u buněk indukovaných i neindukovaných detekován band velikosti 32–46 kDa. Proteiny byly značeny krysí  $\alpha$ -HA protilátkou. Blot byl vyvolán pomocí HRP.



**Obrázek 36:** Gel odpovídající blotu na Obrázku 35 barvený Coomassie Brilliant Blue.

### 5.1.8 5'RACE

Na základě předchozích experimentů, při kterých jsme detekovali dva různé produkty genu *g-6-pi* (Obr. 35), jsme chtěli zjistit, zda rozdíl v molekulové hmotnosti těchto dvou proteinů nespočívá v různých počátcích transkripce. Z obou buněčných linií zmíněných v předchozí kapitole (5.1.7) byla po indukci izolována RNA a následně byla provedena 5'RACE za účelem zjištění, kde u těchto linií začíná transkripce genu *g-6-pi* na vektoru pTetR. Po prvním pokusu provedeném dle pokynů výrobce kitu však 5'RACE neposkytla žádný detekovatelný produkt. Po úpravě složení obou PCR reakcí a použití jiného PCR programu však již produkt reakce detekován byl (Obr. 37), a sice pouze u linie obsahující jen plasmid pTetR. Tento fragment byl izolován z gelu a vložen do vektoru pJet. Následně byl produkt 5'RACE osekvenován (Tab. 41) a jeho sekvence byla srovnána se sekvencí genu *g-6-pi* (GL50803\_9115) (Tab. 42). Přestože v případě této konkrétní linie proteinový produkt zhruba odpovídal očekávané molekulové hmotnosti, podle výsledků 5'RACE došlo k zahájení transkripce až v kódující oblasti genu.



**Obrázek 37:** Produkt 5'RACE na agarózovém gelu. Produkt byl pozorován pouze u linie bez T7RNAP.

**Tabulka 41**

|                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sekvence 5'RACE produktu ( <b>zeleně</b> je vyznačena sekvence adaptéru; <b>oranžově</b> část primeru „5'RACE gene-specific inner primer_MluI_R“)       |
| CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAACTTTACAAGCAAGCTCA<br>CGCTGCAGCCTTCGATCTCATGGATAGGATTGAGAAGCTTGAAAATGTTAATGTTA<br>CTAAGCACCCAACGG <b>ACGCGTTGCA</b> |

**Tabulka 42**

| Produkt 5' RACE (tučně) vyznačen v rámci sekvence GL50803_9115)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATGCAGGAAAGGCACTTCCGCGGCTACAACTCTACGACGATCGCACCTCCTTTGCGTTGG<br>AGTTTGGCGGGTTCCGCGGGTTTAATGCGCGAGCGCAGGGAACG <b>CTTTACAAGCAAGCT</b><br><b>CACGCTGCAGCCTTCGATCTCATGGATAGGATTGAGAAGCTTGAAAATGTTAATGTTA</b><br><b>CTAAGCACCCAACGG</b> AGTCGGAAGACAGGCCCGTGGATCACTACAATCTTAGGATGGAAT<br>GCGAGGTAAAAGGCCGTTCTCTCGCGAAGTCGATTGCTCTCTGGAACACCGTGAAGGCTTT<br>TGCTAAGAAGTGCATTGACGCCAAGGACTACGACCATGTCATCTACAACGGCATCGGCGGC<br>TCTTACCTTGGCCCCCTACCTCCTGCTTACGGCAAAGTACGGTGACGACTCAACATGGCTCT<br>CCGAGCAAGGGGGATGCCGACAGCGCACTTTGTGCGCAAACACCGATCCTGCAAGCTTCGC<br>ACAGGTTATCGAACTTGTTACGGAGGGAGCCATTCTTTTCGCAGGGCACGAGGGTGGTTGAT<br>GCCGCCAAGGCAGCCAAAAAGCTTGAGCGCACGCTTATGGTTGTAATCTCGAAGAGCGGT<br>GGAAGTTCGGGAGACAGCCACCAACTGTGCAACATACCTAACCTGCTGAAGGACTTGCGA<br>GTCCCAAAGCCCGGCCATAGCTTCGTGCGAGTCACCACTGAGGGTTCGAAACTCGACAAG<br>CAGGCAAACGAACAGCAGTTCCGCGAAACCTTCCACATGAACGAAGCCACTGGGGGAAG<br>GACGTCTGTGTGCAGTGCAGTGGGGATGGTTCCCGCTGCATTGCGCGGCGTGGAAGTTCGAA<br>AGCTTTCTGATTGGAATGTCGGAATGGACAAGCTCACGCGTTCCACCGGGAGAACCCC<br>ATGCATAATCCGGCAATTGCCTATGCAACGCTGTTGGATTGGATGCTGAAGGACAAGTCTAC<br>CCCATTCAATCTCATCCTCTTGGCCTATTAGACCCCTCTCAAGCACCTCAGTCACTACTGCC<br>AACAGCTCTTCATGGAATCCCTCGGGAAGAACTACACTAGGGAGGCTCTGCCACTGAAGA<br>CAGGACTCACTATTCTCGGGGGCACGGGCACTGGTGAGCAACATGCCTTCATGCAGCAAAT<br>TCAGAAGGGGTGCTCGGATGCAGCTGTGCAAATGATCCGCTGCCGCAAGCGTGCCGCAGA<br>CTATCCTGATGAGGCTGCAGGGTCGATGGGGAGGCAGCTCTTGGCCTTCGTCAAGGGAAGT<br>GAAATGGCCCTCTACCAAACGAGCGTGCATTTGTTTGTATTACGATAGATGGCTTCTGTGA<br>GCGTTGCATTGGTCAACTGATCGCCTTCGAGGAGAGGGTTGTACGATCCTCAGCGCGTTT<br>TGGAACATCAATGCCTTCGACCAACCAGGTGTCCAGGACGGGAAGCTTGCGTGCCTTGTCT<br>GTAACAAGCTCAGCAAGGATATAGAGTATTGCCTTGCGAAGAGTTGCAGTGAGCTGAAGA<br>CATGTAAGGGGACAGCTCCGGAACCTCTCAAATCTCTGGGGGTAACCTACCAAAGCGGAAG<br>TTGCAGGGCCATACGCCGACGAAGAGCACGAGGACATACCGCTTGGATGGCAGATGCCG<br>TCTTTGAAGACATAGTCACTAACTGTGACACTCCCGGGGCATATCCCTCTTTGGCAGGTAGG<br>ATTGCGTGCTCTAAGAAGTGGGAGGGTAGGGCGTTTACCTATTCTTTGCGAAAAAGTGA |

Uvedené výsledky ukazují, že jsme pomocí konstruktů na vektorech pTetR a pTetR(SV40NLS) dosáhli exprese *g-6-pi* a v některých případech se jednoznačně jednalo o expresi indukibilní (Obr. 29–31). Ačkoliv k transkripci zmíněného genu mělo docházet díky přítomnosti T7 promotoru a T7 RNA polymerázy, překvapivě docházelo k expresi i v případech, kdy v buňkách T7 RNA polymeráza vůbec přítomna nebyla (Obr. 30). Přítomnost T7 RNA polymerázy v buňkách vedla k silnější expresi sledovaného genu, nicméně se zdá, že díky ní pozbyl systém možnosti regulace (Obr. 33). Srovnat regulaci exprese u buněk s TetR represorem s jadernou lokalizační sekvencí (Obr. 30) a bez ní (Obr. 34) není na základě získaných dat možné. Dále jsme zjistili, že kombinace T7RNAP a TetR represoru s jadernou lokalizační sekvencí měla po indukci na buňky výrazně negativní efekt. Ukázali jsme, že intenzita exprese *g-6-pi* závisí na koncentraci tetracyklinu v médiu, a že optimální koncentrace, díky které bylo dosaženo nejvyšší intenzity exprese, byla 1–5 µg/ml (Obr. 31). Na blotech jsme při detekci G-6-PI identifikovali dva proteiny o různých molekulových hmotnostech (Obr. 35). Příslušné transkripty jsme se pokusili nalézt pomocí

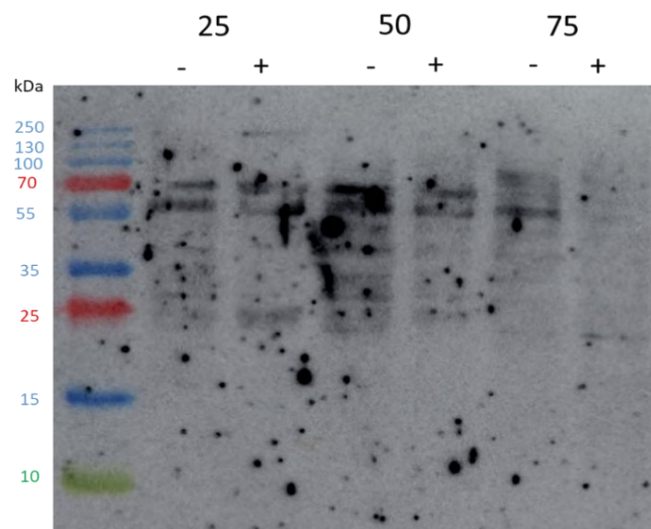
5'RACE, přičemž jsme byli úspěšní pouze u linie buněk, která neobsahovala T7RNAP. Počátek námi získaného transkriptu ležel přibližně sto párů bazí za předpokládaným počátkem transkripce, což by mohlo být způsobeno existencí promotoru v rámci kódující sekvence genu (Tab. 42).

### **5.1.9 Testování inducibilní exprese zkrácené verze genu pro MOMP35 na plasmidu pTetR(SV40NLS)**

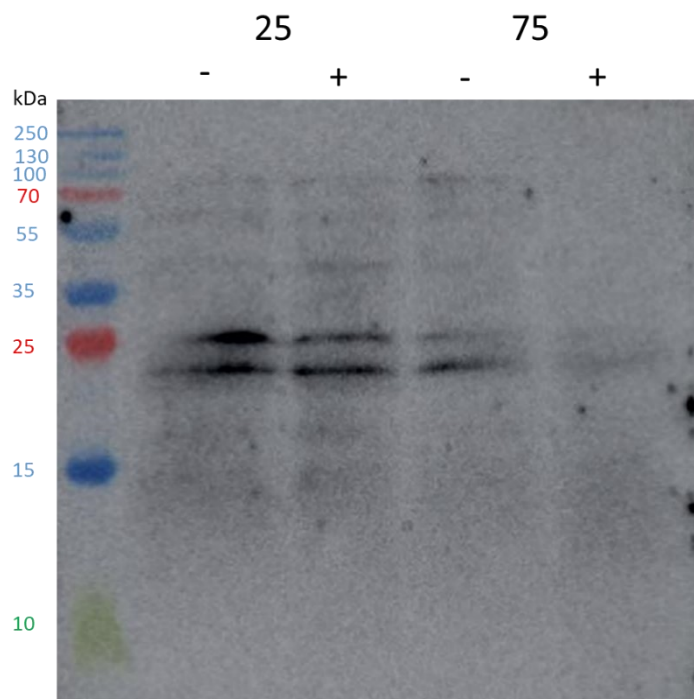
Abychom zjistili, zda je možné vektor pTetR (resp. pTetR(SV40NLS)) použít pro inducibilní expresi jiných genů než *g-6-pi*, byly vybrány další dva geny, u kterých by možnost inducibilní exprese byla s výhodou. První z nich, v této práci označovaný jako „*momp270*“, je tvořen prvními 270 páry bazí genu *momp35* (mitosomal outer membrane protein 35; GL50803\_14939). Produktem genu *momp35* je protein vnější mitosomální membrány, jehož C-terminus ční do cytoplasmy (Martincová et al., 2015). Expresi a lokalizaci jeho zkrácené verze *momp270* (na plasmidu pONDRA, s BAP tagem na C-terminu) již v naší laboratoři testovala Mgr. Alžběta Motyčková. Dle naší hypotézy by inducibilní overexpresi tohoto transmembránového proteinu s BAP tagem na C-terminu za současné aktivity biotin ligázy (která by zajistila biotinylní solubilní části proteinu) umožnila označit biotinem vnější membránu mitosomů, díky čemuž bychom mohli (pomocí magnetických kuliček s navázaným streptavidinem) izolovat celé mitosomy. V této práci však byla testována pouze inducibilní exprese genu pro MOMP270 s BAP tagem na C-terminu. Ke genu byla prostřednictvím forward primeru přidána 61 párů bazí dlouhá regulační oblast obsahující T7 promotor a dva *tetO* operátory. Gen byl přes restriční místa EcoRV a EcoRI vložen do vektoru pTetR(SV40NLS). Po kontrole vektoru prostřednictvím sekvenace byly tímto plasmidem transfekovány buňky (WB) s jadernou T7 RNA polymerázou. Po selekci a vytvoření monolayeru byl z buněk indukovaných tetracyklinem (5 µg/ml; 72 hodin) připraven lyzát, který byl otestován na přítomnost proteinu s BAP tagem prostřednictvím western blotu (Obr. 38). Protein očekávané molekulové hmotnosti 12 kDa však nebyl na blotu pozorován před ani po indukci.

### **5.1.10 Testování inducibilní exprese zkrácené verze genu *momp35* na plasmidu pTetR**

Gen *momp270* byl vložen i do vektoru pTetR. Výsledným vektorem pTetR\_MOMP270 byly transfekovány buňky WB a získané linie byly indukovány tetracyklinem (5 µg/ml) po dobu 72 hodin. Lyzáty z indukovaných buněk byly testovány na western blotu (Obr. 39). Protein předpokládané velikosti se však opět detekovat nepodařilo.

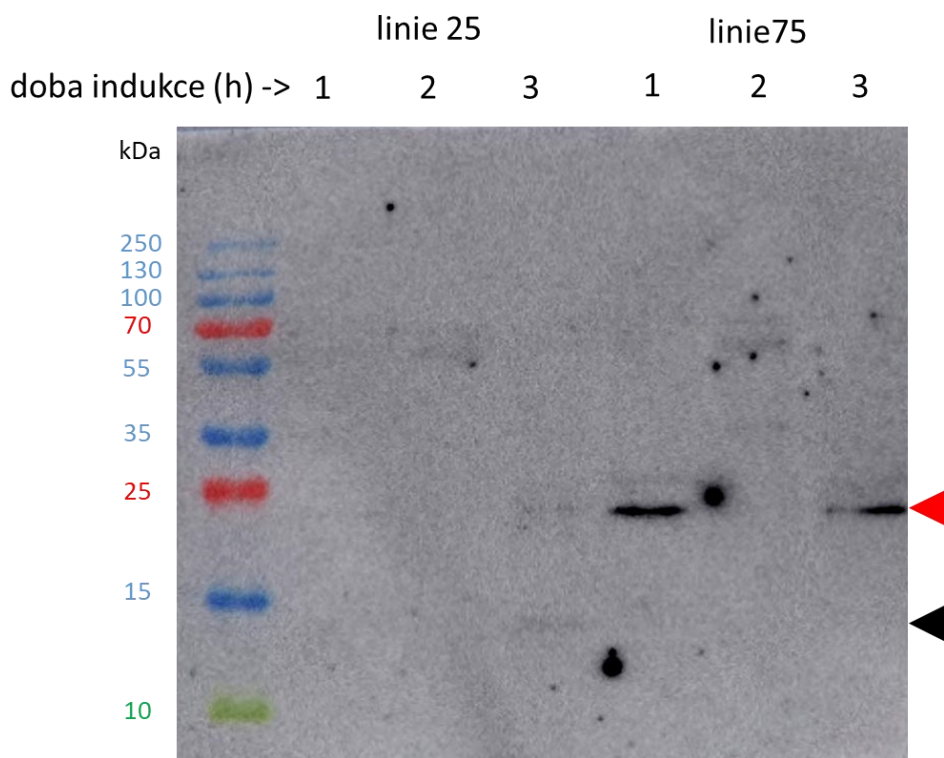


**Obrázek 38:** Detekce produktu genu *momp270* na vektoru pTetR(SV40NLS) pomocí králičí  $\alpha$ -BAP protilátky u indukovaných (+) a neindukovaných (-) buněk. Blot byl vyvolán pomocí HRP. Očekávaná velikost zkoumaného proteinu měla být 12 kDa. Číslo linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).



**Obrázek 39:** Detekce produktu genu *momp270* (na vektoru pTetR) pomocí králičí  $\alpha$ -BAP protilátky u indukovaných (+) a neindukovaných (-) buněk. Blot byl vyvolán pomocí HRP. Očekávaná molekulová hmotnost zkoumaného proteinu byla 12 kDa. Číslo linií (25 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).

Buňky selektované na přítomnost vektoru pTetR\_MOMP270 (linie testované na Obrázku 39) byly testovány znovu. Tentokrát však trvala indukce 1, 2 a 3 hodiny a poté byl opět připraven lyzát, který byl po přenosu na membránu testován metodou imunoblotu (Obr. 40). V tomto případě byl detekován velmi slabý band odpovídající molekulové hmotnosti 10–15 kDa (linie „25“ po 3 hodinách indukce; černá šipka). Dále byl pozorován výraznější signál proteinů odpovídajících 15–25 kDa (červená šipka), který byl patrný i u přechozího blotu (Obr. 39). Tento signál zhruba odpovídá dvojnásobku očekávané molekulové hmotnosti.

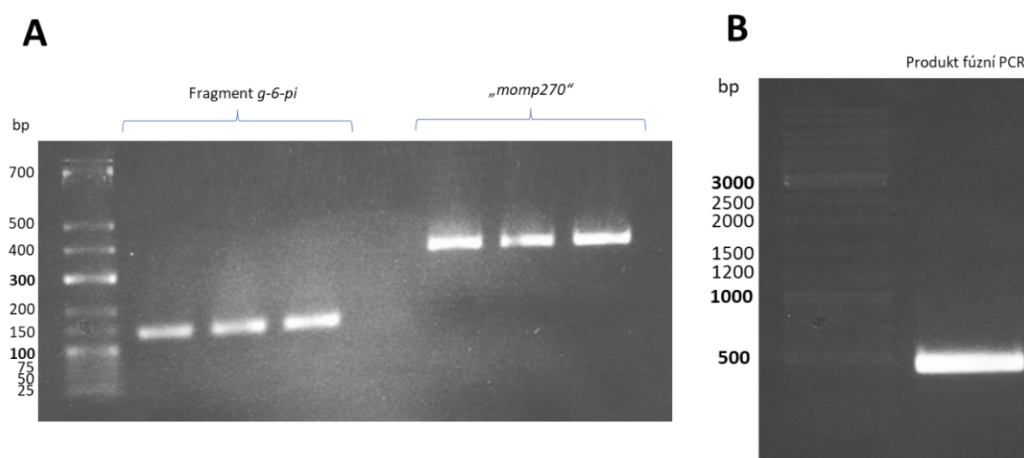


**Obrázek 40:** Detekce produktu genu *momp270* (na vektoru pTetR) pomocí králičí  $\alpha$ -BAP protilátky u buněk indukovaných jednu, dvě nebo tři hodiny. Očekávaná molekulová hmotnost zkoumaného proteinu byla 12 kDa. Této molekulové hmotnosti nejlépe odpovídá band označený černou šipkou u linie „25“ po třech hodinách indukce. Červená šipka značí protein velikosti 15–25 kDa, který se vyskytuje i na Obrázku 39. Blot byl vyvolán pomocí HRP. Čísla linií (25 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).

Indukovat expresi proteinu odpovídajícího předpokládané molekulové hmotnosti MOMP270 se nám nepodařilo. Příslušný band byl sice u jedné z linií po třech hodinách indukce patrný, ovšem jednalo se o velmi slabý signál. Pozorovali jsme však větší množství proteinu o zhruba dvojnásobné molekulové hmotnosti (Obr. 39 a 40).

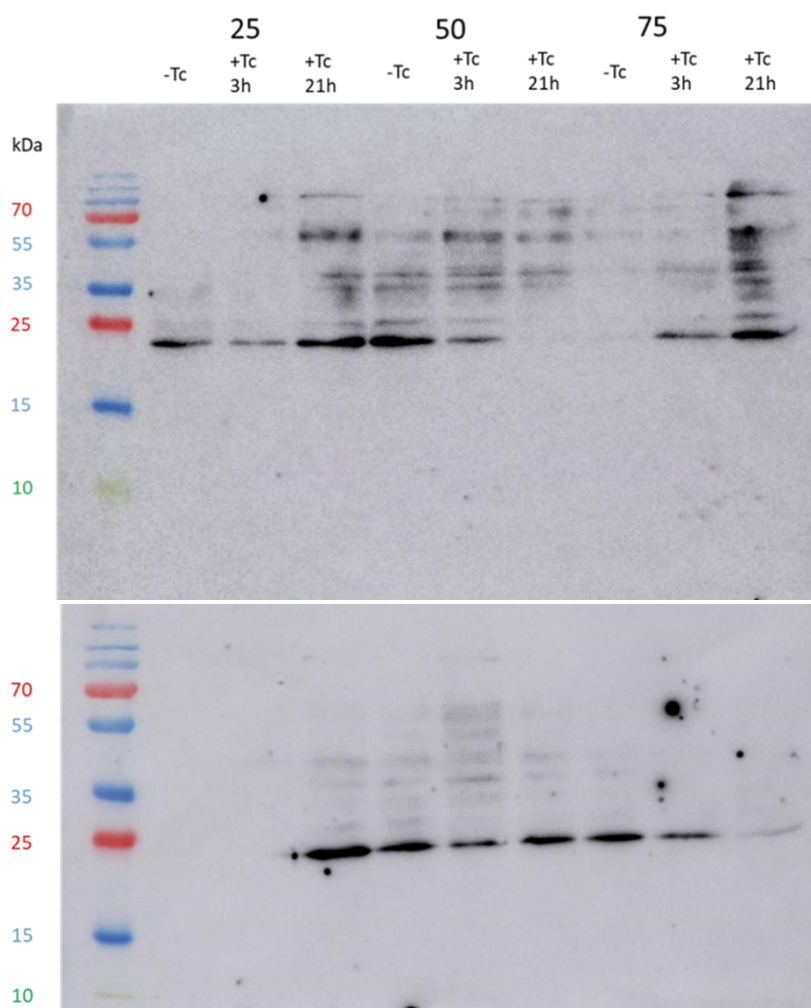
### 5.1.11 Testování inducibilní exprese fúzního genu *g-6-pi\_momp270* na plasmidu pTetR

Na základě výsledků 5'RACE u linie buněk s *g-6-pi* na plasmidu pTetR (bez T7 RNAP) jsme se domnívali, že by se v rámci prvního sta párů bází genu pro G-6-PI mohl nacházet vnitřní promotor. Proto jsme se rozhodli vytvořit konstrukt, ve kterém bude tato potenciálně promotorová oblast umístěna před gen pro MOMP270, jehož exprese již byla testována výše. 105 párů bází dlouhá část genu pro G-6-PI byla navíc upravena tak, aby nemohlo dojít k translaci této části, neboť první trojice bází ATG byla prostřednictvím primeru mutována na ATC. Tento konstrukt byl vytvořen pomocí fúzní PCR, která umožnila spojit část genu *g-6-pi* s genem *momp270* (Obr. 41 část A) za vzniku fúzního produktu (Obr. 41 část B).

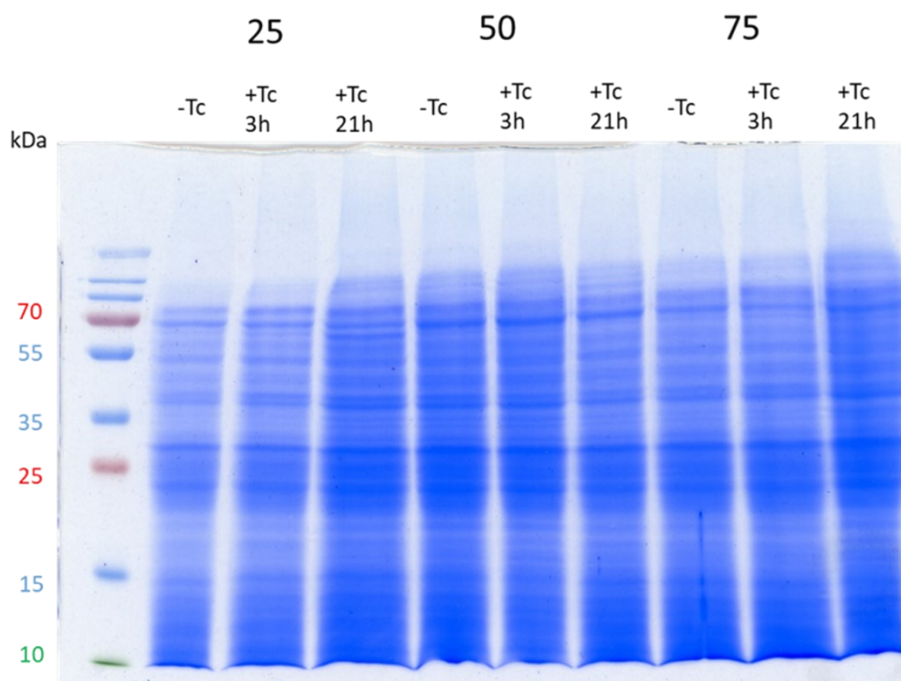


**Obrázek 41:** Spojení dvou genů přítomných na gelu A pomocí fúzní PCR za vzniku produktu na gelu B.

Sekvence hotového konstruktu byla ověřena sekvenací a výsledný vektor byl elektroporován do WB buněk. Tři získané linie buněk byly indukovány tetracyklinem (5 µg/ml) po dobu 3 a 21 hodin. Přítomnost proteinu zájmu v lyzátech indukovaných i kontrolních buněk byla ověřena metodou imunoblotu (Obr. 42). Celkové množství proteinů ve vzorcích bylo vizualizováno na gelu pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue (Obr. 43). Jelikož jsme u western blotu měli podezření, že proteiny nebyly rovnoměrně přeneseny z gelu na membránu (Obr. 42 – horní blot), byly elektroforéza i detekce na blotu provedeny znovu (Obr. 42 – dolní blot). Na blotech jsme stejně jako u předchozího experimentu pozorovali protein o zhruba dvojnásobné molekulové hmotnosti, než bychom u MOMP270 očekávali. Nejednalo se o inducibilní expresi.



**Obrázek 42:** Detekce produktu genu *momp270* (na vektoru pTetR) pomocí králičí  $\alpha$ -BAP protilátky u buněk neindukovaných a indukovaných 3 a 21 hodin. Pořadí i na gel nanesené množství vzorků je u obou blotů stejné. Očekávaná molekulová hmotnost zkoumaného proteinu byla 12 kDa. Bloty byly vyvolány pomocí HRP. Čísla linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).



**Obrázek 43:** Gel odpovídající blotu na Obrázku 42 barvený Coomassie Brilliant Blue. Čísla linií (25, 50 a 75) odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA)

#### 5.1.12 Testování indukibilní exprese genu pro Bak1 na plasmidu pTetR(SV40NLS)

Dalším genem, jehož indukibilní exprese jsme chtěli využít při studiu funkce mitosomů u *G. intestinalis*, byl *bak1* z genomu *Homo sapiens* (XM\_011514779.3). Bak1 je mitochondriální proapoptotický protein z proteinové rodiny Bcl-2, který po aktivaci vnitřní apoptotické dráhy (intrinsic apoptotic pathway) tvoří póry ve vnější mitochondriální membráně. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány vede k úniku cytochromu c a dalších proteinů, které umožní zahájení kaspázové kaskády vedoucí ke smrti buňky (Peña-Blanco&García-Sáez, 2018). Hehl a kolektiv (2007) se rozhodli zjistit, zda exprese lidského apoptotického proteinu Bax (který je stejně jako Bak1 schopný tvořit póry v mitochondriální membráně) v buňkách *G. intestinalis* způsobí porušení integrity mitosomální membrány a celkové funkce mitosomu. Pro expresi tohoto genu byl autory použit promotor genu *cwp1*, k jehož expresi dochází během encystace. Jak však bylo zjištěno, Bax neinteragoval s mitosomy, nicméně byl pozorován v ESV (encystation specific vesicles) váčcích, a měl negativní dopad na funkci těchto váčků, pravděpodobně díky své schopnosti tvořit póry v membránách (Hehl et al., 2007). V rámci této diplomové práce bylo naším cílem v podstatě zmíněný experiment zopakovat, ovšem za použití jiného apoptotického proteinu a také jiného systému pro indukibilní expresi, jež nebude vyžadovat vyvolání procesu encystace.

Jelikož jsme neměli jistotu, že přidání tagu k Bak1 proteinu neovlivní jeho funkci, byly vytvořeny dvě verze konstruktů. První verze konstruktů, která neobsahovala žádný tag, byla amplifikována a poté i s regulační oblastí (T7 promotor a dva *tetO* operátory) vložena do vektoru

pTetR(SV40NLS) přes restrikční místa EcoRV a EcoRI. Tento konstrukt měl sloužit pouze jako kontrola, u které by bylo možné mikroskopicky pozorovat případný negativní efekt na buňky, do kterých bude elektroporován, v porovnání s buňkami s tagovaným proteinem. Druhá verze konstruktů obsahovala dva HA tagy na N-terminu, které však musely být zahrnuty do primeru, a tudíž už nebylo možné zahrnout do primeru regulační oblast obsahující T7 promotor a *tetO* operátory. Proto byl amplifikovaný gen nejprve ligován přes MluI restrikční místo s oligonukleotidem obsahujícím zmíněnou regulační oblast a vzniklá fúzní molekula byla amplifikována pomocí PCR, jejíž produkt byl vložen do pTetR(SV40NLS) vektoru přes restrikční místa EcoRV a EcoRI.

U buněk obsahujících jadernou T7 RNA polymerázu nedala transfekce konstruktů Bak1 s HA tagem ani Bak1 bez tagu (oba na plasmidu pTetR(SV40NLS)) vzniknout žádné stabilní linie, u které by bylo možné indukovat expresi.

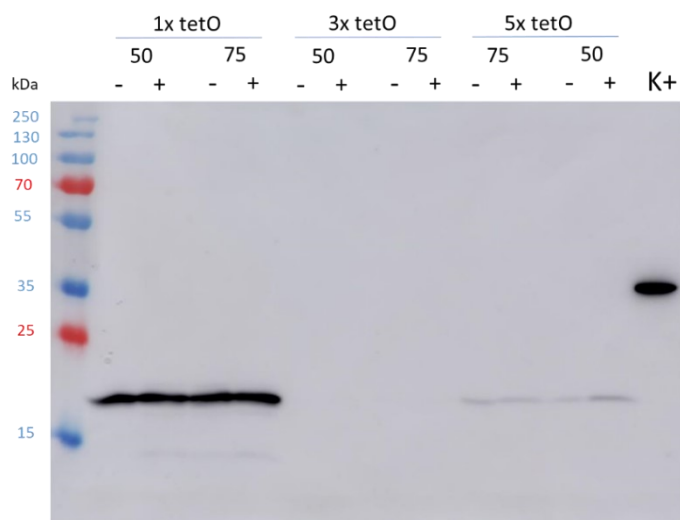
Obě verze konstruktů byly následně vloženy do plasmidu pTetR obsahujícího represor bez jaderné lokalizační sekvence. Výslednými plasmidy byly transfekovány buňky WB (bez T7RNAP). Buňky selektované na přítomnost konstruktů obsahujícího Bak1 bez tagu na plasmidu pTetR byly poté, co narostly do monolayeru, indukovány po dobu 1, 2, 3 a 48 hodin. Po prohlédnutí indukovaných buněk pod mikroskopem nebyl patrný žádný neobvyklý fenotyp ve srovnání s kontrolními WB buňkami, do kterých pTetR vektor elektroporován nebyl, ani ve srovnání s buňkami selektovanými na přítomnost konstruktů s HA tagem.

U buněk, jež byly transfekovány vektorem obsahujícím *bak1* s HA tagem byla exprese testována metodou imunoblotu po indukci 48 hodin (5 µg Tc/ml). Druhý pokus o detekci zmíněného proteinu byl proveden u stejných buněk indukovaných 1, 2 a 3 hodiny. Ani v jednom případě nebyl protein zájmu (a ani band jiné velikosti) na blotu detekován.

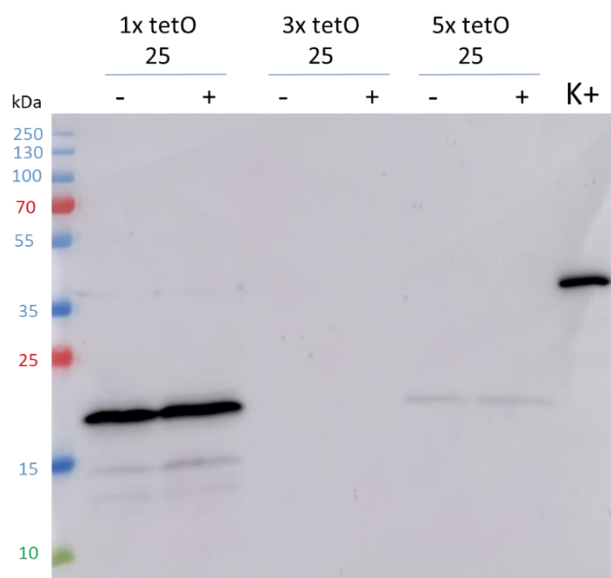
### 5.1.13 Inducibilní exprese pomocí endogenního *oct* promotoru (vektor pTetRall)

Další konstrukt pro inducibilní expresi obsahoval nikoliv T7 promotor, ale endogenní *oct* promotor (resp. 5'UTR genu *oct*). Tento konstrukt měl sloužit k otestování vlivu různého počtu *tetO* operátorů na expresi sledovaného proteinu. Jako reportérový gen byla vybrána NanoLuc luciferáza, u které mělo být možné pomocí luminometru snadno změřit intenzitu exprese u jednotlivých variant tohoto konstruktů. Nejprve byly do pTetR plasmidu vloženy 5'UTR a 3'UTR oblasti genu *oct* a gen pro NanoLuc luciferázu se dvěma HA tagy na C-terminu. V tomto konstruktě byl přítomen jeden *tetO* operátor nacházející se mezi dvěma restrikčními místy (AflII a PstI), takže jej bylo možné snadno vyštěpit a místo něj vložit jiný počet operátorů. Tímto způsobem byly připraveny další dva konstruktů – jeden obsahoval tři *tetO* operátory a druhý pět *tetO* operátorů. Elektroporací konstruktů do WB buněk a selekcí bylo získáno devět linií, které byly testovány na přítomnost tagované luciferázy metodou western blotu (Obr. 44 a 45). U buněk selektovaných na přítomnost konstruktů s obsahem jednoho operátoru byla před i po indukci tetracyklinem (5 µg/ml; 24 hodin) pozorována silná exprese tagovaného proteinu (který zhruba odpovídal očekávané molekulové hmotnosti 21 kDa). U konstruktů se třemi operátory nebyl (ani u jedné z testovaných linií) na blotu detekován žádný signál. U buněk, které byly selektované na

přítomnost konstruktů s pěti operátory byla slabá exprese proteinu zájmu pozorována před i po indukci. Vzhledem k těmto nejasným výsledkům nebylo plánované měření aktivity luciferázy pomocí luminometru uskutečněno.



**Obrázek 44:** Expresa NanoLuc luciferázy u buněk s konstruktem pTetRaII s jedním (1x tetO), třemi (3x tetO) nebo pěti operátory (5x tetO). Indukce tetracyklinem (5 µg/ml) trvala 24 hodin. Od každé varianty konstruktů byly testovány linie „75“ a „50“ (čísla odpovídají množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno v µg DNA). Značeno pomocí krysí  $\alpha$ -HA protilátky.



**Obrázek 45:** Expresa NanoLuc luciferázy u buněk s konstruktem pTetRaII s jedním (1x tetO), třemi (3x tetO) nebo pěti operátory (5x tetO). Indukce tetracyklinem (5 µg/ml) trvala 24 hodin. Od každé varianty konstruktů byly testovány linie „25“. Číslo linie „25“ odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA). Značeno pomocí krysí  $\alpha$ -HA protilátky.

I přes dílčí úspěšné pokusy o inducibilní expresi se nám nepodařilo vytvořit systém, který by zajistil reprodukovatelnou inducibilní expresi námi vybraných genů. Náš systém založený na regulovatelné transkripci genů heterologní T7 RNA polymerázou byl z neznámého důvodu

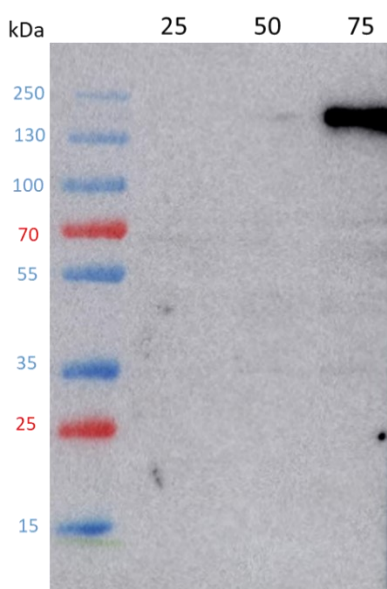
funkční i při absenci této RNA polymerázy. Snaha o vytvoření inducibilního promotoru z endogenního promotoru genu *oct* přidáním operátorů nebyla úspěšná a vliv počtu operátorů na intenzitu exprese byl dle našich výsledků nejasný.

## 5.2 Knock-out genu *cwp1*

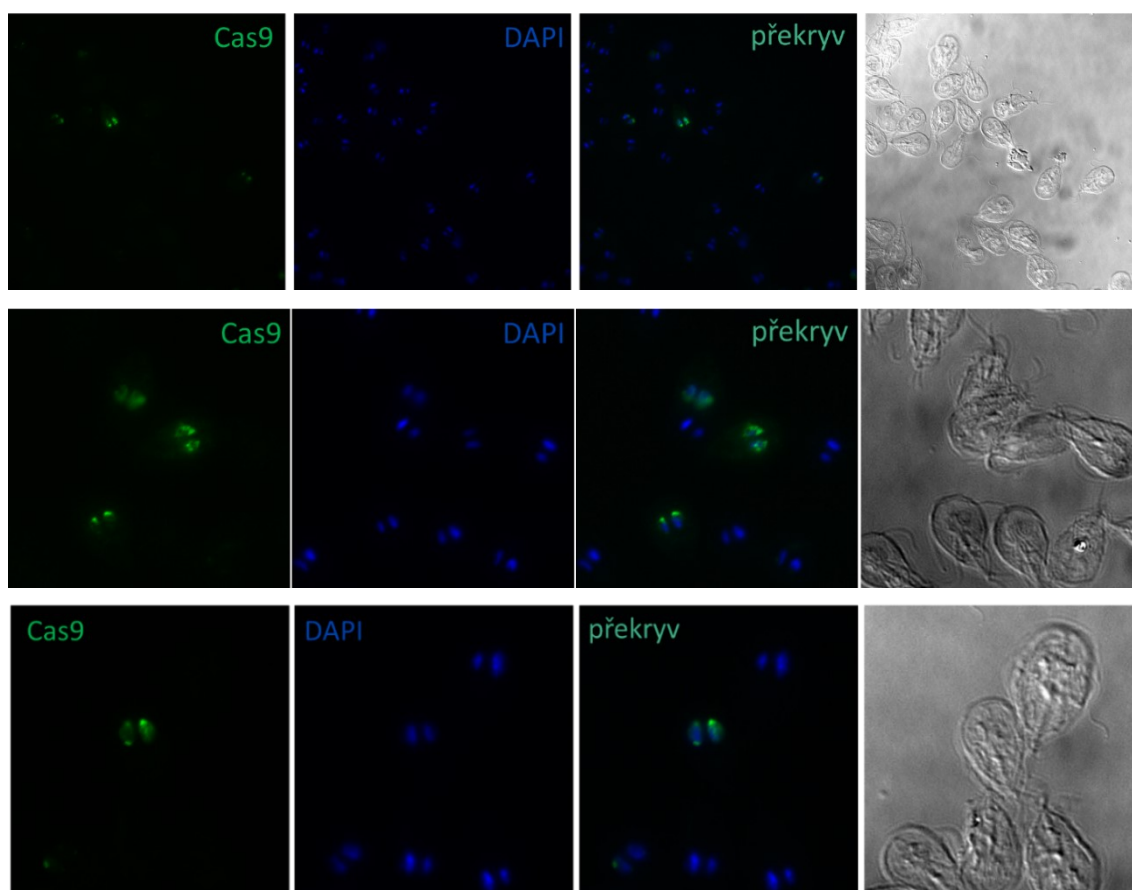
Pro otestování námi navržených vektorů pro vytváření genového knock-outu u *G. intestinalis* jsme vybrali gen *cwp1*, u kterého byl již úplný knock-out publikován a jehož absence není pro trofozoity letální (Ebner et al., 2016).

### 5.2.1 Exprese Cas9 endonukleázy

V rámci přípravy vektoru pONDRAcas9 byl amplifikován plasmid pONDRA tak, že do něj byla zavedena nová restrikční místa včetně restrikčního místa MluI, ve kterém byl vzniklý PCR produkt štěpen (toto restrikční místo bylo na obou koncích PCR produktu). Přes naštěpené MluI místo byl následně lineární PCR produkt ligován za vzniku cirkulární molekuly. Poté byl do vektoru vložen gen pro endonukleázu Cas9 (optimalizovaný pro expresi v buňkách *G. intestinalis*) i s příslušnými UTR oblastmi. Sekvence vloženého konstruktů byla ověřena sekvenací. Po transfekci WB buněk tímto vektorem byly selekcí získány tři linie, ze kterých byly připraveny lyzáty následně testované metodou imunoblotu (Obr. 46). Ze stejných buněk byly připraveny i preparáty pro fluorescenční mikroskopii (Obr. 47). U linie „25“ bylo na preparátu pozorováno pouze několik málo HA-pozitivních buněk. Na preparátech připravených z linií „50“ a „75“ bylo pozitivních buněk nalezeno více a signál tagovaného proteinu byl pozorován především v jádrech.



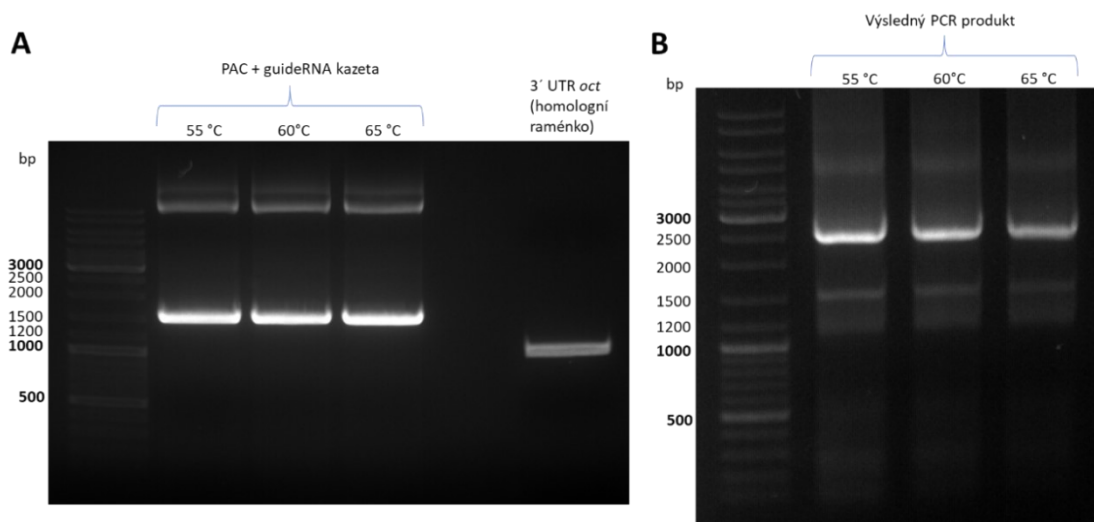
**Obrázek 46:** Exprese Cas9 endonukleázy. Čísla nad blotem značí tři různé linie buněk získané elektroporací. Číslo odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA). Značeno pomocí krysí  $\alpha$ -HA protilátky.



**Obrázek 47:** Lokalizace Cas9 endonukleázy v buňkách trofozoitů (zeleně). Dále jsou na snímcích modře značená jádra (DAPI) a buňky pod diferenciálním kontrastem (vždy poslední snímek v řadě). Cas9 detekována krysí  $\alpha$ -HA protilátkou.

### 5.2.2 Vektor pTGuide

Amplifikací části plasmidu pTG byla do tohoto vektoru zavedena nová restrikční místa, přičemž přes jedno z nich (MluI) byl PCR produkt ligován a dal vzniknout cirkulárnímu konstrukt. Do vzniklého vektoru byly vloženy tři inserty. 5'UTR a 3'UTR oblast genu *cwpI*, obě dlouhé 1000 párů bází, měly sloužit jako homologní ramena, tedy templát pro opravu zlomů *cwpI* lokusu (vyvolaných Cas9) homologní rekombinací. Mezi 5'UTR a 3'UTR oblast byl vložen třetí insert obsahující gen pro PAC a kazetu pro expresi guideRNA (obojí amplifikováno z plasmidu Cas9U6g1pac). Přítomnost všech insertů byla ověřena kontrolní restrikcí a sekvenací. Klonování tohoto konstrukt bylo problematické, neboť jedno z restrikčních míst (ClaI) bylo nevhodně umístěno v rámci konstrukt tak, že za určitých podmínek nešel plasmid v tomto místě štěpit. Příčinou byla pravděpodobně Dam metylace tohoto restrikčního místa v buňkách *E. coli*, ve kterých byl plasmid po vložení první části konstrukt (3'UTR homologního raménka) namnožen. Tomuto problému bylo možné zamezit vytvořením fúzního konstrukt spojením dvou částí, mezi kterými se toto restrikční místo nachází, pomocí PCR (postup v kapitole 4.3.3.6.2). Na Obrázku 48 (část A) jsou vidět dva různé PCR produkty, které byly izolovány z gelu, štěpeny ClaI, ligovány a poté amplifikovány za vzniku fúzního produktu (Obr. 48 B).

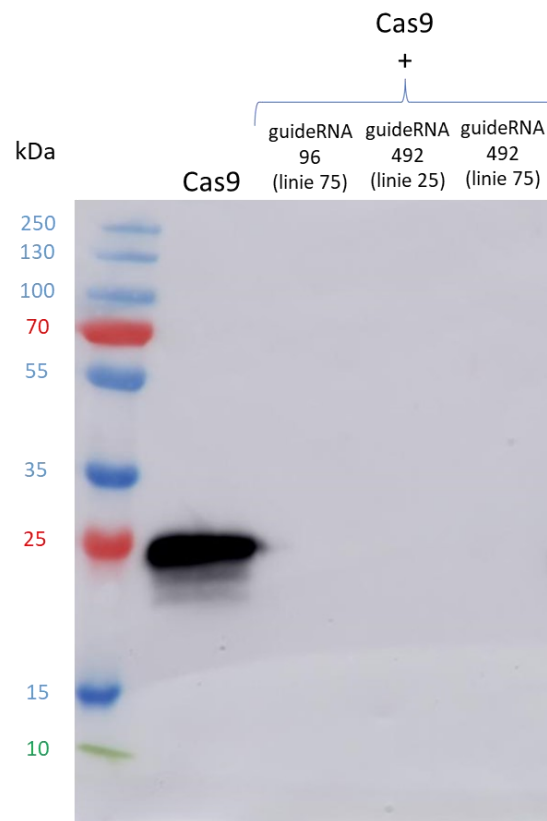


**Obrázek 48:** Spojování dvou insertů – guideRNAkazety spolu s PAC a 3'UTR *oct* oblasti (část **A**) – pomocí ligace a následné PCR reakce za vzniku fúzního produktu (**B**).

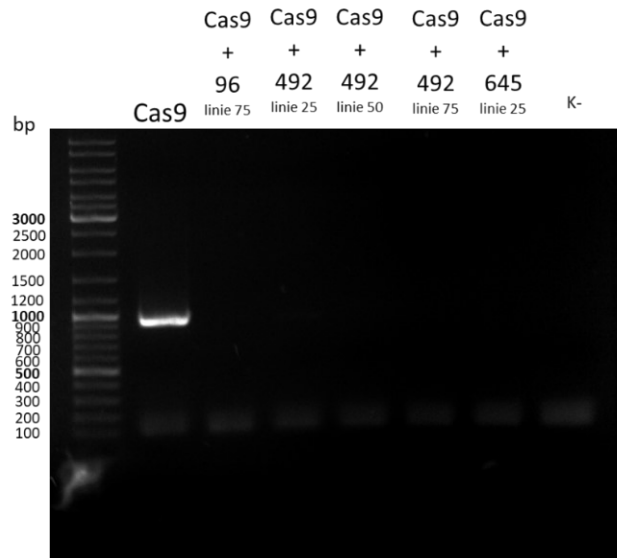
Posledním krokem bylo vložení spaceru do guideRNA kazety. Byly vybrány tři různé spacery, které byly vloženy do vektoru pTGuide, v rámci této práce označované jako „96“, „492“ a „645“ podle místa, v němž měla v rámci genu *cwp1* Cas9 endonukleáza štěpit DNA. Sekvence všech guideRNA byly ověřeny sekvenací.

### 5.2.3 *cwp1* knock-out

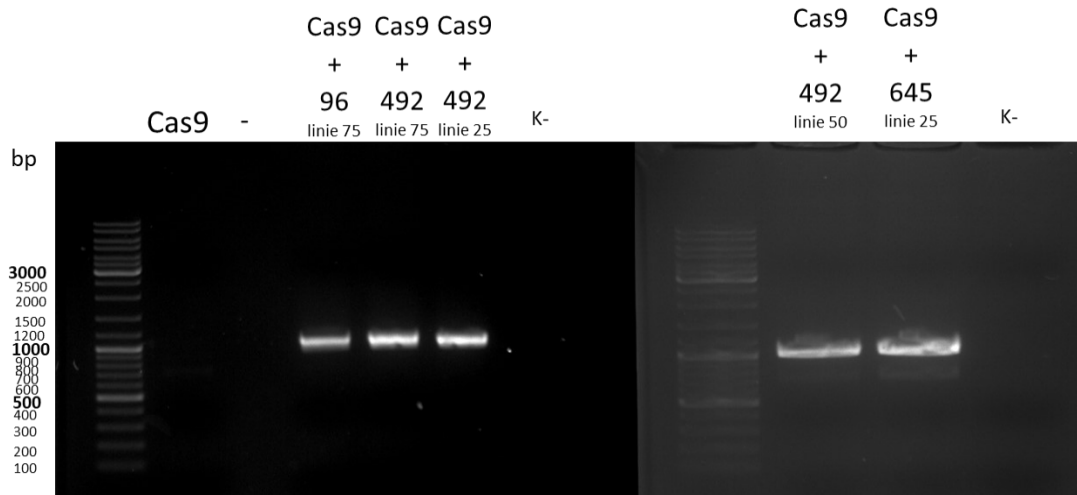
Trofozoiti obsahující vektor pONDRAs9 (linie „75“; Obr. 46) byli transfekováni vektorem pTGuide, který obsahoval vždy jeden z výše zmíněných spacerů. Linie označované jako „25“ a „50“ (při transfekci bylo použito 25 µg a 50 µg plasmidové DNA) byly transfekovány vektorem pTGuide, který byl před elektroporací naštěpen enzymem MluI. K buňkám byla přidána nepřečištěná restriční reakce. Linie označované jako „75“ vznikly elektroporací plasmidové DNA v cirkulární podobě. Dva typy molekul DNA (lineární a cirkulární) byly použity za účelem zjistit, která z forem je efektivnější, co se týče integrace konstruktů do genomu. Elektroporace a následná selekce daly vzniknout celkem pěti liniím, ze kterých byla izolována genomová DNA. Po encystaci trvající cca 21 hodin byl z buněk připraven buněčný lyzát, jež byl poté testován metodou western blotu za použití protilátky A300 (Obr. 49). Výsledky překvapivě ukázaly na absenci proteinu CWP1 u všech testovaných linií. Stejně tak i testování metodou PCR na přítomnost genu *cwp1* ukázalo absenci genu u všech linií (Obr. 50). Naopak byla v genomu testovaných linií pozitivně detekována integrace konstruktů do genomu (Obr. 51). Z buněk, u kterých byla zjištěna absence genu *cwp1*, byly po encystaci (24 hodin) připraveny preparáty na fluorescenční mikroskopii. Pro detekci CWP proteinů zde byla použita protilátka A300. Navzdory předchozím výsledkům byla u některých buněk detekována přítomnost CWP1 ve stěně cysty (Obr. 52) nebo v ESV váčcích (Obr. 53).



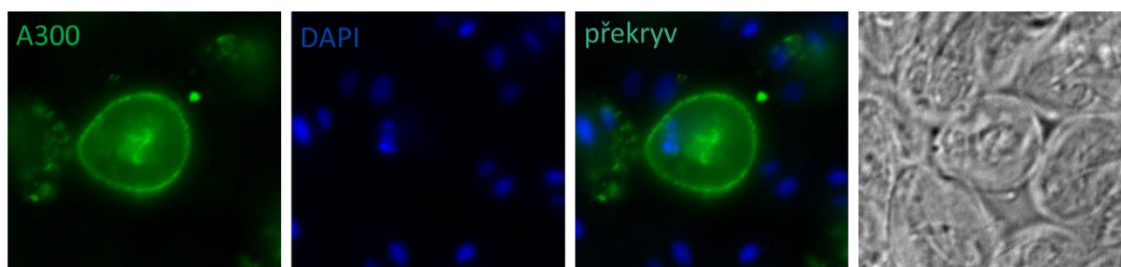
**Obrázek 49:** Detekce CWP1 pomocí primární protilátky A300 u buněk kontroly (linie Cas9) a buněk s vektorem pTGuide. Vyvoláno HRP. Označení linie, resp. jednotlivých zkumavek (25 a 75), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA).



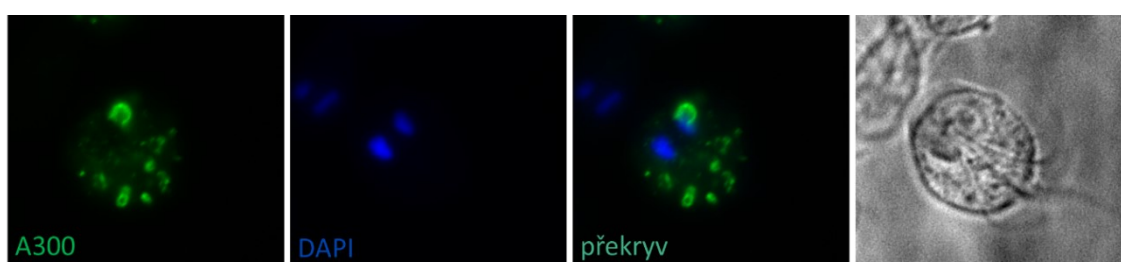
**Obrázek 50:** Detekce genu *cwpI* pomocí PCR reakce u buněk kontroly (Cas9) a buněk s vektorem pTGuide (různé linie s různými spacery). Označení linie, resp. jednotlivých zkumavek (25, 50 a 75), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA).



**Obrázek 51:** Test integrace konstruktů z vektoru pTGuide do genomu buněk kontroly (Cas9) a buněk s vektorem pTGuide (různé linie s různými spacery). Označení linie, resp. jednotlivých zkumavek (25, 50 a 75), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA).



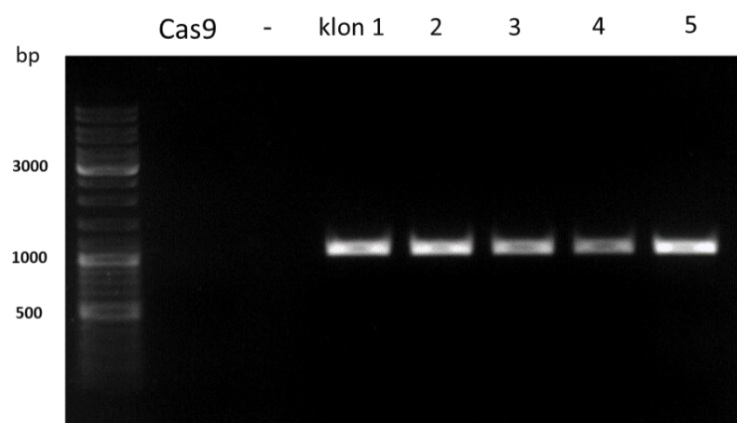
**Obrázek 52:** Značení encystujících buněk knock-outu pomocí protilátky A300.



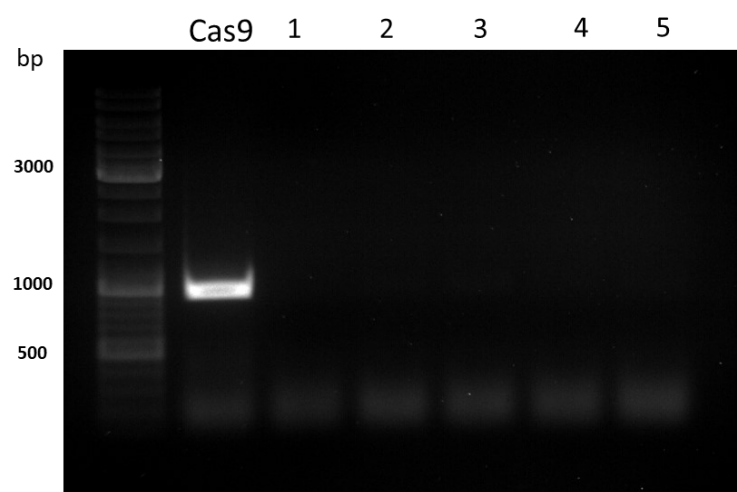
**Obrázek 53:** Značení encystujících buněk knock-outu pomocí protilátky A300.

#### 5.2.4 Subklonování *cwp1*-KO linie

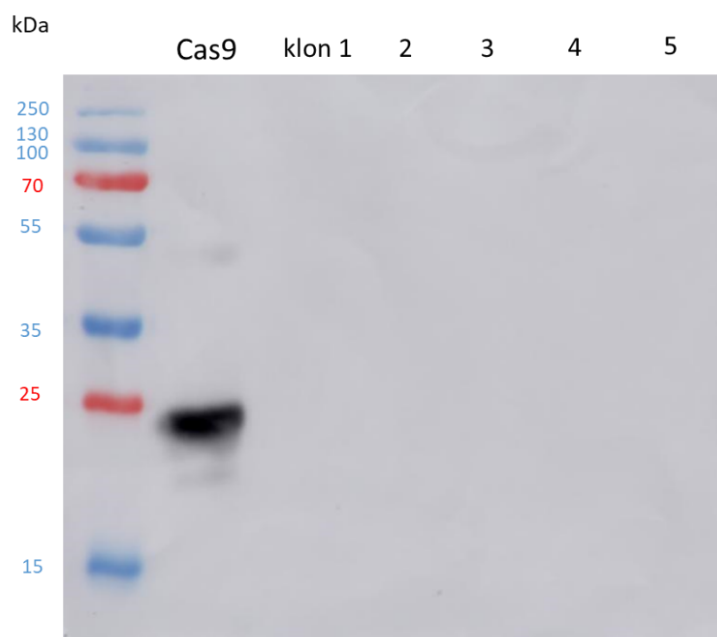
Z důvodu přítomnosti CWP1 u některých buněk v populaci, bylo z kultury vytvořeno několik subklonů odvozených z jedné buňky. Buňky linie „75“ (obsahující spacer 492) byly subklonovány za vzniku pěti klonů, ze kterých byla izolována genomová DNA a po encystaci (24 hodin) připraven lyzát. Výsledek testování pomocí PCR reakce znázorňují Obrázek 54 (integrace konstruktů do genomu) a Obrázek 55 (přítomnost *cwp1*). Přítomnost CWP1 proteinu v lyzátech byla zjišťována metodou western blotu za použití protilátky A300 (Obr. 56; gel barvený Coomassie Brilliant Blue Obr. 57). Proteom klonu 3 (po encystaci) byl analyzován hmotnostním spektrometrem (zpracovaná data znázorňuje Obr. 58). Hmotnostní spektrometrie potvrdila absenci proteinu CWP1 (GL50803\_5638) u buněk klonu 3 (ve srovnání s buňkami kontroly, jež obsahovaly pouze vektor pONDRAcas9).



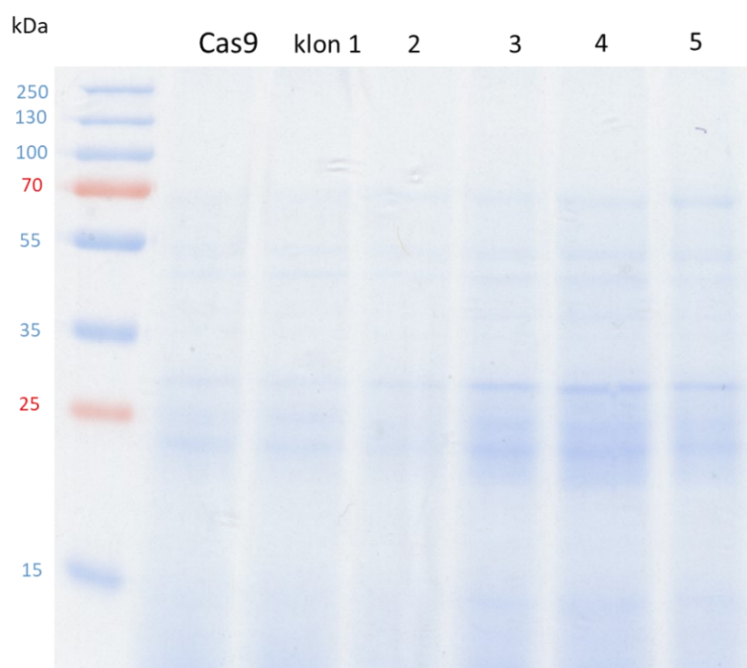
**Obrázek 54:** Test integrace konstruktů do genomu u kontroly (Cas9) a jednotlivých klonů knock-outu.



**Obrázek 55:** Test na přítomnost genu *cwpI* u kontroly (Cas9) a jednotlivých klonů knock-outu.



**Obrázek 56:** Detekce CWP1 pomocí primární protilátky A300 u buněk kontroly (linie Cas9) a jednotlivých klonů linie knock-outu. Vyvoláno HRP.



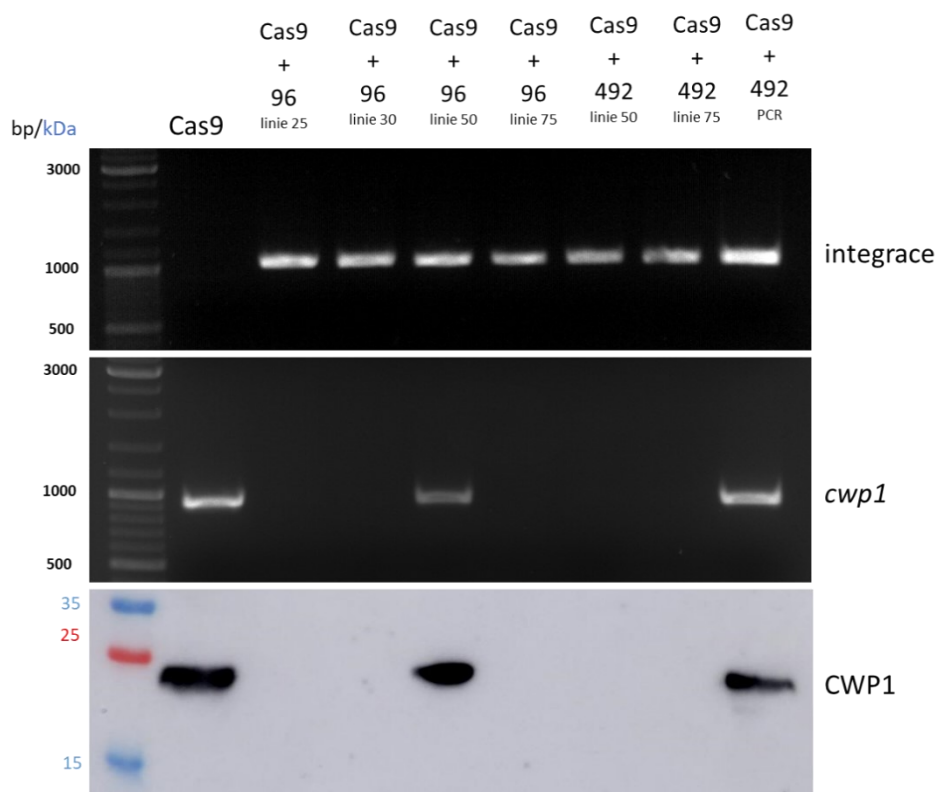
**Obrázek 57:** SDS PAGE gel odpovídající blotu na Obrázku 56. Barveno Coomassie Brilliant Blue.

|      | A                      | C             | E                            | F          | G             | H                | I           | K                | L     | M      |
|------|------------------------|---------------|------------------------------|------------|---------------|------------------|-------------|------------------|-------|--------|
| 1    | Protein Identificators |               | Quantification and statistic |            |               |                  |             |                  |       |        |
| 2    |                        |               |                              |            |               |                  |             |                  |       |        |
| 3    |                        |               |                              |            |               |                  |             |                  |       |        |
| 4    | Majority protein IDs   | Fasta headers | CWP1KO                       | -Log Stude | Mean kontrola | Media % of valid | Mean CWP1KO | Media % of valid |       |        |
| 2329 | GL50803_5213           | GL50803_5213  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | 22,60            | 22,60 | 66,67  |
| 2330 | GL50803_5247           | GL50803_5247  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 33,33       | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2333 | GL50803_5274           | GL50803_5274  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | 23,17            | 23,17 | 66,67  |
| 2335 | GL50803_5305           | GL50803_5305  | NaN                          | NaN        | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2336 | GL50803_5307           | GL50803_5307  | NaN                          | NaN        | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2346 | GL50803_5435           | GL50803_5435  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | 23,86            | 23,79 | 100,00 |
| 2353 | GL50803_5553           | GL50803_5553  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 33,33       | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2363 | GL50803_5638           | GL50803_5638  | NaN                          | 0          | 27,02         | 27,18            | 100,00      | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2390 | GL50803_5866           | GL50803_5866  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | 23,43            | 23,43 | 66,67  |
| 2403 | GL50803_5939           | GL50803_5939  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | 23,14            | 23,08 | 100,00 |
| 2410 | GL50803_6000           | GL50803_6000  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 33,33  |
| 2420 | GL50803_6084           | GL50803_6084  | NaN                          | NaN        | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2432 | GL50803_6199           | GL50803_6199  | NaN                          | NaN        | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2485 | GL50803_6619           | GL50803_6619  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 33,33       | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2487 | GL50803_6650           | GL50803_6650  | NaN                          | 0          |               | 22,29            | 22,29       | 66,67            | NaN   | 0,00   |
| 2492 | GL50803_6686           | GL50803_6686  | NaN                          | NaN        | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2510 | GL50803_6897           | GL50803_6897  | NaN                          | 0          |               | 21,57            | 21,57       | 66,67            | NaN   | 0,00   |
| 2512 | GL50803_6920           | GL50803_6920  | NaN                          | 0          | 26,73         | 26,73            | 66,67       | NaN              | NaN   | 0,00   |
| 2528 | GL50803_7124           | GL50803_7124  | NaN                          | 0          | NaN           | NaN              | 0,00        | NaN              | NaN   | 22,22  |

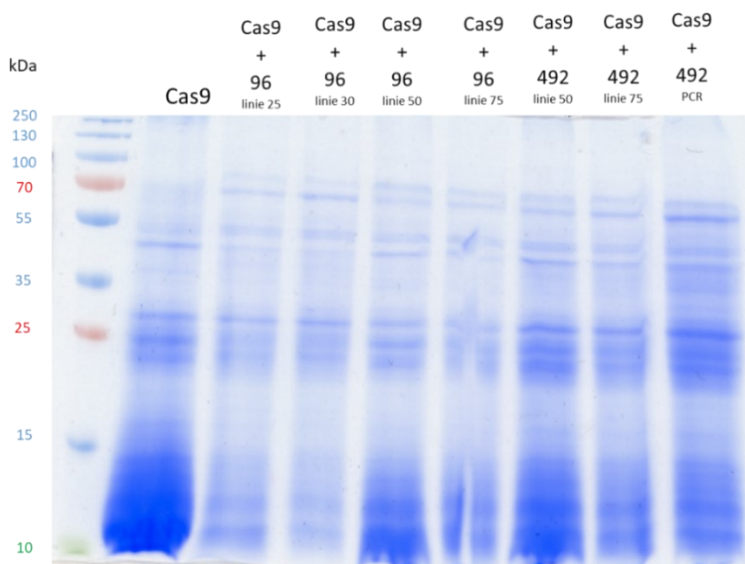
**Obrázek 58:** Tabulka výsledků hmotnostní spektrometrie (řádek pro CWP1 je vyznačen rámečkem). Sloupec E ukazuje na absenci proteinu v linii s knock-outem, sloupec G naopak přítomnost proteinu v kontrolní buněčné linii.

### 5.2.5 *cwp1* knock-out – opakování experimentu

Výše zmíněný experiment byl zopakován, tentokrát za použití pouze vektorů pTGuide se spacery 96 a 492. Pro transfekci byla použita plasmidová DNA v cirkulární podobě (celkem šest elektroporací pro oba spacery dohromady) a u tří dalších elektroporací byla transfekce provedena za přidání konstruktů v podobě PCR produktu získaného amplifikací vektoru pTGuide. Tento PCR produkt obsahoval obě homologní raménka, gen pro PAC a kazetu pro transkripci guideRNA. Následnou selekcí jsme získali sedm linií (z toho jedna vznikla elektroporací PCR produktu), ze kterých byla izolována genomová DNA a (po encystaci – 27 hodin) byl připraven buněčný lyzát. Genomová DNA byla testována na přítomnost genu *cwp1* a integraci konstruktů do genomu (Obr. 59). V lyzátech byl pomocí protilátky A300 detekován CWP1 (Obr. 59). Celkové množství proteinů ve vzorcích bylo vizualizováno barvivem Coomassie Brilliant Blue (Obr. 60). K integraci konstruktů do genomu došlo u všech testovaných linií včetně té, jež byla transfekována PCR produktem. U většiny z těchto linií nebyl detekován gen *cwp1* ani jeho produkt (Obr. 59). Opět se nám tedy podařilo vytvořit genový knock-out.



**Obrázek 59:** Testování integrace konstruktu do genomu, přítomnosti genu *cwp1* a přítomnosti CWP1 v buněčných lyzátech. CWP1 byl detekován pomocí primární protilátky A300. Vyvoláno HRP. Čísla 96 a 492 jsou označením spaceru, který byl přítomen na vektoru pTGuide v dané linii buněk. „492 PCR“ značí linii, která vznikla elektroporací PCR produktu vzniklého amplifikací části pTGuide. Označení linie, resp. jednotlivých zkumavek (25, 30, 50 a 75), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA).



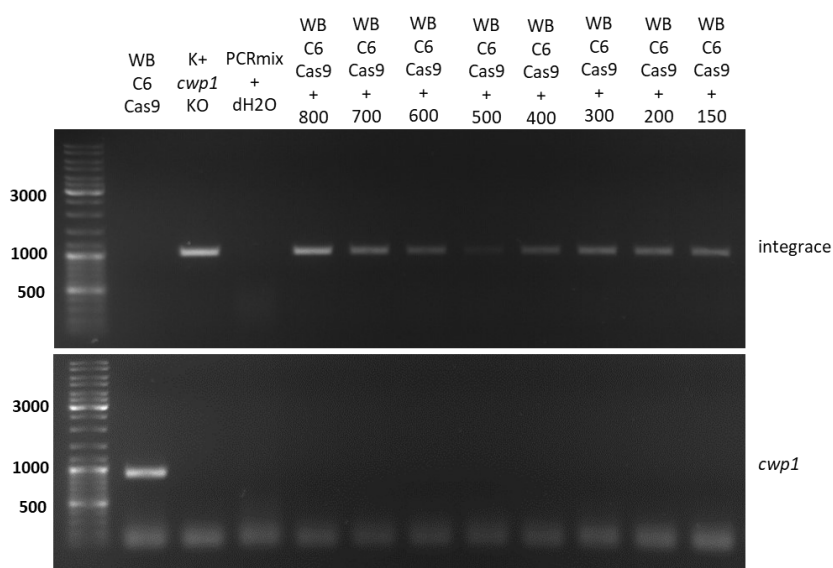
**Obrázek 60:** SDS PAGE gel odpovídající blotu na obrázku 59. Barveno Coomassie Brilliant Blue. Označení linie, resp. jednotlivých zkumavek (25, 30, 50 a 75), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu\text{g}$  DNA).

### 5.2.6 *cwp1* knock-out pomocí PCR produktu

Na základě výsledků předchozích experimentů jsme se rozhodli zjistit, jak dlouhá musí být homologní raménka konstruktů, aby došlo k integraci do genomu a zároveň k odstranění všech kopií genu *cwp1*. Proto byla část vektoru pTGuide zahrnující guideRNA kazetu, gen pro PAC a homologní raménka amplifikována tak, že bylo získáno několik PCR produktů s různou délkou homologních ramen (HA – homology arms). Tyto PCR produkty byly elektroporovány do buněk WB C6 selektovaných na přítomnost plasmidu pONDRAcas9 (tuto linii připravil, subklonoval a otestoval Mgr. Luboš Voleman, Ph.D.). Přítomnost genu *cwp1* a integrace konstruktů do genomu byly ověřeny pomocí PCR (výsledek pro některé z linií zachycuje Obr. 61). Výsledky všech experimentů shrnuje Tabulka 43 (jeden řádek odpovídá buňkám z jedné elektroporace, tj. z jedné elektroporační kyvety). S výjimkou konstruktů s cca 70 páry bazí dlouhými homologními rameny se nám podařilo elektroporací získat stabilní linii u konstruktů všech testovaných délek homologních ramen. Zároveň byla u všech těchto linií potvrzena integrace konstruktů do genomu. U většiny těchto linií byla potvrzena i absence genu *cwp1*. Knock-out a integrace byly potvrzeny i po transfekci velmi malým množstvím DNA (oproti standardně používanému množství při transfekci plasmidem 50 µg).

**Tabulka 43:** Výsledky všech elektroporací konstruktem v podobě PCR produktu. Pro každou elektroporaci je zde uvedeno, jak dlouhé homologní oblasti PCR produkt obsahoval (přesné hodnoty jsou však uvedeny v kapitole 4.3.4.2), jaké množství DNA bylo k buňkám přidáno, zda buňky utvořily souvislý nárůst (monolayer), zda došlo k integraci konstruktu do genomu a zda byly odstraněny všechny kopie genu *cwpI*.

| Délka HA ramen | množství DNA (μg) | Monolayer | Integrace | <i>cwpI</i> KO |
|----------------|-------------------|-----------|-----------|----------------|
| 50             | 31                | NE        | -         | -              |
| 50             | 33                | NE        | -         | -              |
| 50             | 31                | NE        | -         | -              |
| 50             | 56                | NE        | -         | -              |
| 50             | 79                | NE        | -         | -              |
| 50             | 99                | NE        | -         | -              |
| 150            | 30                | NE        | -         | -              |
| 150            | 31                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 150            | 27                | NE        | -         | -              |
| 200            | 31                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 200            | 34                | NE        | -         | -              |
| 200            | 59                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 300            | 29                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 300            | 34                | NE        | -         | -              |
| 300            | 57                | NE        | -         | -              |
| 400            | 29                | NE        | -         | -              |
| 400            | 28                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 400            | 54                | NE        | -         | -              |
| 500            | 7,4               | ANO       | ANO       | NE             |
| 500            | 3,4               | NE        | -         | -              |
| 500            | 9,3               | ANO       | ANO       | ANO            |
| 500            | 31                | NE        | -         | -              |
| 600            | 7,2               | ANO       | ANO       | ANO            |
| 600            | 7,8               | ANO       | ANO       | ANO            |
| 600            | 38                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 700            | 3,8               | NE        | -         | -              |
| 700            | 55                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 700            | 38                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 800            | 7,9               | ANO       | ANO       | ANO            |
| 800            | 41                | ANO       | ANO       | ANO            |
| 800            | 38                | ANO       | ANO       | NE             |
| 1000           | 4,1               | ANO       | ANO       | ANO            |



**Obrázek 61:** Test integrace konstruktů do genomu a detekce genu *cwp1* pomocí PCR

### 5.3 Oprava DSB u *G. intestinalis*

#### 5.3.1 Testování přítomnosti c-NHEJ dráhy u *G. intestinalis*

Abychom ověřili, že se u *G. intestinalis* nevyskytuje funkční c-NHEJ dráha (nebo jakýkoliv jiný reparační mechanismus schopný opravy dvouřetězcových zlomů způsobených Cas9 endonukleázou bez využití homologní rekombinace), navrhli jsme experiment využívající vektoru pONDRAcas9 a upraveného vektoru pTGuide, který neobsahoval homologní raménka (pTGuideNHEJ). Takový vektor totiž neumožňoval opravu štěpeného místa homologní rekombinací a integraci konstruktů na vektoru do genomu. Teoreticky by tak v buňkách mělo probíhat opakované štěpení a oprava z homologních chromozómů, které však také obsahují rozeznávané místo a byly by vzápětí naštěpeny. K přerušení tohoto cyklu mohlo dojít jen v případě nehomologní opravy pomocí NHEJ nebo jiných mechanismů reparace DNA, které vnášejí do opravovaného úseku DNA mutace. Vytvořený pTGuide proto obsahoval jen guideRNA kazetu (se spacerem 492) a gen pro puromycin-N-acetyl transferázu s příslušnými regulačními oblastmi. Získaný PCR produkt byl štěpen restrikcí enzymy MluI a PacI a byl vložen do prázdného vektoru pTGuide (též štěpeného MluI a PacI). Přítomnost insertu byla ověřena kontrolní restrikcí a sekvenací. Vzniklým vektorem nazvaným pTGuideNHEJ byly transfekovány buňky nesoucí plasmid pONDRAcas9. Po 9 dnech byly všechny buňky mrtvé (3 ze 3 elektroporací). Experiment byl opakován za stejných podmínek a po 8 dnech již nebyly ve zkumavkách nalezeny žádné živé buňky. Současně byla provedena kontrolní elektroporace tohoto plasmidu do WB buněk, které neobsahují Cas9. Všechny tři linie (ze tří elektroporací) přežily a po cca 10 dnech utvořily monolayer.

Z uvedených výsledků vyplývá, že transfekce vektorem pTGuideNHEJ je za přítomnosti Cas9 pro buňky toxická. To by mohlo být způsobeno destabilizací genomu vyvolanou činností Cas9

endonukleázy a neschopností buněk poškození DNA efektivně opravit. Jelikož v tomto případě nebyl v buňkách přítomen vhodný templát pro opravu zlomů homologní rekombinací, mohl by výsledek našeho experimentu ukazovat na absenci jiných opravných mechanismů např. NHEJ dráhy.

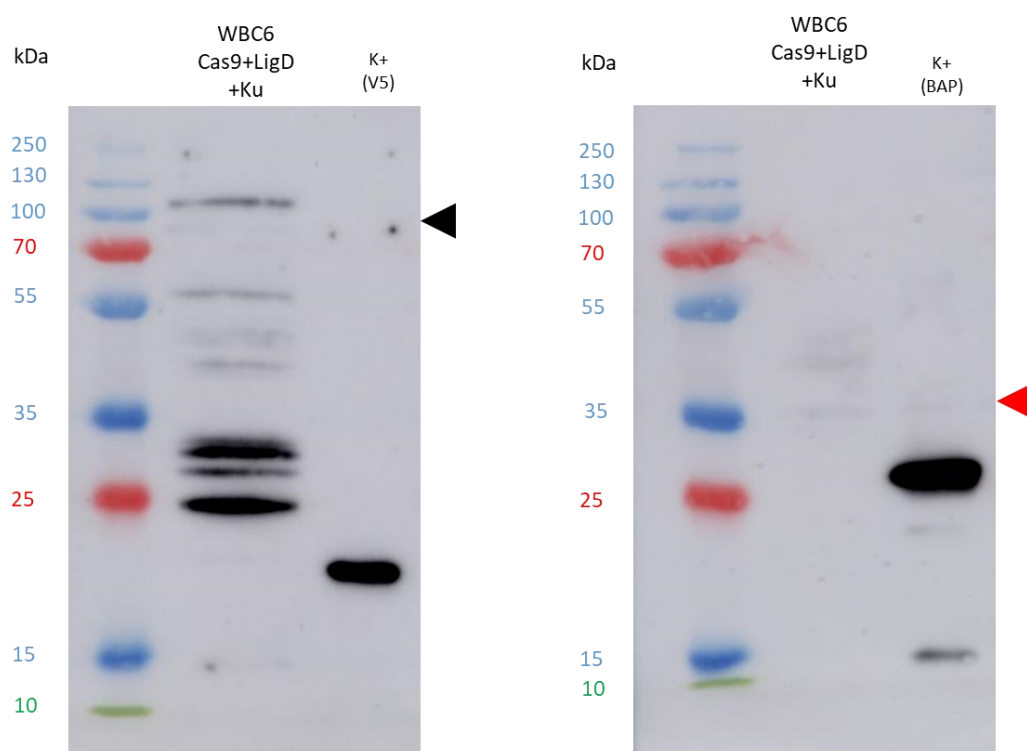
### 5.3.2 Zavedení komponent bakteriální NHEJ dráhy do buněk *G. intestinalis*

Della a kolektiv (2004) ukázali, že proteiny LigD a Ku z *Mycobacterium tuberculosis* stačí na rozeznání a opravu dvouřetězcových zlomů molekuly DNA mechanismem NHEJ, a dokonce je možné zavedením exprese těchto dvou proteinů do kvasinky s nefunkční NHEJ drahou funkcí této reparační dráhy obnovit. Na základě těchto poznatků jsme se rozhodli experimentálně vyvolat expresi těchto dvou proteinů NHEJ dráhy v buňkách *G. intestinalis*. Pro expresi těchto genů byl použit upravený vektor pTetRaII, do kterého byl místo genu pro TetR represor vložen gen pro Ku protein a místo genu pro NanoLuc luciferázu gen pro LigD. Vzniklý vektor nesl název „pTetRaII\_NHEJ“. Dalším plasmidem nutným pro tento experiment byl vektor pONDRAcas9 použitý již v předchozích experimentech. Poslední komponentou nutnou pro otestování funkce proteinů LigD a Ku byl vektor nesoucí guideRNA kazetu, ovšem bez homologních ramének, aby nedošlo k opravě homologní rekombinací (viz přechozí experiment). Vzhledem k tomu, že pTetRaII\_NHEJ nese gen pro resistenci proti puromycinu a pONDRAcas9 proti G418, bylo nutné, aby tento poslední vektor nesl resistenci proti blasticidinu. Toho bylo dosaženo tak, že byl z plasmidu pTGuideNHEJ vyštěpen gen pro resistenci proti puromycinu i s příslušnými UTR oblastmi a místo něj byl vložen insert obsahující gen pro resistenci proti blasticidinu (s příslušnými UTR oblastmi), který byl amplifikován z vektoru pUC57-mini\_T7RNAP\_V5. Sekvence byla ověřena sekvenací a výsledný vektor byl nazván „pTGuideNHEJblast“.

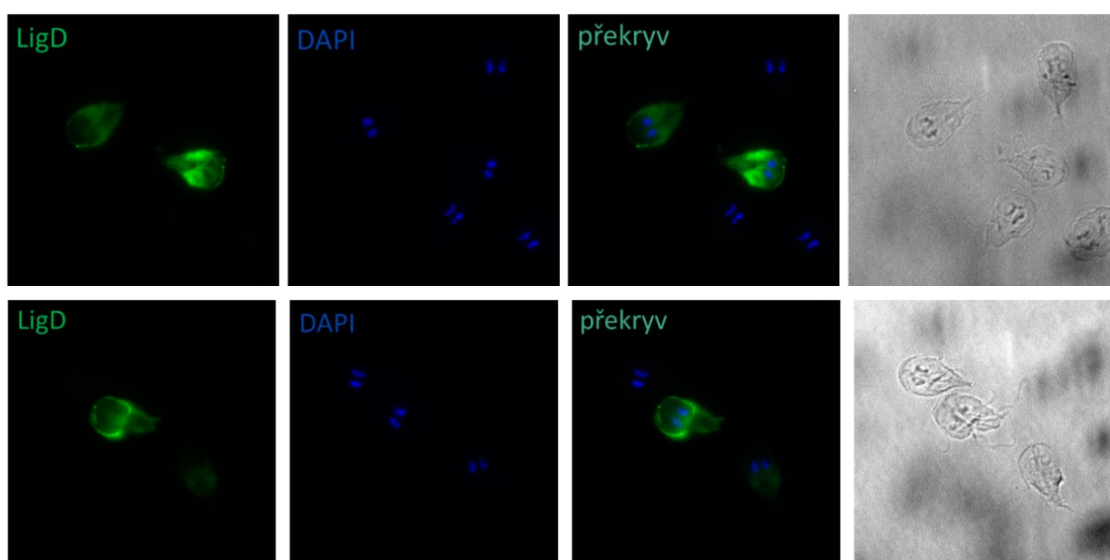
Nejprve byly buňky subklonované linie WB C6 nesoucí vektor pONDRAcas9 (viz předchozí experimenty) transfekovány plasmidem pTetRaII\_NHEJ. Z jediné linie, která po selekci antibiotiky vytvořila monolayer byl připraven buněčný lyzát, který byl otestován na přítomnost LigD s V5 tagem a Ku s BAP tagem (Obr. 62). Očekávaná molekulová hmotnost tagované LigD byla 89 kDa a na blotu skutečně slabý signál zhruba v této velikosti (mezi 70 a 100 kDa; vyznačeno černou šipkou na Obrázku 62) detekován byl. Dále byly pozorovány silné bandy odpovídající molekulovým hmotnostem mezi 25 až 35 kDa a poměrně výrazný band proteinu odpovídajícího molekulové hmotnosti 100–130 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost Ku proteinu byla ~37 kDa a na blotu byly pozorovány dva velice slabé bandy, jeden o velikosti zhruba 35 kDa (vyznačeno červenou šipkou na Obrázku 62) a druhý mezi 35 a 55 kDa.

Ze stejné linie byly připraveny preparáty pro fluorescenční mikroskopii. V rámci buňky se LigD nacházela prakticky všude, pouze v oblasti jader nebyl signál příliš silný. U mnoha buněk byla LigD pozorována na okraji přísavného disku (Obr. 63). Naopak Ku protein byl pozorován převážně v podobě jednoho až několika bodů nacházejících se v blízkosti jader (Obr. 63 a 64). U většiny buněk, u kterých byl pozorován signál jednoho z proteinů, byl pozorován i signál druhého. Podíl LigD- a Ku-pozitivních buněk v kultuře byl však relativně malý.

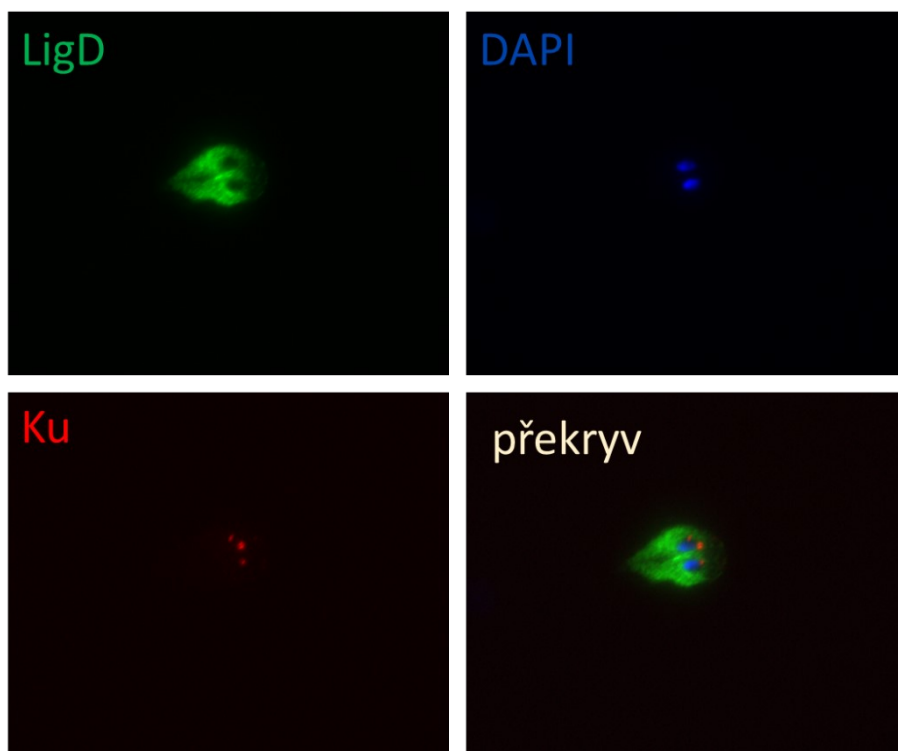
Pro detekci Ku proteinu byla na western blotu použita králičí  $\alpha$ -BAP protilátka, která se však při aplikaci na preparáty neosvědčila, neboť značila nespecificky celé buňky. Proto byla v případě preparátů použita  $\alpha$ -BAP protilátka z myši (Obr. 64 a 65).



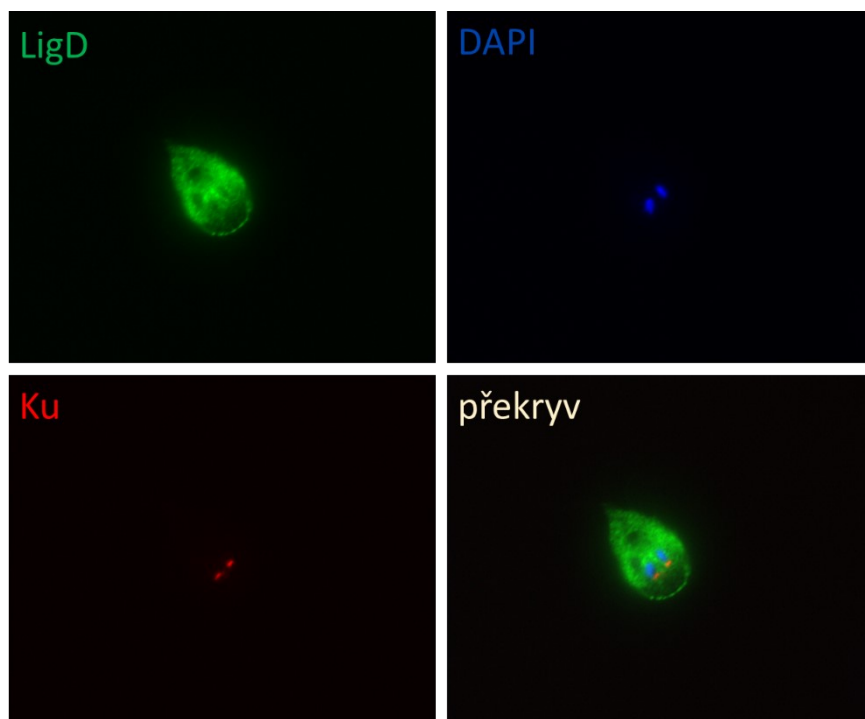
**Obrázek 62:** Na blotu vlevo byla detekována LigD pomocí králičí  $\alpha$ -V5 protilátky. Předpokládaná molekulová hmotnost tagovaného proteinu měla být 89 kDa (odpovídající band označen černou šipkou). Na blotu vpravo byl detekován Ku protein pomocí protilátky  $\alpha$ -BAP z králíka. Předpokládaná velikost tagovaného Ku proteinu byla 37 kDa (odpovídající band vyznačen červenou šipkou).



**Obrázek 63:** Lokalizace LigD v buňkách trofozoitů. Preparáty byly značeny protilátkou  $\alpha$ -V5 z králíka. Zeleně je zde vyznačena LigD, modře jádra (DAPI). Poslední snímek v obou řadách je snímek buněk pod diferenciálním kontrastem.



**Obrázek 64:** Kolokalizace LigD a Ku v buňkách trofozoitů. LigD byla značena protilátkou  $\alpha$ -V5 z králíka, Ku protilátkou  $\alpha$ -BAP z myši. Zeleně je zde vyznačena LigD, červeně Ku a modře jádra (DAPI).



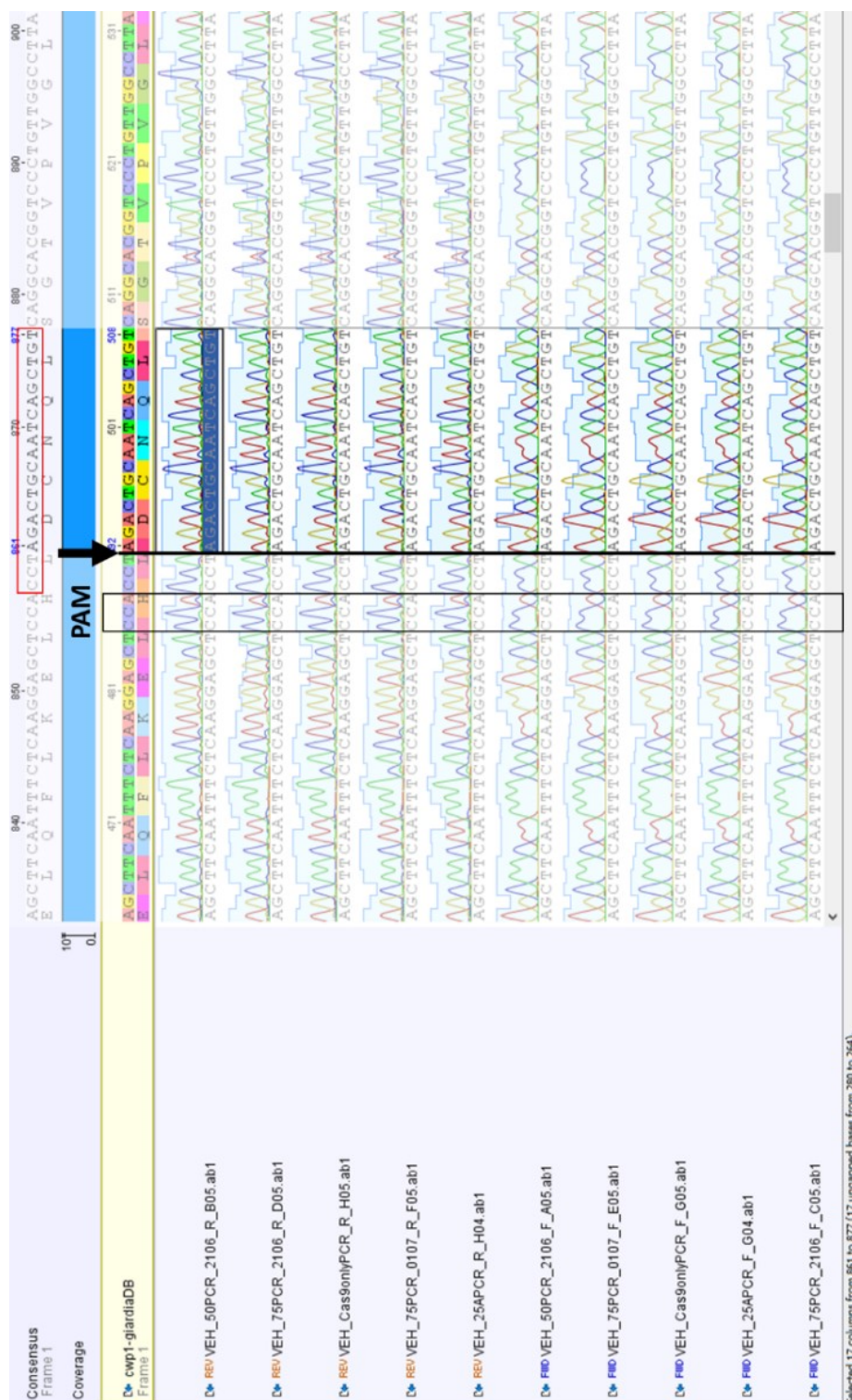
**Obrázek 65:** Kolokalizace LigD a Ku v buňkách trofozoitů. LigD byla značena protilátkou  $\alpha$ -V5 z králíka, Ku protilátkou  $\alpha$ -BAP z myši. Zeleně je zde vyznačena LigD, červeně Ku a modře jádra (DAPI).

Pokus o subklonování získané linie buněk se nezdařil, a proto byla přímo tato linie použita na další experimenty. Abychom zjistili, jak se buňky vykazující expresi Cas9, LigD a Ku budou chovat při vzniku dvouřetězcových zlomů na DNA, byl do těchto buněk elektroporován konstrukt pTGuideNHEJblast obsahující spacer 492. Pro kontrolu byl tento vektor elektroporován i do buněk WB C6 obsahujících pouze Cas9 (subklonovaná linie s vektorem pONDRAcas9), nikoliv však LigD ani Ku. Celkově bylo provedeno 12 elektroporací a jejich výsledek shrnuje Tabulka 44. Kontrolní buňky obsahující pouze endonukleázu Cas9 elektroporaci dle našeho očekávání nepřežily, na rozdíl od některých linií obsahujících kromě Cas9 i proteiny bakteriální NHEJ dráhy.

**Tabulka 44**

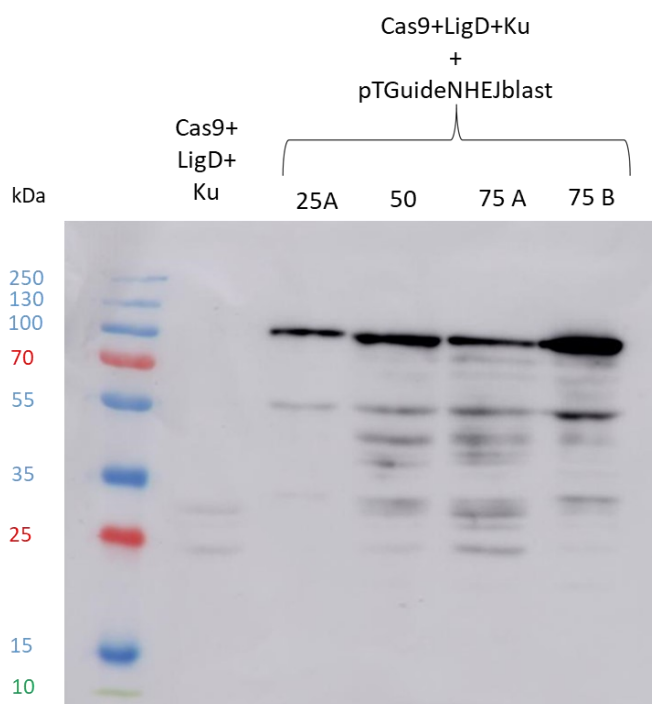
|                  | Linie buněk (číslo značí, kolik $\mu\text{g}$ plasmidu bylo použito při elektroporaci) | Přežily buňky elektroporaci a následnou selekci? |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Cas9             | 25                                                                                     | NE                                               |
|                  | 25                                                                                     | NE                                               |
|                  | 50                                                                                     | NE                                               |
|                  | 50                                                                                     | NE                                               |
|                  | 75                                                                                     | NE                                               |
|                  | 75                                                                                     | NE                                               |
| Cas9 + LigD + Ku | 25                                                                                     | ANO                                              |
|                  | 25                                                                                     | NE                                               |
|                  | 50                                                                                     | ANO                                              |
|                  | 50                                                                                     | NE                                               |
|                  | 75                                                                                     | ANO                                              |
|                  | 75                                                                                     | ANO                                              |

Z buněk, které po selekci narostly do monolayeru a bylo je možné kontinuálně kultivovat byla izolována genomová DNA. Získané vzorky genomové DNA byly použity jako templát pro PCR reakci, při které byla amplifikována oblast genu *cwpI*. Produkt reakce byl vizualizován na agarózové elektroforéze, přečištěn a odeslán na sekvenaci. Předpokládali jsme, že u rostoucích buněk došlo k opravě lokusu DNA bakteriálními komponentami NHEJ dráhy, a proto budou v této oblasti přítomné mutace. Srovnání lokusu, kde mělo dojít ke štěpení Cas9, u těchto linií a kontrolní linie buněk (na obrázku označené jako „Cas9only“) zachycuje Obrázek 66. Sekvence nezachytila v porovnání s kontrolními buňkami žádnou mutaci v předpokládaném místě štěpení a mutace nebyly pozorovány ani v jiných částech *cwpI* genu, které byly též sekvenovány.

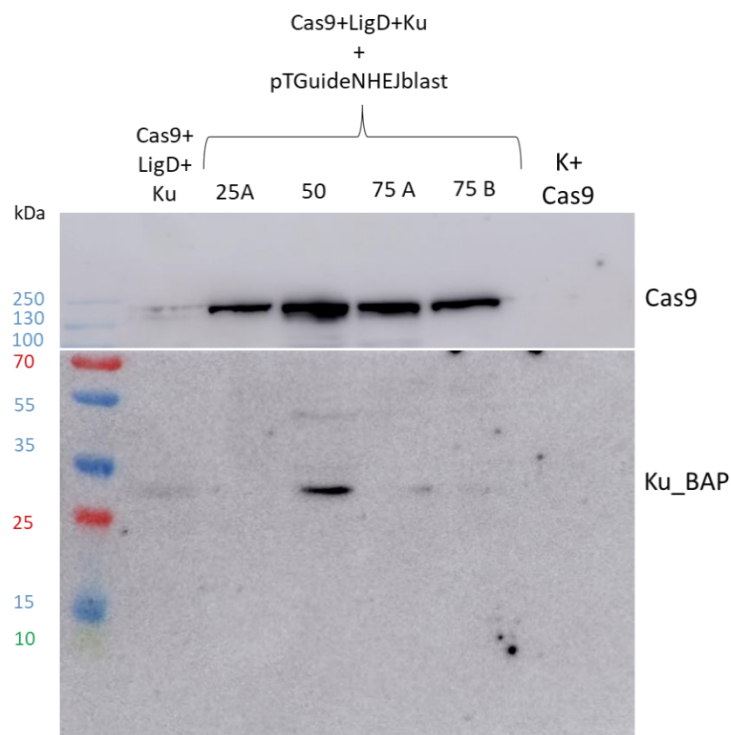


**Obrázek 66:** Alignment místa v rámci *cwp1* lokusu, kde mělo dojít ke štěpení Cas9 endonukleázou. Vytvořeno v programu Geneious. Červeným rámečkem je vyznačena sekvence spaceru 492, černá šipka značí místo štěpení Cas9 a černý rámeček PAM sekvenci. Sekvenovány byly PCR produkty získané ze čtyř linií, u kterých byla elektroporace vektorem pTGuideNHEJblast úspěšná (Tab. 44; lyzáty z těchto buněk jsou testovány na Obr. 67 a 68), a PCR produkt získaný amplifikací *cwp1* lokusu u linie bez tohoto vektoru („Cas9only“). Každý z produktů byl sekvenován pomocí dvou různých primerů (na obrázku odlišeny označením „REV“ a „FWD“).

Předpokládali jsme, že po předchozí selekci buněk, které jsou schopné opravit zlomy DNA pomocí nově zavedených proteinů NHEJ mašinerie, vzroste v populaci počet buněk, které budou vykazovat expresi těchto proteinů, a tedy vzroste i celkové množství LigD a Ku proteinů v kultuře a bude je tak možné lépe detekovat na blotu (oproti Obrázku 62). Proto byl ze všech linií připraven buněčný lyzát, který byl metodou imunoblotu testován na přítomnost proteinů značených V5 tagem (LigD; Obr. 67), respektive BAP tagem (Ku; Obr. 68). U stejných linií byla sledována i exprese Cas9 endonukleázy (Obr. 68).



**Obrázek 67:** Na blotu byla detekována LigD pomocí králičí  $\alpha$ -V5 protilátky. První vzorek („Cas9+LigD+Ku“) představuje lyzát použitý i na blotu na Obrázku 62, tedy lyzát z buněk před elektroporací vektorem pTGuideNHEJblast. Všechny lyzáty byly připraveny z plně narostlé kultury a bylo jich na gel naneseno stejné množství, aby bylo možné srovnat množství detekovaného LigD před elektroporací a po ní. Označení jednotlivých linií (např. „50“) odpovídají množství (v  $\mu$ g DNA) plasmidu použitého při elektroporaci, přičemž stejné množství bylo vždy použito dvakrát (Tab. 44), proto byly tyto dva pokusy označeny písmeny („75A“ a „75B“).



**Obrázek 68:** Na blotu byla detekována Ku pomocí  $\alpha$ -BAP protilátky z myši a Cas9 pomocí  $\alpha$ -HA protilátky z krysy. Označení elektroporací získaných linií, resp. jednotlivých zkumavek („25“, „50“ a „75“), odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v  $\mu$ g DNA).

Selekcí buněk schopných přežít elektroporaci vektorem pTGuideNHEJblast skutečně došlo k nárůstu množství proteinů LigD i Ku v kultuře, což by mohlo svědčit o pozitivním vlivu těchto proteinů na přežití buněk při vzniku dvouřetězcových zlomů. Na druhou stranu jsme u získaných buněčných linií při sekvenaci lokusu *cwp1* nezjistili žádnou mutaci, která by mohla svědčit o opravě zlomu DNA nehomologním spojováním konců zlomu.

### 5.3.3 Inhibice NHEJ dráhy pomocí Scr7

Abychom ověřili, že přítomnost proteinů LigD a Ku je rozhodujícím faktorem, který umožňuje buňkám přežít transfekci vektorem pTGuideNHEJblast, transfekovali jsme znovu tímto plasmidem buňky selektované na přítomnost vektoru pONDRAcas9 a pTetRaII\_NHEJ ovšem tentokrát za přítomnosti inhibitoru DNA ligázy IV Scr7 (Srivastava et al., 2012), o kterém jsme se domnívali, že by mohl inhibovat i ligázu LigD.

Před samotným experimentem jsme na základě článku Lin a kolektivu (2019) vybrali několik různých koncentrací Scr7 (6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M, 26 $\mu$ M, 48 $\mu$ M), u kterých jsme testovali jejich vliv na růst buněk. Inhibitor byl k buňkám WBC6 Cas9 (vektor pONDRAcas9) dodáván ve formě roztoku v DMSO. Abychom ověřili, že na buňky nemá tak velké množství DMSO negativní dopad, byly použity kontrolní buňky, ke kterým byl přidáván stejný objem DMSO, jako byl objem roztoku Scr7 u první skupiny buněk. Do všech zkumavek byl přidán stejný objem inokula příslušné plně narostlé buněčné kultury. Kontrola buněk byla provedena po 24 hodinách, kdy byl pozorován

téměř souvislý nárůst, jak u buněk se Scr7, tak u buněk kontrolních. Po třech dnech utvořily monolayer všechny buňky, pouze u buněk s nejvyšší koncentrací Scr7 a příslušných kontrolních buněk s DMSO byl nárůst neúplný. Další den však už byl souvislý nárůst na stěnách zkušavky pozorován u všech sledovaných buněk.

Test vlivu Scr7 na buňky při elektroporaci vektorem pTGuideNHEJblast byl proveden následujícím způsobem. V rámci přípravy buněk na elektroporaci byl do dvou 50ml kultivačních lahví s čerstvým médiem TYI-S-33 přenesen stejný objem plně narostlé kultury buněk WB C6 linie selektované na přítomnost vektorů pONDRACas9 a pTetRaII\_NHEJ (linie testovaná na Obrázku 62). Do jedné z lahví byl přidán Scr7 (50  $\mu$ M). Kromě přítomnosti Scr7 byly buňky v obou lahvích kultivovány za stejných podmínek (stejný objem přidaného inokula, stejný celkový objem média v lahvi, stejné množství antibiotik). Dále byla připravena třetí kultivační lahev, do které bylo přidáno inokulum plně narostlé kultury buněk kontrolních (WB C6 s vektorem pONDRACas9). Objem média i přidaného inokula byl stejný jako u předchozích dvou lahví. Po dvou dnech (v den elektroporace) buňky tvořily kontinuální nárůst na stěnách nádoby. Buňky z každé lahve byly elektroporovány 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g a 75 $\mu$ g vektoru pTGuideNHEJblast. Po elektroporaci byla k buňkám přidána selekční antibiotika, případně Scr7 (50  $\mu$ M; pouze k buňkám kultivovaným s inhibítorem i před elektroporací). Zkušavky s elektroporovanými buňkami byly pravidelně sledovány a v případě, že v nich bylo pozorováno dostatečné množství buněk, bylo těmto buňkám vyměněno médium (se selekčními antibiotiky). Sledování růstu buněk probíhalo celkem 42 dní po elektroporaci a jeho výsledky jsou znázorněny na Obrázku 69. U buněk kultivovaných v přítomnosti Scr7 bylo médium měněno za čerstvé (s obsahem antibiotik a Scr7) pouze jednou, a to druhý den po elektroporaci, poté byly buňky pozorovány pouze ojedinelé a při další kontrole nebyly nalezeny žádné. Jediná linie, která nakonec utvořila monolayer byla linie buněk Cas9+LigD+Ku „25“. U linie „50“ Cas9 buněk byl vždy po několika dnech po výměně média pozorován nárůst, nikdy však nedošlo ke zformování souvislého monolayeru na stěnách zkušavky. Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že by Scr7 skutečně mohl inhibovat aktivitu nově zavedených proteinů NHEJ dráhy při opravě dvouřetězcových zlomů vyvolaných endonukleázou Cas9.

|                   | linie/dny | 2. | 6. | 10. | 14. | 19. | 23. | 26. | 28. | 35. | 37. | 42. |
|-------------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cas9              | 25        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 50        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 75        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cas9+ LigD+Ku     | 25        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 50        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 75        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cas9+LigD+Ku+Scr7 | 25        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 50        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|                   | 75        |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

| Legenda              |  |
|----------------------|--|
| monolayer            |  |
| nárůst (ne souvislý) |  |
| pár buněk            |  |
| žádné buňky          |  |

**Obrázek 69:** Průběh experimentu s inhibítoru Scr7. Tabulka znázorňuje stav buněčné kultury po provedení elektroporace buněk konstruktem pTGuideNHEJblast při kontrolách prováděných pozorováním kultury invertovaným mikroskopem po dobu čtyřiceti dvou dní po elektroporaci. Elektroporace byla provedena u linie buněk: a) selektované na přítomnost vektoru pONDRACas9 (v tabulce označena jako „Cas9“), b) selektované na na přítomnost vektorů pONDRACas9 a pTetRaiI\_NHEJ (v tabulce označena jako „Cas9+LigD+Ku“) a c) selektované na na přítomnost vektorů pONDRACas9 a pTetRaiI\_NHEJ a zároveň (před elektroporací i po ní) inkubované se Scr7 (v tabulce označeno jako „Cas9+LigD+Ku+Scr7“). Označení elektroporací získaných linií, resp. jednotlivých zkumavek („25“, „50“ a „75“, odpovídá množství plasmidu, které bylo při elektroporaci k buňkám přidáno (v µg DNA). Plný nárůst kultury druhý den po elektroporaci stejně jako prudký pokles počtu buněk v kultuře ve dnech následujících jsou jevy zcela běžné i při úspěšných elektroporacích, neboť až druhý den po elektroporaci je k buňkám přidáno selekční antibiotikum.

## 6 Diskuse

### 6.1 Inducibilní expresní systém u *G. intestinalis*

V rámci této práce byly vytvořeny konstrukty pro inducibilní expresi genů v buňkách *G. intestinalis*. Regulace exprese byla umožněna vložením sekvence operátorů *tetO* mezi gen zájmu a jeho promotor a zároveň expresí represoru TetR, jehož gen se nacházel na stejném plasmidu jako gen zájmu. Represor měl v nepřítomnosti tetracyklinu svou vazbou na sekvenci operátoru bránit transkripci, jež měla být obnovena přidáním zmíněného antibiotika. Byl testován konstrukt obsahující regulační oblast složenou z T7 promotoru a dvou operátorů *tetO* v kombinaci se dvěma verzemi represoru TetR (s jadernou lokalizační sekvencí a bez ní) a dvěma verzemi T7 RNA polymerázy (lišícími se též přítomností jaderné lokalizační sekvence). Funkce tohoto konstruktů byla testována na třech různých genech (*g-6-pi*, *momp35* a *bak1*), přičemž inducibilní exprese byla pozorována pouze u jednoho z nich. Dále byla testována exprese luciferázy NanoLuc v rámci konstruktů obsahujících regulační oblast složenou z promotoru genu *oct* a různého počtu operátorů *tetO* (jeden, tři a pět operátorů). Exprese reportérového genu bylo v tomto případě dosaženo, nicméně nešlo o expresi inducibilní.

Při vytváření vektoru pro inducibilní expresi jsme vycházeli z výsledků Sun a Tai (2000), kteří testovali vliv polohy operátorů *tetO* v rámci promotoru a počtu těchto operátorů na expresi reportérového genu, a práce Sun a kolektivu (2005), ve které autoři sledovali vliv různých variant TetR represoru na inducibilní expresi reportérového genu. Na základě těchto prací jsme se rozhodli použít dva operátory, které jsme v rámci našeho vektoru umístili mezi promotor a gen zájmu. Oproti zmíněné studii, ve které byla pro inducibilní expresi použita promotorová oblast genu *ran*, jsme však zvolili fágový T7 promotor, který je na rozdíl od regulačních oblastí u *G. intestinalis* dobře charakterizován a spolu s příslušnou T7 RNA polymerázou, s níž specificky interaguje, se využívá například u trypanosomatid (Wen et al., 2001; Wickstead et al., 2002; Yao et al., 2007; Kraeva et al., 2014). Gen pro tuto RNA polymerázu byl v rámci našich experimentů umístěn na jiném plasmidu než sledovaný gen s T7 promotorem. Navržený systém pro inducibilní expresi tak vyžadoval transfekci buněk dvěma vektory. Jak jsme ovšem zjistili, k inducibilní expresi genu zájmu pod T7 promotorem se dvěma operátory docházelo i v nepřítomnosti T7 RNA polymerázy. Tento efekt byl pozorován i při testování exprese genu *oct* pod T7 promotorem bez operátorů *tetO*. Vysvětlením tohoto jevu by mohla být buď schopnost endogenní RNA polymerázy rozeznat T7 promotor či existence sekvence rozeznávané endogenní RNA polymerázou jinde v rámci použitého vektoru, ať už v části nacházející se upstream od T7 promotoru či přímo v sekvenci sledovaného genu. Tuto hypotézu podpořil konkrétně u genu *g-6-pi* výsledek 5'RACE, díky níž se podařilo detekovat transkript, jehož začátek byl oproti genomové sekvenci zkrácen o zhruba prvních sto párů bazí. Domníváme se tedy, že by takto posunutý počátek transkripce mohl být důsledkem výskytu promotorové sekvence uvnitř úseku počátečního sta párů bazí tohoto genu. Nutno však podotknout, že tento efekt byl pozorován pouze u vektoru pTetR obsahujícího T7 promotor, dva operátory *tetO* a gen *g-6-pi* s přilehlou 3'UTR oblastí tohoto genu. Při testování exprese *g-6-pi* v rámci konstruktů obsahujícího

T7 promotor bez operátorů a jinou 3'UTR oblast (šlo o plasmid pTG), nebyla totiž exprese tohoto proteinu pozorována vůbec, a to ani v přítomnosti T7 RNA polymerázy.

Co se týče srovnání různých podmínek indukce exprese, byly testovány následující verze systému pro inducibilní expresi:

- a) za přítomnosti T7RNAP (vektor pUC57-mini\_T7RNAP\_V5)
- b) za přítomností jaderně lokalizované T7RNAP (vektor pONDRA\_T7RNAP\_V5\_2340NLS)
- c) bez přítomnosti T7RNAP

A dále dvě varianty represoru TetR:

- a) represor TetR bez jaderné lokalizační sekvence (vektor pTetR)
- b) represor TetR s jadernou lokalizační sekvencí velkého T antigenu viru SV40 na N-terminu (vektor pTetR(SV40NLS))

Z výsledků uvedených v rámci této práce lze vyvodit následující závěry. K expresi *g-6-pi* s HA tagem na vektoru pTetR (resp. pTetR(SV40NLS)) dochází za všech uvedených podmínek, i pokud není přítomna T7 RNA polymeráza, nicméně za přítomnosti T7RNAP je následně detekované množství proteinu v lyzátu větší a nejsilnější exprese bylo dosaženo za použití jaderně lokalizované T7RNAP. Za všech zmíněných podmínek byla exprese G-6-PI pozorována i před přidáním tetracyklinu. Indukce exprese u buněk s jadernou T7RNAP a TetR represorem s jadernou lokalizační sekvencí měla na tyto buňky výrazně negativní efekt. Z tohoto důvodu jsme nemohli potvrdit, že by přidání jaderné lokalizační sekvence na N-terminus represoru TetR výrazněji zlepšilo indukční poměr, jak uvádí ve své práci Sun a kolektiv (2005). Dále je třeba dodat, že přesné množství sledovaného proteinu nebylo v buněčných lyzátech stanoveno a na základě získaných (a v některých případech nekvalitně provedených) western blotů není možné srovnat množství proteinu ze všech experimentů a jednoznačně určit, která kombinace podmínek exprese je nejlepší, tedy poskytuje co nejslabší expresi před indukcí a co nejsilnější po indukcí.

Na základě našich výsledků jsou optimálními koncentracemi tetracyklinu pro co nejsilnější expresi zkoumaného proteinu 1 až 5 µg/ml. Obdobné hodnoty optimální koncentrace tetracyklinu pro indukcí zjistili Sun a Tai (2000), kteří testovali u *G. intestinalis* inducibilní expresní systém založený na *ran* promotoru a dvou *tetO* operátorech. V tomto případě dosáhli autoři maximální intenzity exprese (resp. aktivity produktu reportérového genu) při 10 µg/ml (Sun&Tai, 2000).

Z výsledku experimentu v rámci této práce je zřejmé, že s dále rostoucí koncentrací tetracyklinu (10, 20 a 30 µg/ml) došlo ve vzorcích k úbytku množství sledovaného proteinu. Tento jev však Sun a Tai (2000) nezaznamenali.

Jelikož se nám podařilo dosáhnout inducibilní exprese *g-6-pi*, rozhodli jsme se použít stejný vektor (pTetR) i pro inducibilní expresi dalších genů, abychom ověřili, že je námi vytvořený systém univerzálně použitelný. Při testování exprese zkrácené verze genu *momp35* (v textu označované jako *momp270*) jsme pozorovali pouze velmi slabý signál proteinu předpokládané velikosti, avšak pozorovali jsme silnější signál proteinu zhruba dvojnásobné molekulové

hmotnosti. Protein stejné velikosti byl pozorován i poté, co byl gen *momp270* spojen s částí genu *g-6-pi*, o které jsme se domnívali, že obsahuje promotorovou oblast. Ani v jednom případě se však nejednalo o inducibilní expresi. V případě genu pro Bak1 se nám nepodařilo detekovat expresi vůbec, což mohlo být způsobeno tím, že tento gen pocházel z *H. sapiens* a nebyl optimalizován pro expresi v buňkách *G. intestinalis*.

Při vytváření dalšího konstruktů pro inducibilní expresi genů u *G. intestinalis* jsme se rozhodli použít místo T7 promotoru endogenní promotor genu *oct*. Tak vznikl vektor pTetRaII, který obsahoval dvě 5'UTR oblasti genu *oct* – jedna měla umožnit expresi reportérového genu NanoLuc a druhá genu pro represor TetR. Pomocí tohoto vektoru jsme chtěli zjistit, jaký je optimální počet *tetO* operátorů pro inducibilní expresi, přičemž jsme vytvořili a testovali tři různé verze plasmidu – verzi s jedním, třemi a pěti operátory. Na základě výsledků experimentů Sun a Tai (2000), ve kterých byly testovány různé počty operátorů (1–3 operátory) umístěných v rámci promotoru *ran*, jsme očekávali, že s rostoucím počtem operátorů bude zejména v neindukovaném stavu klesat množství produktu reportérového genu. Tento jev jsme ovšem nepozorovali. Největší množství proteinu NanoLuc bylo pozorováno u linie s jedním operátorem. U linie s pěti operátory byl protein správné velikosti též detekován, nicméně signál byl v tomto případě slabý. U linie se třemi operátory nebyla exprese sledovaného proteinu pozorována vůbec, což zřejmě svědčí o tom, že by při regulaci exprese v tomto konkrétním případě mohl hrát roli nejen počet operátorových sekvencí, ale i další faktory (například poloha regulačních elementů). Ani v jednom z případů, kdy byla exprese NanoLuc pozorována, nešlo o expresi inducibilní, neboť bylo detekováno zhruba stejné množství produktu u buněk před indukci tetracyklinem jako u buněk po indukci. To mohlo být způsobeno tím, že promotor genu *oct* je velice silným promotorem, který není pravděpodobně možné regulovat pouhým vložením operátoru mezi něj a gen zájmu.

Výsledky našich experimentů především potvrzují skutečnost, že regulace exprese genů u *G. intestinalis* není dosud dostatečně prozkoumána. Svědčí o tom například srovnání exprese genu *g-6-pi* pod T7 promotorem s operátory *tetO* (kdy k expresi docházelo) a T7 promotorem bez operátorů (kdy sledovaný protein nebyl detekován vůbec).

Ačkoliv jsme dosáhli inducibilní exprese jednoho vybraného genu, vytvořit plasmid, který by mohl podobně jako vektor vytvořený Sun a Tai (2000), sloužit univerzálně k expresi různých genů pod T7 promotorem se nám nepodařilo.

Výrazným nedostatkem u prvotního testování aktivity T7 RNA polymerázy (u konstruktů bez operátorů *tetO*) byla skutečnost, že u buněk selektovaných na přítomnost vektoru pTG (s genem *oct* či *g-6-pi*) a vektoru pUC57-mini (s genem pro T7RNAP) nebyla po elektroporaci druhým zmíněným vektorem ověřena exprese T7 RNA polymerázy, a tedy není známo, zda byla v buňkách skutečně přítomna.

Dále jsme ani v jednom z experimentů nemohli potvrdit přítomnost klíčové komponenty systému, a sice represoru TetR. Konstrukty byly záměrně navrženy tak, aby výsledný represor neobsahoval tag, neboť jsme předpokládali, že by mohl interferovat se správnou funkcí represoru. Původně jsme počítali s detekcí pomocí komerčně dostupné protilátky proti tomuto represoru, tu jsme však

s ohledem na výsledky experimentů nakonec nepořídili.

Pro další experimenty s využitím T7 RNA polymerázy u *G. intestinalis* by bylo vhodné zjistit, zdali je T7 promotor skutečně rozeznáván endogenní RNA polymerázou a také, zda T7 RNA polymeráza nerozeznává motiv T7 promotoru i jinde v rámci genomu. Pro srovnávání vlastností jednotlivých verzí expresních systémů a různých podmínek indukce exprese by bylo vhodné měřit přímo množství reportérového proteinu, případně jeho aktivitu, stejně jako tomu bylo i v případě studie Sun a Tai (2000).

## 6.2 Knock-out genu *cwp1*

V rámci této práce byl vytvořen knock-out genu *cwp1* pomocí technologie CRISPR-Cas9. U získané linie *G. intestinalis* byla potvrzena absence proteinu CWP1 pomocí western blotu i hmotnostní spektrometrie. Absence samotného genu byla ověřena pomocí PCR. Pro účely tvorby knock-outu byly sestaveny a použity dva vektory – vektor pro expresi jaderně lokalizované endonukleázy Cas9 a vektor obsahující kazetu pro syntézu guideRNA určený k integraci do lokusu *cwp1*. Konstrukt určený k integraci do genomu byl do buněk dopravován jak v podobě cirkulárního plasmidu, tak v podobě PCR produktu, přičemž oba způsoby byly stejně efektivní, co se týče odstranění kopií genu *cwp1*. Součástí konstruktů určených k integraci do genomu byla takzvaná homologní raménka – sekvence, které měly umožnit vložení guideRNA kazety spolu se selekčním markerem do genomu mechanismem homologní rekombinace. Byly testovány různé délky těchto homologních ramének od zhruba 70 párů bazí až po 1000 párů bazí. Nejkratší raménka, se kterými bylo možné dosáhnout integrace do genomu a knock-outu genu *cwp1* byla dlouhá 133 a 150 párů bazí.

Jediným genem, jehož úplný knock-out je u *G. intestinalis* v současné době znám, je *cwp1* (GL50803\_5638). Ebner a kolektiv (2016) jej vytvořili za použití Cre/loxP technologie postupným odstraněním všech kopií genu. Autoři tohoto výsledku dosáhli sérií transfekcí a následných selekcí. Naším cílem bylo vytvořit nástroj, který by umožnil vytvořit *cwp1* knock-out pomocí CRISPR-Cas9 systému a zároveň mohl být potenciálně snadno přizpůsoben pro generování knock-out linií dalších genů. K odstranění všech kopií genu měla stačit jediná transfekce buněk s Cas9 endonukleázou, neboť námi navržený konstrukt měl být postupně samovolně integrován místo všech kopií genu. Proces integrace měl být poháněn selekcí na přítomnost vektoru pTGuide, který nese konstrukt pro transkripci guideRNA a má být integrován do genomu, a aktivitou Cas9 endonukleázy, která za přítomnosti guideRNA kódované na zmíněném vektoru, vytváří zlomy v námi určené části genu. Tento mechanismus postupného rozšíření selektovaného konstruktů na místo všech kopií vybraného genu se označuje jako „gene drive“ a využívá se i u jiných organismů (Gantz et al., 2015; Shapiro et al., 2018). Pro sestavení obou použitých vektorů byl použit plasmid Cas9U6g1pac, který obsahoval kazetu pro syntézu guideRNA, selekční marker i gen pro Cas9 s příslušnými UTR oblastmi (McInally et al., 2019). Tyto klíčové složky systému jsme při klonování amplifikovali a vložili do dvou různých plasmidů. Tak vznikl vektor pONDRAcas9 obsahující gen pro Cas9 s UTR oblastmi, kterým bylo možné

transfekovat buňky za vzniku linie, jež mohla být následně univerzálně použitelná pro vytváření knock-outu různých genů (v závislosti na přidané guideRNA). Druhý vektor, pTGuide, obsahující selekční marker, kazetu pro syntézu guideRNA a homologní raménka byl sice pro účely této práce primárně navržen pro integraci do lokusu *cwp1*, nicméně jeho úpravou – vložením jiných homologních ramének a libovolné spacer sekvence – by bylo možné cílit i na jiné geny.

Po transfekci oběma zmíněnými plasmidy a následné selekci byla ze získaných buněčných linií izolována genomová DNA, která byla použita jako templát PCR reakce. Pro zjištění přítomnosti genu *cwp1* byly do reakce přidány primery pro amplifikaci tohoto genu. Integrace konstruktů do genomu byla ověřena pomocí dvojice primerů, z nichž první byl komplementární k sekvenci přítomné pouze na chromozomu *G. intestinalis* upstream od samotného genu *cwp1*. Druhý primer byl komplementární k sekvenci vyskytující se v rámci konstruktů na plasmidu pTGuide. Poskytl-li PCR reakce za použití těchto primerů produkt předpokládané velikosti, byl konstrukt považován za integrovaný do genomu. Další test spočíval v detekci proteinu CWP1 v buněčném lyzátu. Jelikož ke zvýšené expresi tohoto proteinu dochází při encystaci, byly buňky nejprve encystovány a teprve poté z nich byl připraven lyzát, který byl testován metodou imunoblotu za použití specifické komerční protilátky A300. U linií, u kterých byl potvrzen genový knock-out pomocí PCR, nebyl po vyvolání blotu patrný žádný signál. Z buněk byly též připraveny preparáty pro fluorescenční mikroskopii, při které byl však v některých encystujících buňkách pomocí stejné protilátky detekován silný signál v oblasti stěny cyst a ESV váčků. Na základě opakovaně potvrzené absence příslušného genu v genomu testovaných buněk, však přítomnost produktu tohoto genu nebyla možná. Vysvětlení tohoto jevu pravděpodobně tkví ve vlastnostech použité protilátky A300. Tato protilátka je součástí kitu Giardia-a-Glo Comprehensive Kit (Waterborne) a v naší laboratoři se rutinně používá pro detekci CWP1 metodou western blotu. Jak bylo ukázáno i na blotech v rámci této práce, tato protilátka skutečně značí protein o molekulové hmotnosti odpovídající CWP1. Ovšem dle informací poskytnutých výrobcem slouží protilátka k detekci epitopů vnější stěny cysty *G. intestinalis*, nikoliv výhradně CWP1, a je tedy možné, že ač na blotu detekuje protilátka CWP1, na preparátech značí i jiné složky cystové stěny. Absence proteinu CWP1 byla nakonec u jedné z linií potvrzena hmotnostní spektrometrií.

Délka homologních ramének v rámci konstruktů na plasmidu pTGuide byla zhruba 1000 párů bazí. Tato délka byla zvolena na základě článku Ebnera a kolektivu (2016). Po úspěšném vytvoření knock-out linie za pomoci takto dlouhých homologních ramen jsme se rozhodli zjistit, zda by bylo možné stejného výsledku dosáhnout i prostřednictvím kratších homologních oblastí, jelikož u jiných organismů pro integraci stačí i kratší homologní úseky (Shapiro et al., 2018). Proto bylo amplifikační části původního vektoru pTGuide vytvořeno devět dalších konstruktů s různými délkami homologních ramen, přičemž délky 5'UTR a 3'UTR oblastí byly voleny tak, aby v rámci jednoho konstruktů byly zhruba stejné. Těmito konstrukty v podobě PCR produktu byly transfekovány buňky *G. intestinalis* s endonukleázou Cas9 a získané linie byly testovány na přítomnost genu *cwp1* a integraci konstruktů do genomu. Nejkratšími homologními úseky, se kterými bylo ještě možné docílit integrace do genomu a knock-outu genu *cwp1* byla homologní raménka o délce 150 párů bazí (konkrétně 5'UTR o délce 133 bp a 3'UTR o délce 150 bp).

Jediným testovaným konstruktem, který po elektroporaci do buněk nedal vzniknout žádné stabilní linii, a tudíž nemohl být testován na přítomnost integrace a *cwpI*, byl konstrukt s délkou homologních ramen 88 párů bází (délka 5'UTR oblasti) a 67 párů bází (délka 3'UTR oblasti).

Výhoda kratších homologních ramének spočívá v tom, že čím kratší homologní sekvence je do vektoru pTGuide vkládána, tím menší je riziko, že se v rámci této sekvence bude nacházet restrikční místo, ve kterém bude nutné plasmid štěpit na jiném místě při vkládání jednotlivých homologních oblastí či spaceru do kazety pro syntézu guideRNA. Pokud by navíc pro integraci stačila homologní raménka kratší než cca 120 párů bází a bylo je tak možné nechat nasyntetizovat ve formě primerů, nebylo by pak již vůbec nutné do vektoru pTGuide vybrané homologní sekvence klonovat – stačilo by pomocí PCR a zmíněných primerů amplifikovat kazetu s guideRNA a selekční marker z původního plasmidu a výsledným PCR produktem přímo transfekovat buňky.

Jedním z nedostatků vektoru pTGuide je skutečnost, že obsahuje restrikční místo pro enzym ClaI, v němž je třeba plasmid rozštěpit při výměně jednoho z homologních ramének, což by bylo nutné, pokud by měl být vektor použit při tvorbě knock-outu jiného genu. Toto restrikční místo (ATCGAT) se totiž v rámci vektoru pTGuide nachází hned vedle báze cytosinu a společně tak vytvářejí GATC motiv, který je na pozici adeninu v buňkách *E. coli* metylován Dam (DNA adenin methylase) metylázou (Geier&Modrich, 1979). Metylase v tomto místě dle výrobce enzymu ClaI (New England BioLabs) způsobí, že zde restrikční enzym nemůže DNA rozštěpit. Řešením této situace, které využívali ostatní členové naší laboratoře při práci s vektorem pTGuide, bylo použití kompetentních bakterií kmene SCS110, u nichž metylase tohoto typu není funkční.

Potížím s problematickými restrikčními místy by bylo možné v budoucnu předejít vložením dalších klonovacích míst do vektoru pTGuide. Pokud by totiž uživatel plasmidu například potřeboval vložit do vektoru sekvenci 3' homologního raménka, ve které by bylo obsaženo restrikční místo pro ClaI nebo PacI, nebylo by to možné. Více restrikčních míst by tak umožnilo vkládat větší spektrum sekvencí do oblasti homologních ramének. Ze stejných důvodů by bylo výhodné vytvořit i variantu plasmidu, ve které by bylo pro vkládání spaceru guideRNA použito jiné restrikční místo než BbsI (například restrikční místo pro enzym PaeCI, který štěpí DNA za vzniku stejně dlouhého jednořetězcového přesahu jako BbsI).

### 6.3 Oprava DSB u *G. intestinalis*

Odstraněním homologních ramének z vektoru pTGuide byl vytvořen vektor pTGuideNHEJ. Po transfekci buněk *G. intestinalis*, které navíc obsahovaly vektor pro expresi Cas9, tímto plasmidem mělo stejně jako v předchozím případě dojít ke štěpení DNA v oblasti genu *cwpI*, ovšem díky absenci homologních ramének nemohlo dojít k opravě homologní rekombinací a integraci konstruktů do genomu. Tento experiment jsme navrhli za účelem otestovat, zda budou buňky schopny opravit dvouvláknový zlom jiným způsobem než homologní rekombinací. Skutečnost, že se nám tímto způsobem nepodařilo získat žádnou životaschopnou linii, by mohla ukazovat na absenci účinného opravného mechanismu.

Mechanismy oprav dvouvláknových zlomů DNA nejsou u *G. intestinalis* dosud uspokojivě prozkoumány. Co se týče základních reparačních drah, bylo v genomu *G. intestinalis* identifikováno několik komponent dráhy homologní rekombinace (Mre11, Rad50, Rad52 a DMC1B – funkční homolog Rad51) a u některých z těchto proteinů byl prokázán zvýšený výskyt v buňkách v reakci na poškození DNA způsobené ionizujícím zářením či přítomností metronidazolu (Ramesh et al., 2005; Torres-Huerta et al., 2016; Martínez-Miguel et al., 2017; Ordoñez-Quiroz et al., 2018). Základní komponenty c-NHEJ dráhy Ku70, Ku80 a DNA ligáza IV však v genomu tohoto prvoka stejně jako u některých dalších parazitických organismů nalezeny nebyly (Nenarokova et al., 2019). c-NHEJ dráha je přitom pro eukaryotické buňky klíčová, neboť umožňuje opravit zlomy i bez přítomnosti homologního templátu, který nemusí být vždy dostupný (například sesterská chromatida v G1 fázi buněčného cyklu). Důvodem našeho zájmu o mechanismy oprav dvouřetězcových zlomů DNA je význam těchto mechanismů při úpravách genomu, například pomocí CRISPR-Cas9 technologie. Různé mechanismy oprav totiž vedou k různým výsledkům, které mohou být v rámci konkrétního experimentu do různé míry žádoucí. V předchozí části věnované tvorbě knock-outu genu *cwpI* byla naším cílem integrace konstruktů do genomu a jeho rozšíření do všech lokusů *cwpI*. V takovém případě bylo vhodné, aby došlo k opravě zlomu homologní rekombinací za účasti dodaného templátu. U jiných organismů se naopak při editaci genomu využívá NHEJ dráhy – například pokud je prováděn knock-out screening za využití rozsáhlých knihoven guideRNA, které pomáhají identifikovat esenciální geny, virulenční faktory atd. jako například u *Toxoplasma gondii* (Shalem et al., 2014; Sidik et al., 2016).

Ve prospěch existence určité formy c-NHEJ dráhy u *G. intestinalis* hovoří výsledky experimentu Lin a kolektivu (2019), ve kterém byl použit inhibitor jedné z klíčových složek c-NHEJ dráhy, DNA ligázy IV, za účelem zvýšení četnosti opravy dvouřetězcových zlomů DNA mechanismem homologní rekombinace (oproti c-NHEJ). Dle autorů byl CRISPR-Cas9 systém v přítomnosti tohoto inhibitoru označovaný jako Scr7 o 32–53 % efektivnější v odstraňování kopií zkoumaného genu (*mIf*) z genomu oproti buňkám bez Scr7. Autoři též v genomu *G. intestinalis* identifikovali gen pro ligázu (GL50803\_7649) sdílející nízkou úroveň homologie s DNA ligázou IV a též DNA ligázou III (dráha aEJ) a vyslovili domněnku, že by Scr7 mohlo působit právě na tuto ligázu. Nicméně autoři připustili, že by působení Scr7 na reparační dráhy u *G. intestinalis* mohlo souviset i s výrazně negativním vlivem tohoto inhibitoru na růst trofozoitů, který byl při experimentech (za použití 6  $\mu$ M Scr7) též pozorován (Lin et al., 2019). Výsledky našich experimentů s vektorem pTGuideNHEJ však podporují hypotézu, kterou navrhli Nenarokova a kolektiv (2019), tedy že u *G. intestinalis* se NHEJ dráha nevyskytuje.

Jak bylo již zmíněno, u organismů, u kterých je dráha c-NHEJ prokazatelně přítomna, se nabízí potenciálně více možností, kterými může dojít k opravě dvouvláknového zlomu DNA vzniklého například působením Cas9 endonukleázy. Jelikož existují nástroje, kterými lze vybranou reparační dráhu zablokovat (Yeh et al., 2019), poskytuje tak širší nabídka funkčních reparačních drah i více způsobů editace genomu. Proto jsme se rozhodli v buňkách *G. intestinalis* iniciovat expresi dvou klíčových komponent mykobakteriální NHEJ dráhy. V ideálním případě měla být výsledkem linie, u které by bylo možné vytvořit knock-out vybraného genu pouhým přidáním

Cas9 a specifické guideRNA bez nutnosti dodávat templát pro opravu zlomu homologní rekombinací. Tento experiment byl založen na studii Della a kolektivu (2004), kteří testovali schopnost dvou proteinů *Mycobacterium tuberculosis*, ligázy LigD a proteinu Ku, rozeznat a zacelit dvouřetězcový zlom *in vitro* a dále obnovení NHEJ dráhy u mutantní linie kvasinky, u níž je tato reparační dráha nefunkční, expresí zmíněných proteinů. Po úspěšné transfekci buněk (obsahujících již plasmid s genem pro Cas9) jsme pozorovali jak expresi proteinu Ku, tak i LigD. Ačkoliv oba proteiny obsahovaly jadernou lokalizační sekvenci, v jádrech byl detekován pouze protein Ku, navíc v relativně malém množství. Oproti tomu se ligáza LigD vyskytovala u buněk ve velkém množství, avšak nacházela se hojně v celé buňce s výjimkou jader. U mnoha buněk byla navíc pozorována asociace LigD s okrajem přísavného disku. Velké množství LigD (ve srovnání s Ku) bylo patrně důsledkem použití promotoru genu *oct*, který se u *G. intestinalis* používá, pokud je silná exprese proteinů žádoucí.

U zmíněné linie (obsahující jak Cas9, tak LigD a Ku) byla aktivita nově zavedené NHEJ dráhy ověřena vyvoláním vzniku dvouřetězcových zlomů transfekcí buněk vektorem pTGuideNHEJblast. Jelikož jsme se domnívali, že by mohlo díky přítomnosti tohoto plasmidu dojít k selekci buněk vykazujících expresi zmíněných proteinů NHEJ dráhy (a tedy zvýšení množství těchto proteinů v kultuře), získané čtyři linie byly testovány na přítomnost těchto proteinů pomocí western blotu. Větší množství sledovaného proteinu (než u buněk před elektroporací) bylo skutečně pozorováno v případě LigD, a i v případě Ku byl pozorován jistý nárůst. U stejných linií byl sekvenován *cwpI* lokus, avšak sekvence v předpokládaném místě štěpení ve všech případech odpovídala původní sekvenci *cwpI*.

Skutečnost, že buňky obsahující proteiny Ku a LigD přežily elektroporaci konstruktem pTGuideNHEJblast, který měl působit vznik zlomů DNA, by mohla být interpretována jako úspěšné zavedení NHEJ dráhy. Důkaz aktivity této dráhy se nám však získat nepodařilo, neboť analýza sekvence *cwpI* lokusu u přeživších buněk neprokázala žádnou mutaci v místě, kde měly dvouřetězcové zlomy vznikat.

Tento poznatek je však v rozporu s naším předpokladem, že Cas9 štěpí všechny kopie *cwpI*, které obsahují sekvenci komplementární k příslušné guideRNA, a že právě to je příčinou smrti buněk, jež nemají NHEJ dráhu. Jednou z možných příčin by mohlo být narušení funkce CRISPR-Cas9 systému, který je zodpovědný za vznik zlomů DNA. Přítomnost Cas9 v buňkách sice byla prokázána metodou western blotu, nicméně mohlo dojít k selekci buněk, u kterých je fungování systému jako celku poškozeno (například mohlo dojít k mutaci v oblasti guideRNA kazety). Dalším možným důvodem by mohla být kontaminace při přípravě vzorků na sekvenaci *cwpI* lokusu, jež byla provedena nepřímo, po amplifikaci genu *cwpI* z genomové DNA. Po amplifikaci byly produkty pro všechny testované linie i linii kontrolní naneseny na agarózový gel a po elektroforetickém rozdělení byly jednotlivé bandy vyříznuty, izolovány z gelu a odeslány k sekvenaci. Během tohoto procesu mohlo též dojít k přednostní amplifikaci nepoškozené kopie genu.

Druhý experiment, který měl prokázat funkci bakteriálních NHEJ proteinů v buňkách *G. intestinalis*, spočíval v zopakování předchozího experimentu, tedy elektroporace buněk

s Cas9, LigD a Ku vektorem pTGuideNHEJblast ovšem s tím rozdílem, že v tomto případě měly být buňky inkubovány s inhibitorem DNA ligázy IV – Scr7. Předpokládali jsme, že bude-li LigD inhibována touto látkou, buňky nebudou schopny využít NHEJ dráhu k opravě vzniklých zlomů, což pro ně bude mít stejné důsledky jako kdyby komponenty této opravné dráhy vůbec neměly. Dle Lin a kolektivu (2019) má již 6  $\mu\text{M}$  Scr7 výrazný negativní vliv na růst buněk, proto jsme se před samotným experimentem rozhodli otestovat vliv různých koncentrací Scr7 na trofozoity. Na rozdíl od Lin a kolektivu (2019) jsme však žádný negativní dopad Scr7 na buňky nepozorovali, pouze buňky inkubované s nejvyšší testovanou koncentrací Scr7 (48  $\mu\text{M}$ ) vytvořily monolayer o den později než při ostatních koncentracích, což však nespíš nebylo v důsledku působení Scr7, ale přítomností velkého množství DMSO, ve kterém byl Scr7 rozpuštěn. Kontrolní buňky se srovnatelným objemem DMSO, ale bez Scr7, totiž také rostly pomaleji.

Jelikož jsme chtěli použít co nejvyšší možnou koncentraci inhibitoru, pro samotný experiment jsme použili 50  $\mu\text{M}$  Scr7. Je důležité zdůraznit, že buňky byly s inhibitorem inkubovány již ve fázi přípravy na elektroporaci a přítomnost inhibitoru na jejich růst neměla žádný pozorovatelný negativní efekt. Dva dny po přidání inhibitoru byla provedena elektroporace buněk. Dále byly stejným vektorem transfekovány buňky kontrolní – buňky obsahující Cas9, LigD a Ku a také buňky obsahující pouze Cas9. Ke kontrolním buňkám Scr7 přidán nebyl. Po elektroporaci byly buňky pravidelně pozorovány a byl hodnocen stav kultury. Toto hodnocení bylo založeno na pozorování kultury invertovaným mikroskopem a nebylo standardizováno. Provést přesnější měření pomocí cytometru nebylo v tomto případě možné, neboť po elektroporaci bývá v kultuře přítomno velmi malé množství buněk.

V souladu s naším předpokladem, buňky inkubované se Scr7 transfekci nepřežily. Jelikož byly buňky inkubovány s inhibitorem již před elektroporací (a vytvořily souvislý nárůst na stěnách nádoby), je zřejmé, že důvodem jejich smrti nebyla vysoká koncentrace inhibitoru, nýbrž přítomnost vektoru pTGuideNHEJblast.

V rámci tohoto experimentu však navzdory našemu očekávání elektroporaci přežily jak buňky obsahující LigD a Ku (bez inhibitoru), tak i buňky obsahující pouze Cas9. Druhá zmíněná linie však nikdy nenarostla do monolayeru a je tedy možné, že určitý negativní vliv na ni přítomnost vektoru měla.

Zásadním problémem našeho experimentu se Scr7 je nedostatek informací ohledně působení tohoto inhibitoru na bakteriální ligázu LigD. Scr7 se totiž používá jako inhibitor eukaryotické DNA ligázy IV (Srivastava et al., 2012) a dopady použití u bakterií nám nejsou známy. Navíc u některých eukaryot inhibuje Scr7 více DNA ligázu III (viz dráha aEJ) než DNA ligázu IV (Greco et al., 2016). I kdyby tedy u *G. intestinalis* nebyla přítomná DNA ligáza IV, je možné, že Scr7 u tohoto organismu inhibuje aktivitu jiného enzymu.

V budoucnu by bylo vhodné ověřit působení Scr7 na aktivitu námi použitých komponent NHEJ dráhy, LigD a Ku, například při *in vitro* ligaci naštěpeného vektoru stejně jako to provedli Della a kolektiv (2004). Dále by bylo třeba prokázat aktivitu zavedených rekombinantních proteinů (Cas9, LigD, Ku) v buňkách *G. intestinalis*. Důkazem aktivity Cas9 by mohlo být potvrzení vzniku dvouřetězcových zlomů po elektroporaci některou z dostupných metod detekce tohoto

typu poškození (viz review Figueroa-González & Pérez-Plasencia, 2017). Funkce nově zavedené NHEJ dráhy by mohla být ověřena experimentem za použití Cas9 v kombinaci se dvěma různými guideRNA, díky nimž by byl *cwpI* lokus štěpen na dvou různých místech, což by vedlo k úplnému odstranění části genu a spojení dvou původně nesousedících částí, které by bylo možné snadno detekovat sekvenací.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo vytvoření nových konstruktů pro manipulaci genové exprese u *G. intestinalis*.

Byly vytvořeny dva typy konstruktů pro inducibilní expresi genů. První z nich měl být dle našeho očekávání závislý na přítomnosti T7 RNA polymerázy, neboť obsahoval regulovatelný T7 promotor. Jak však bylo zjištěno, k expresi docházelo i pokud T7 RNA polymeráza přítomna nebyla. V rámci stejného konstruktů byla testována exprese tří různých genů – dvou původem z *G. intestinalis* ( genu pro glukóza-6-fosfát izomerázu a zkrácené verze genu *momp35*) a jednoho z *H. sapiens* ( genu pro proapoptický protein Bak1) – z nichž pouze u jednoho bylo možné pozorovat jednoznačně inducibilní expresi (a to u *g-6-pi*). Druhý konstrukt využíval silného endogenního promotoru genu *oct*, jehož inducibilita měla být umožněna vložením jednoho až pěti operátorů *tetO* mezi něj a reportérový gen. V tomto případě byla exprese genu zájmu pozorována, a to zejména u linie s jedním operátorem, nicméně ani v jednom případě nebylo možné považovat expresi za inducibilní.

Dalším cílem této práce bylo vytvořit a otestovat vektor pro tvorbu knock-outu genu *cwp1* pomocí technologie CRISPR-Cas9. Tímto způsobem jsme vytvořili linie *G. intestinalis*, u kterých byla potvrzena absence tohoto genu i jeho produktu. Dále jsme zjistili, jaká je minimální délka homologních oblastí v rámci konstruktů, aby mohlo dojít k úspěšné opravě zlomu vyvolaného Cas9 endonukleázou.

Posledním cílem této práce byla exprese dvou komponent mykobakteriální NHEJ dráhy, LigD a Ku, v buňkách *G. intestinalis* a ověření jejich funkce při opravě dvouřetězcových zlomů.

## 8 Seznam použitých zkratk

|          |                                                               |
|----------|---------------------------------------------------------------|
| aEJ      | alternative end joining                                       |
| ATM      | ataxia telangiectasia mutated                                 |
| BARD1    | BRCA1-associated RING domain protein 1                        |
| BLM      | Bloom helicase                                                |
| BRCA1    | Breast cancer type 2 susceptibility protein                   |
| c-NHEJ   | classical non-homologous end joining                          |
| Cas      | CRISPR-associated                                             |
| Cascade  | CRISPR-associated complex for antiviral defense               |
| CRISPR   | clustered regularly interspaced short palindromic repeats     |
| crRNA    | CRISPR RNA                                                    |
| CtIP     | CtBP-interacting protein                                      |
| CWP      | cyst-wall protein                                             |
| Dam      | DNA adenin methylase                                          |
| DNA      | deoxyribonucleic acid                                         |
| DNA-PKcs | DNA dependent protein kinase catalytic subunit                |
| DSB      | double strand break                                           |
| ESV      | encystation specific vesicles                                 |
| G-6-Pi   | glukóza-6-fosfát izomeráza                                    |
| GDH      | glutamát dehydrogenáza                                        |
| GLV      | Giardia lamblia virus                                         |
| HA       | homology arms                                                 |
| HA tag   | hemagglutinin tag                                             |
| HCEP     | highly conserved eukaryotic protein (zde konkrétně XP_770639) |
| HR       | homologní rekombinace                                         |
| KO       | knock-out                                                     |
| KRR1     | KRR-R motif-containing protein 1                              |
| MOMP     | mitosomal outer membrane protein                              |
| MRN      | Mre11, Rad50, Nbs1                                            |
| mRNA     | messenger RNA                                                 |
| NHEJ     | non-homologous end joining                                    |
| NLS      | nuclear localization signal                                   |
| OCT      | ornitin carbamoyltransferáza                                  |
| PAC      | puromycin-N-acetyl transferáza                                |
| PAM      | protospacer adjacent motif                                    |
| PARP1    | poly(ADP-ribose)polymerase 1                                  |
| PCR      | polymerase chain reaction                                     |
| PFOR     | pyruvát ferredoxin oxidoreduktáza                             |
| RACE     | rapid amplification of cDNA ends                              |
| RAN      | Ras-like nuclear protein                                      |
| RNA      | ribonucleic acid                                              |
| RNAi     | RNA interference                                              |
| ROS      | reactive oxygen species                                       |
| RPA      | replication protein A                                         |
| sgRNA    | single-guide RNA                                              |
| SSA      | single-strand annealing                                       |
| SSB      | single strand break                                           |
| SV40     | simian virus 40                                               |
| T7 RNAP  | T7 RNA polymeráza                                             |

|          |                                                  |
|----------|--------------------------------------------------|
| TetR     | tetracyklinový represor                          |
| tracrRNA | trans-encoded small CRISPR RNA                   |
| WB       | označení izolátu <i>G. intestinalis</i>          |
| WB C6    | označení izolátu <i>G. intestinalis</i> (klon 6) |
| XLF      | XRCC4-like factor                                |
| XRCC4    | X-ray repair cross-complementing protein 4       |

## 9 Seznam literatury

Souhrnné články (reviews) jsou označeny hvězdičkou \*

- Adam R. D. (2011) Transcription and Recombination in *Giardia*. In: Luján H. D., Svärd S. (eds). *Giardia*. Springer, Vienna. \*
- Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoynov, S., & Gospodinov, A. (2020). The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair. *Cells*, 9(8), 1853. \*
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413–422. \*
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712.
- Bernander, R., Palm, J. E., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), 55–62.
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*, 45, 273–297. \*
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), 2551–2561.
- Borkotoky, S., & Murali, A. (2018). The highly efficient T7 RNA polymerase: A wonder macromolecule in biological realm. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(Pt A), 49–56. \*
- Breitbart, M., & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13(6), 278–284. \*
- 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.
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 960–964.
- 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.
- Carpenter, M. L., & Cande, W. Z. (2009). Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*, 8(6), 916–919.
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 14(9), e1007250. \*
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2020). Phosphoinositide-binding proteins mark, shape and functionally modulate highly-diverged endocytic compartments in the parasitic protist *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 16(2), e1008317.

- Dan, M., Wang, A. L., & Wang, C. C. (2000). Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Molecular Microbiology*, 36(2), 447–456.
- da Silva Ferreira, M. E., Kress, M. R., Savoldi, M., Goldman, M. H., Härtl, A., Heinekamp, T., Brakhage, A. A., & Goldman, G. H. (2006). The akuB(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 5(1), 207–211.
- Davids, B. J., & Gillin, F. D. (2011). Methods for *Giardia* culture, cryopreservation, encystation, and excystation in vitro. In: Luján H. D., Svärd S. (eds). *Giardia*. Springer, Vienna. \*
- Dawson S. C. (2010). An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of *Giardia*. *Cellular Microbiology*, 12(5), 588–598. \*
- Della, M., Palmbo, P. L., Tseng, H. M., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Topper, L. M., Pitcher, R. S., Tomkinson, A. E., Wilson, T. E., & Doherty, A. J. (2004). Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), 683–685.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P., & Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1390–1400.
- Di Felice, F., Micheli, G., & Camilloni, G. (2019). Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of Biosciences*, 44(2), 38. \*
- Díez-Villaseñor, C., Almendros, C., García-Martínez, J., & Mojica, F. J. (2010). Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 5), 1351–1361.
- Ebneter, J. A., Heusser, S. D., Schraner, E. M., Hehl, A. B., & Faso, C. (2016). Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. *Nature Communications*, 7, 13859.
- 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.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52.
- Faryar, K., & Gatz, C. (1992). Construction of a tetracycline-inducible promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics*, 21(4-5), 345–349.
- Figuroa-González, G., & Pérez-Plasencia, C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. *Oncology Letters*, 13(6), 3982–3988. \*
- 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.
- Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the

malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), E6736–E6743.

Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586.

Gerwig, G. J., van Kuik, J. A., Leeftang, B. R., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F., Karr, C. D., & Jarroll, E. L. (2002). The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology*, 12(8), 499–505.

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.

Gourguechon, S., & Cande, W. Z. (2011). Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic cell*, 10(1), 142–145.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., & Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641), 492–495.

Greco, G. E., Matsumoto, Y., Brooks, R. C., Lu, Z., Lieber, M. R., & Tomkinson, A. E. (2016). SCR7 is neither a selective nor a potent inhibitor of human DNA ligase IV. *DNA Repair*, 43, 18–23.

Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D., & van Embden, J. D. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, 10(5), 1057–1065.

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.

Hehl, A. B., Regos, A., Schraner, E., & Schneider, A. (2007). Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *PloS ONE*, 2(5), e488.

Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239–1259. \*

Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Dou, S. J., Naidich, S., Garcia, M., Kahn, E., Bergmire-Sweat, D., & Musser, J. M. (1999). Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerging Infectious Diseases*, 5(2), 254–263.

Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A. C., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C., & Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 62–70.

Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1401–1412.

- Hoyne, G. F., Boreham, P. F., Parsons, P. G., Ward, C., & Biggs, B. (1989). The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology*, 99 Pt 3, 333–339.
- Hustedt, N., & Durocher, D. (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 19(1), 1–9. \*
- Chang, H., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 18(8), 495–506. \*
- Charpentier, M., Khedher, A., Menoret, S., Brion, A., Lamribet, K., Dardillac, E., Boix, C., Perrouault, L., Tesson, L., Geny, S., De Cian, A., Itier, J. M., Anegon, I., Lopez, B., Giovannangeli, C., & Concordet, J. P. (2018). CtiP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nature Communications*, 9(1), 1133.
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. \*
- Chen, L., Li, J., Zhang, X., Liu, Q., Yin, J., Yao, L., Zhao, Y., & Cao, L. (2007). Inhibition of krr1 gene expression in *Giardia canis* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Veterinary Parasitology*, 143(1), 14–20.
- 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.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Jarroll E. L., van Keulen H., Paget T. A., Lindmark D. G. (2011) *Giardia* Metabolism. In: Luján H. D., Svärd S. (eds). *Giardia*. Springer, Vienna. \*
- Jex, A. R., Svärd, S., Hagen, K. D., Starcevic, H., Emery-Corbin, S. J., Balan, B., Nosala, C., & Dawson, S. C. (2020). Recent advances in functional research in *Giardia intestinalis*. *Advances in Parasitology*, 107, 97–137. \*
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821.
- Karginov, F. V., & Hannon, G. J. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular Cell*, 37(1), 7–19. \*
- Karr, C. D., & Jarroll, E. L. (2004). Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 5), 1237–1243.
- Keister D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 487–488.
- Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K., Hillen, W., & Saenger, W. (1995). The Complex formed between tet repressor and tetracycline-Mg<sup>2+</sup> reveals mechanism of antibiotic resistance. *Journal of Molecular Biology*, 247(2), 260–280.

- Knodler, L. A., Svärd, S. G., Silberman, J. D., Davids, B. J., & Gillin, F. D. (1999). Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystation-specific promoter and differential 5' mRNA processing. *Molecular Microbiology*, 34(2), 327–340.
- 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.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews. Microbiology*, 8(5), 317–327. \*
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current opinion in microbiology*, 10(6), 554–559. \*
- 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.
- Lin, Z. Q., Gan, S. W., Tung, S. Y., Ho, C. C., Su, L. H., & Sun, C. H. (2019). Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption systems in *Giardia lamblia*. *PloS ONE*, 14(3), e0213594.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B., & Nash, T. E. (1995). Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29307–29313.
- Ma'ayeh, S. Y., Liu, J., Peirasmaki, D., Hörnaeus, K., Bergström Lind, S., Grabherr, M., Bergquist, J., & Svärd, S. G. (2017). Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006120.
- Macechko, P. T., Steimle, P. A., Lindmark, D. G., Erlandsen, S. L., & Jarroll, E. L. (1992). Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56(2), 301–309.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 7.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Scott, D., Shah, S. A., Siksny, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83. \*
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Rufino-González, Y., Ortega-Cuellar, D., Sierra-Palacios, E., Vanoye-Carlo, A., González-Valdez, A., Torres-Arroyo, A., Oria-Hernández, J., & Reyes-Vivas, H. (2017). RNAi-Mediated Specific Gene Silencing as a Tool for the Discovery of New Drug Targets in *Giardia lamblia*; Evaluation Using the NADH Oxidase Gene. *Genes*, 8(11), 303.
- 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. \*

- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1843–1845.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280), 568–571.
- Martincová, E., Voleman, L., Najdová, V., De Napoli, M., Eshar, S., Gualdron, M., Hopp, C. S., Sanin, D. E., Tembo, D. L., Van Tyne, D., Walker, D., Marcinčiková, M., Tachezy, J., & Doležal, P. (2012). Live imaging of mitosomes and hydrogenosomes by HaloTag technology. *PLoS ONE*, 7(4), e36314.
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolisko, M., Tachezy, J., & Doležal, P. (2015). Probing the Biology of *Giardia intestinalis* Mitosomes Using In Vivo Enzymatic Tagging. *Molecular and Cellular Biology*, 35(16), 2864–2874.
- Martínez-Miguel, R. M., Sandoval-Cabrera, A., Bazán-Tejeda, M. L., Torres-Huerta, A. L., Martínez-Reyes, D. A., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2017). *Giardia duodenalis* Rad52 protein: biochemical characterization and response upon DNA damage. *Journal of Biochemistry*, 162(2), 123–135.
- Masepohl, B., Görlitz, K., & Böhme, H. (1996). Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1307(1), 26–30.
- McInally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K., & Dawson, S. C. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Molecular Biology of the Cell*, 30(1), 119–130.
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *The EMBO Journal*, 29(19), 3358–3369.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
- Mojica, F. J., Ferrer, C., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17(1), 85–93.
- Mojica, F., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 3), 733–740.
- Morrison H. G., Svärd S. (2011) Genomics of *Giardia*. In: Luján H. D., Svärd S. (eds). *Giardia*. Springer, Vienna. \*
- Mowatt, M. R., Luján, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T. E., & Stibbs, H. H. (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Molecular Microbiology*, 15(5), 955–963.
- Nakata, A., Amemura, M., & Makino, K. (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3553–3556.

- Nenarokova, A., Záhonová, K., Krasilnikova, M., Gahura, O., McCulloch, R., Zíková, A., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2019). Causes and Effects of Loss of Classical Nonhomologous End Joining Pathway in Parasitic Eukaryotes. *mBio*, 10(4), e01541–19.
- 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. \*
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P., & Kowalczykowski, S. C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & Development*, 25(4), 350–362.
- Nohynková, E., Tumová, P., & Kulda, J. (2006). Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryotic Cell*, 5(4), 753–761.
- Nosala, C., & Dawson, S. C. (2015). The Critical Role of the Cytoskeleton in the Pathogenesis of *Giardia*. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(4), 155–162. \*
- Ordoñez-Quiroz, A., Ortega-Pierres, M. G., Bazán-Tejeda, M. L., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2018). DNA damage induced by metronidazole in *Giardia duodenalis* triggers a DNA homologous recombination response. *Experimental Parasitology*, 194, 24–31.
- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winiecka-Krusnell, J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Pacocha, S. E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., & Svärd, S. (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 141(2), 199–207.
- Paredes, A. R., Assaf, Z. J., Sept, D., Timofejeva, L., Dawson, S. C., Wang, C. J., & Cande, W. Z. (2011). An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15), 6151–6156.
- Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*, 285(3), 416–431. \*
- Perrimon, N., Ni, J. Q., & Perkins, L. (2010). In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a003640. \*
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(8), 490–507. \*
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 3), 653–663.
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G., & Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), 750–754.
- Ramesh, M. A., Malik, S. B., & Logsdon, J. M., Jr (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*, 15(2), 185–191.
- Ranjha, L., Howard, S. M., & Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127(2), 187–214. \*

- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(10), 610–621. \*
- Reiner, D. S., Ankarklev, J., Troell, K., Palm, D., Bernander, R., Gillin, F. D., Andersson, J. O., & Svärd, S. G. (2008). Synchronisation of *Giardia lamblia*: identification of cell cycle stage-specific genes and a differentiation restriction point. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 935–944.
- Rivero, M. R., Kulakova, L., & Touz, M. C. (2010). Long double-stranded RNA produces specific gene downregulation in *Giardia lamblia*. *The Journal of Parasitology*, 96(4), 815–819.
- Robert, I., Dantzer, F., & Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 1047–1056.
- Rodgers, K., & McVey, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 15–24. \*
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275–9282.
- Saraiya, A. A., & Wang, C. C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000224.
- Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(10), 578–587. \*
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6166), 84–87.
- Shapiro, R. S., Chavez, A., Porter, C., Hamblin, M., Kaas, C. S., DiCarlo, J. E., Zeng, G., Xu, X., Revtovich, A. V., Kirienko, N. V., Wang, Y., Church, G. M., & Collins, J. J. (2018). A CRISPR-Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nature Microbiology*, 3(1), 73–82.
- Sidik, S. M., Huet, D., Ganesan, S. M., Huynh, M. H., Wang, T., Nasamu, A. S., Thiru, P., Saeij, J., Carruthers, V. B., Niles, J. C., & Lourido, S. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell*, 166(6), 1423–1435.e12.
- Singer, S. M., Yee, J., & Nash, T. E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92(1), 59–69.
- Srivastava, M., Nambiar, M., Sharma, S., Karki, S. S., Goldsmith, G., Hegde, M., Kumar, S., Pandey, M., Singh, R. K., Ray, P., Natarajan, R., Kelkar, M., De, A., Choudhary, B., & Raghavan, S. C. (2012). An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*, 151(7), 1474–1487.
- 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., McCaffery, J. M., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2003). Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21701–21708.

- 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.
- Sun, Y., McCorvie, T. J., Yates, L. A., & Zhang, X. (2020). Structural basis of homologous recombination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 3–18. \*
- Symington L. S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3), 195–212. \*
- Tang, T. H., Bachellerie, J. P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M. L., Huber, H., Drungowski, M., Elge, T., Brosius, J., & Hüttenhofer, A. (2002). Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7536–7541.
- Tang, T. H., Polacek, N., Zywicki, M., Huber, H., Brugger, K., Garrett, R., Bachellerie, J. P., & Hüttenhofer, A. (2005). Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology*, 55(2), 469–481.
- Torres-Huerta, A. L., Martínez-Miguel, R. M., Bazán-Tejeda, M. L., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2016). Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*, 127, 173–186.
- 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.
- Touz, M. C., Kulakova, L., & Nash, T. E. (2004). Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(7), 3053–3060.
- Tůmová, P., Dluhošová, J., Weisz, F., & Nohýnková, E. (2019). Unequal distribution of genes and chromosomes refers to nuclear diversification in the binucleated *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 49(6), 463–470.
- Ullu, E., Tschudi, C., & Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 6(6), 509–519. \*
- van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B. A., & Schouls, L. M. (2000). Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2393–2401.
- Voleman, L., Najdřová, V., Ástvaldsson, Á., Tůmová, P., Einarsson, E., Švindrych, Z., Hagen, G. M., Tachezy, J., Svärd, S. G., & Doležal, P. (2017). *Giardia intestinalis* mitochondria undergo synchronized fission but not fusion and are constitutively associated with the endoplasmic reticulum. *BMC Biology*, 15(1), 27.
- Wang, H., Xu, X., Nguyen, C. M., Liu, Y., Gao, Y., Lin, X., Daley, T., Kipniss, N. H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2018). CRISPR-Mediated Programmable 3D Genome Positioning and Nuclear Organization. *Cell*, 175(5), 1405–1417.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6170–6182.
- Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, J. C., Franklin, C., & McKerrow, J. H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell*, 89(3), 437–444.

- Wei, Y., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2015). Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. *Genes & Development*, 29(4), 356–361.
- Wen, L. M., Xu, P., Benegal, G., Carvahlo, M. R. C., Butler, D. R., & Buck, G. A. (2001). *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. *Experimental Parasitology*, 97(4), 196–204.
- 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.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331–338. \*
- Williams, G. J., Hammel, M., Radhakrishnan, S. K., Ramsden, D., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2014). Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair*, 17, 110–120. \*
- Woessner, D. J., & Dawson, S. C. (2012). The *Giardia* median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 292–301.
- 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.
- Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W. D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10524–10535. \*
- 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.
- 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.
- Yee, J., & Nash, T. E. (1995). Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5615–5619.
- Yeh, C. D., Richardson, C. D., & Corn, J. E. (2019). Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nature Cell Biology*, 21(12), 1468–1478. \*
- Yu, D. C., Wang, A. L., & Wang, C. C. (1996). Stable coexpression of a drug-resistance gene and a heterologous gene in an ancient parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(1), 81–91.
- Zhang, Y., Heidrich, N., Ampattu, B. J., Gunderson, C. W., Seifert, H. S., Schoen, C., Vogel, J., & Sontheimer, E. J. (2013). Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Cell*, 50(4), 488–503.

## 10 Přílohy

### Příloha 1: Sekvence optimalizovaného genu pro Ku protein s UTR oblastmi

ATCGATAGATCTACTGTGGTCTGTAAGTGTAGATCCACCGACACCGGTCAAAGAGA  
TTCAAAGAGGATTGGGGGAGGCTGCGAAACGCGGCGTGTAAGTGCCAATAGAAAA  
ACGCCAACCTGGCATTTAATATATTTATTATATGCTTTTTTGAGAAGAGCTAAACGTC  
TACACGTGAGGTGTGTAAACTTCCGGAGAAAAAAATCCTAGTACCATATGCCCCGAG  
AAGAAGCGCTCTAAGTCTTCTAAGTCTTCTCGCAAGGAGAAGAAGCGCCACGAGGA  
CGAGGGCATGAAGGACCGCCGCGTCTCTAAGATCAAGTCTGGCCTCAACGACATCT  
TCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGGCACGAGACGCGTCGCGCCATCTGGACCGGCTCT  
ATCGCCTTCGGCCTCGTCAACGTCCCCGTCAAGGTCTACTCTGCCACCGCCGACCAC  
GACATCCGCTTCCACCAGGTCCACGCCAAGGACAACGGCCGCATCCGCTACAAGCG  
CGTCTGCGAGGCCTGCGGCGAGGTCTGTCGACTACCGCGACCTCGCCCCGCGCCTACG  
AGTCTGGCGACGGCCAGATGGTCGCCATCACCGACGACGACATCGCCTCTCTCCCC  
GAGGAGCGCTCTCGCGAGATCGAGGTCTCTCGAGTTCGTCCCCGCCGCCGACGTCGA  
CCCCATGATGTTTCGACCGCTCTTACTTCCTCGAGCCCGACTCTAAGTCTTCTAAGTC  
TTACGTCTCTCTCGCCAAGACCCTCGCCGAGACCGACCGCATGGCCATCGTCCACTT  
CACCCTCCGCAACAAGACCCGCTCGCCGCCCTCCGCGTCAAGGACTTCGGCAAGC  
GCGAGGTCATGATGGTCCACACCCTCCTCTGGCCCGACGAGATCCGCGACCCCGAC  
TTCCCCGTCTCTCGACCAGAAGGTCGAGATCAAGCCCCGCCGAGCTCAAGATGGCCGG  
CCAGGTCGTCGACTCTATGGCCGACGACTTCAACCCCGACCGCTACCACGACACCT  
ACCAGGAGCAGCTCCAGGAGCTCATCGACACCAAGCTCGAGGGCGGCCAGGCCTT  
CACCGCCGAGGACCAGCCCCGCTCTCTCGACGAGCCCGAGGACGTCTCTGACCTCC  
TCGCCAAGCTCGAGGCCTCTGTCAAGGCCCGCTCTAAGGCCAACTCTAACGTCCCC  
ACCCCCCCCCTAATTAATTAACAGTGAATTGTAATTCAGATATCAAATAATTGAC  
ATGTTTCATATCCAGTTCAAAGCACCGGCCCGCCGCCGACTCATGTACGGTTCCG  
CGGGCGCTCAGGGGAATGCAGAACACACAATGCTATCAGCGTTGCTCTCACTTAG  
AACTTCTGGAGAAGACTCAGAGCCTCGGCAGGACGACAGCTACGAGTGCAGGCTA  
GCGGGCCC

### Příloha 2: Sekvence optimalizovaného genu pro LigD

CTTAAGATGCCAGAGAAGAAGCGGTCCAAGTCCTCCAAGTCCTCACGCAAAGAGA  
AAAAACGCCACGAGGACGAGGGTATGAAGGATCGTAGAGTTAGTAAATTAAGAG  
CGGCAAGCCCATCCCCAACCCCTCCTCGGCCTCGACTCTACCCTGCAGGGCTCTGC  
CTCTGAGCAGCGCGTCACCCTCACCAACGCCGACAAGGTCCTCTACCCCGCCACCG  
GCACCACCAAGTCTGACATCTTCGACTACTACGCCGGCGTCGCCGAGGTCATGCTC  
GGCCACATCGCCGGCCGCCCGCCACCCGCAAGCGCTGGCCCAACGGCGTCGACCA  
GCCCCGCTTCTTCGAGAAGCAGCTCGCCCTCTCTGCCCCCCCCCTGGCTCTCTCGCGC  
CACCGTCGCCCACCGCTCTGGCACCAACCTACCCCATCATCGACTCTGCCACCGG  
CCTCGCCTGGATCGCCCAGCAGGCCGCCCTCGAGGTCCACGTCCCCCAGTGGCGCT  
TCGTCGCCGAGCCCGGCTCTGGCGAGCTCAACCCCGGCCCGCCACCCGCTCGTC  
TTCGACCTCGACCCCGGCGAGGGCGTCATGATGGCCAGCTCGCCGAGGTCGCCCG

CGCCGTCCGCGACCTCCTCGCCGACATCGGCCTCGTCACCTTCCCCGTCACCTCTGG  
CTCTAAGGGCCTCCACCTCTACACCCCCCTCGACGAGCCCGTCTCTTCTCGCGGCGC  
CACCGTCCTCGCCAAGCGCGTCGCCCAGCGCCTCGAGCAGGCCATGCCCCGCCCTCG  
TCACCTCTACCATGACCAAGTCTCTCCGCGCCGGCAAGGTCTTCGTGACTGGTCTC  
AGAACTCTGGCTCTAAGACCACCATCGCCCCCTACTCTCTCCGCGGCCGACCCACC  
CCACCGTCGCGCCCCCCCCGCACCTGGGCGGAGCTCGACGACCCCGCCCTCCGCCAG  
CTCTCTTACGACGAGGTCTCACCCGCATCGCCCGCGACGGCGACCTCCTCGAGCG  
CCTCGACGCCGACGCCCCCGTCGCCGACCGCCTCACCCGCTACCGCCGCATGCGCG  
ACGCCTCTAAGACCCCCGAGCCATCCCCACCGCCAAGCCCGTCACCGGCGACGGC  
AACACCTTCGTCATCCAGGAGCACCACGCCCGCCGCCCCCACTACGACTTCCGCCT  
CGAGTGCAGCGGCGTCTCGTCTCTTGGGCGGTCCCCAAGAACCTCCCCGACAACA  
CCTCTGTCAACCACCTCGCCATCCACACCGAGGACCACCCCTCGAGTACGCCACC  
TTCGAGGGCGCCATCCCCTCTGGCGAGTACGGCGCCGGCAAGGTCATCATCTGGGA  
CTCTGGCACCTACGACACCGAGAAGTTCCACGACGACCCCCACACCGGCGAGGTCA  
TCGTCAACCTCCACGGCGGCCGCATCTCTGGCCGCTACGCCCTCATCCGCACCAAC  
GGCGACCGCTGGCTCGCCCACCGCCTCAAGAACCAGAAGGACCAGAAGGTCTTCG  
AGTTCGACAACCTCGCCCCCATGCTCGCCACCCACGGCACCGTCGCCGGCCTCAAG  
GCCTCTCAGTGGGCCTTCGAGGGCAAGTGGGACGGCTACCGCCTCCTCGTCGAGGC  
CGACCACGGCGCCGTCCGCCTCCGCTCTCGCTCTGGCCGCGACGTCACCGCCGAGT  
ACCCCCAGCTCCGCGCCCTCGCCGAGGACCTCGCCGACCACCACGTCGTCCTCGAC  
GGCGAGGCCGTGTCCTCGACTCTTCTGGCGTCCCCTCTTTCTCTCAGATGCAGAAC  
CGCGGCCGCGACACCCGCGTCGAGTTCTGGGCCTTCGACCTCCTCTACCTCGACGG  
CCGCGCCCTCCTCGGCACCCGCTACCAGGACCGCCGCAAGCTCCTCGAGACCCTCG  
CCAACGCCACCTCTCTCACCGTCCCCGAGCTCCTCCCCGGCGACGGCGCCCAGGCC  
TTCGCCTGCTCTCGCAAGCACGGCTGGGAGGGCGTCATCGCCAAGCGCCGCGACTC  
TCGCTACCAGCCCGGCCGCGCTGCGCCTCTTGGGTCAAGGACAAGCACTGGAACA  
CCCAGGAGGTCGTCATCGGCGGCTGGCGCGCCGGCGAGGGCGGCCGCTCTTCTGGC  
GTCGGCTCTCTCCTCATGGGCATCCCCGGCCCCGGCGGCCTCCAGTTCGCCGGCCG  
GTCGGCACCCGGCCTCTCTGAGCGCGAGCTCGCCAACCTCAAGGAGATGTCGCCCC  
CCTCCACACCGACGAGTCTCCCTTCGACGTCCCCCTCCCCGCCGCGACGCCAAGG  
GCATCACCTACGTCAAGCCCGCCCTCGTCGCCGAGGTCCGCTACTCTGAGTGGACC  
CCCGAGGGCCGCCTCCGCCAGTCTTCTTGGCGCGGCCTCCGCCCCGACAAGAAGCC  
CTCTGAGGTCGTCCGCGAGTAAGAATTC

**Příloha 3: Sekvence genu pro TetR (v sekvenci jsou přítomna restriční místa nutná pro konstrukci vektoru pTetR)**

GATATCGAATTCATCGATCTCGAGATGTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAA  
CAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTTCGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAAC  
TCGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAG  
CGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCGTACTCACTTT  
TGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTT  
TAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGAGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGC

CTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAA  
GGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTA  
GGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACAC  
CTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACC  
AAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAA  
AAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCTTAAACCGGTGGGCCC

**Příloha 4: Sekvence genu pro luciferázu NanoLuc (i se dvěma HA tagy a restrikčními místy)**

ACGCGTATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGCCAGACCGCTGG  
TTACAACCTGGACCAGGTGCTGGAGCAGGGCGGCGTGTCTCCCTGTTCCAGAACC  
TGGGCGTGTCCGTGACCCCCATCCAGCGCATCGTGCTGTCCGGCGAGAACGGCCTG  
AAGATCGACATCCACGTGATCATCCCCTACGAGGGCCTGTCCGGCGACCAGATGGG  
TCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTGGTGTACCCCGTGGACGACCACCACTTCAAGG  
TGATCCTGCACTACGGCACCCCTGGTGATCGACGGTGTGACCCCCAACATGATCGAC  
TACTTCGGCCGCCCTACGAGGGTATCGCTGTGTTTCGACGGCAAGAAGATCACCGT  
GACCGGCACCCTGTGGAACGGCAACAAGATCATCGACGAGCGCCTGATCAACCCA  
GACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTGACCATCAACGGTGTGACCGGTTGGCGCCTGTG  
CGAACGCATTCTGGCGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTACCCATACGATGT  
TCCAGATTACGCTTGAGAATTC

**Příloha 5: Sekvence zkrácené verze genu *momp35* (GL50803\_14939) – jeho prvních 270 párů bází s T7 promotorem, operátory *tetO*, BAP tagem a restrikčními místy pro vložení do vektoru**

GATATCTAATACGACTCACTATAGTCCCTATCAGTGATAGAGACATGCATCCCTATC  
AGTGATAGAGAATGCCGGCTCACAGACACAGCCGATCATCCCTTCGCACCAGTGCT  
GCAGCGATCGCTTCTGCCACACTCATTGCTGGTGGCCTAGCAGGGCTGGGATATGG  
CGTTTATCGCATGGTGCGTAACTACCAATTCCATGTTAGCCCCTACAAGGTCCTTCA  
GCATGCCATCGCCTCTGATGTTGAGAAACAGCAGATACTAGTCCTTGAGGACAGTA  
TTGCACGCACACATTACACCGTCCAGACCCTCAGCACAGATGAGGAAAAAGAGGA  
GGGCCTAAATGACATCTTTGAGGCTCAGAAGATAGAATGGCACGAGTAAGAATTC

**Příloha 6: Tabulka codon usage pro *Giardia intestinalis* [gbinv] sestavená na základě 367 kódujících sekvencí (převzato z Codon Usage Database)**

|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
|--------|-------|---------|-------|-------------|-----|-----|---------|-------|------|
| AmAcid | Codon | Number  | /1000 | Fraction .. | Arg | CGG | 896.00  | 4.81  | 0.00 |
|        |       |         |       |             | Arg | CGA | 891.00  | 4.79  | 0.00 |
| Gly    | GGG   | 2917.00 | 15.67 | 0.00        | Arg | CGT | 1462.00 | 7.86  | 0.00 |
| Gly    | GGA   | 3128.00 | 16.81 | 0.00        | Arg | CGC | 2552.00 | 13.71 | 0.00 |
| Gly    | GGT   | 2155.00 | 11.58 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Gly    | GGC   | 4291.00 | 23.06 | 0.00        | Gln | CAG | 4551.00 | 24.45 | 0.00 |
|        |       |         |       |             | Gln | CAA | 2228.00 | 11.97 | 0.00 |
| Glu    | GAG   | 7719.00 | 41.47 | 0.00        | His | CAT | 1421.00 | 7.63  | 0.00 |
| Glu    | GAA   | 3516.00 | 18.89 | 0.00        | His | CAC | 2493.00 | 13.39 | 0.00 |
| Asp    | GAT   | 4575.00 | 24.58 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Asp    | GAC   | 6253.00 | 33.60 | 0.00        | Leu | CTG | 3266.00 | 17.55 | 0.00 |
|        |       |         |       |             | Leu | CTA | 1702.00 | 9.14  | 0.00 |
| Val    | GTG   | 2895.00 | 15.55 | 0.00        | Leu | CTT | 3901.00 | 20.96 | 0.00 |
| Val    | GTA   | 1483.00 | 7.97  | 0.00        | Leu | CTC | 4578.00 | 24.60 | 0.00 |
| Val    | GTT   | 3009.00 | 16.17 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Val    | GTC   | 4229.00 | 22.72 | 0.00        | Pro | CCG | 1898.00 | 10.20 | 0.00 |
|        |       |         |       |             | Pro | CCA | 1963.00 | 10.55 | 0.00 |
| Ala    | GCG   | 2965.00 | 15.93 | 0.00        | Pro | CCT | 2077.00 | 11.16 | 0.00 |
| Ala    | GCA   | 4318.00 | 23.20 | 0.00        | Pro | CCC | 2215.00 | 11.90 | 0.00 |
| Ala    | GCT   | 3583.00 | 19.25 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ala    | GCC   | 4707.00 | 25.29 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Arg    | AGG   | 1749.00 | 9.40  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Arg    | AGA   | 1433.00 | 7.70  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ser    | AGT   | 1658.00 | 8.91  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ser    | AGC   | 3061.00 | 16.45 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Lys    | AAG   | 8433.00 | 45.31 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Lys    | AAA   | 2574.00 | 13.83 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Asn    | AAT   | 3074.00 | 16.52 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Asn    | AAC   | 4548.00 | 24.44 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Met    | ATG   | 3961.00 | 21.28 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ile    | ATA   | 2505.00 | 13.46 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ile    | ATT   | 3217.00 | 17.28 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ile    | ATC   | 4418.00 | 23.74 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Thr    | ACG   | 2846.00 | 15.29 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Thr    | ACA   | 3331.00 | 17.90 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Thr    | ACT   | 2776.00 | 14.92 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Thr    | ACC   | 3377.00 | 18.14 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Trp    | TGG   | 1378.00 | 7.40  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| End    | TGA   | 108.00  | 0.58  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Cys    | TGT   | 2349.00 | 12.62 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Cys    | TGC   | 4430.00 | 23.80 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| End    | TAG   | 122.00  | 0.66  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| End    | TAA   | 137.00  | 0.74  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Tyr    | TAT   | 2658.00 | 14.28 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Tyr    | TAC   | 3448.00 | 18.53 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Leu    | TTG   | 1861.00 | 10.00 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Leu    | TTA   | 1095.00 | 5.88  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Phe    | TTT   | 2723.00 | 14.63 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Phe    | TTC   | 3516.00 | 18.89 | 0.00        |     |     |         |       |      |
|        |       |         |       |             |     |     |         |       |      |
| Ser    | TCG   | 1721.00 | 9.25  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ser    | TCA   | 1849.00 | 9.93  | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ser    | TCT   | 3293.00 | 17.69 | 0.00        |     |     |         |       |      |
| Ser    | TCC   | 2632.00 | 14.14 | 0.00        |     |     |         |       |      |

