

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

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



Gabriela Kriegová

Využití metod genového inženýrství při studiu leishmanií

Gene engineering methods in *Leishmania* research

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Tomáš Bečvář

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 4. 5. 2022

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Bečvářovi za mnoho cenných rad, podnětů a připomínek v průběhu zpracování této bakalářské práce.

Obsah

	strana
1 Úvod	1
2 Leishmanie	2
3 Genové inženýrství	4
4 Metody	5
4.1 Plasmid shuffle (záměna plazmidů)	5
4.2 DiCre	7
4.2.1 Využití DiCre u <i>Leishmania</i> spp.	8
4.3 Gene tagging (endogenous tagging)	9
4.3.1 Gene tagging s využitím CRISPR/Cas9	10
4.4 CRISPR/Cas9	11
4.4.1 Úvod, historie	11
4.4.2 Rozdělení systémů, protein Cas9	11
4.4.3 CRISPR/Cas9 u <i>Leishmania</i> spp.	13
4.4.4 Výhody a limitace CRISPR/Cas9 systému	15
4.5 RNA interference	15
4.6 Další metody	16
5 Závěr	17
6 Literatura	20

Abstrakt

Při studiu leishmanií se v současné době stále více využívá metod genového inženýrství. Tyto moderní DNA technologie umožňují zásah do genomu organismů a přesnou manipulaci umožňující jeho změny a opravy. Mezi nejdůležitější metody patří CRISPR/Cas9, RNA interference (RNAi), dimerizovatelná Cre rekombináza (DiCre), plasmid shuffle a gene tagging. Volba metody závisí na tom, zda studujeme esenciální nebo neesenciální geny, případně co je cílem studie. Díky těmto metodám můžeme zkoumat leishmanie přístupem reverzní genetiky, která umožňuje studovat fenotyp. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o využití metod genového inženýrství a současně diskutuje jejich limity, výhody a nezbytné modifikace postupů u leishmanií.

Klíčová slova: leishmania, leishmanióza, CRISPR-Cas9, genové inženýrství

Abstract

Gene engineering methods are now increasingly used in the study of leishmania. These modern DNA technologies make it possible to manipulate with the genome of organisms, allowing it to be altered and repaired. The most important methods include CRISPR/Cas9, RNA interference (RNAi), dimerizable Cre recombinase (DiCre), plasmid shuffle and gene tagging. The choice of method depends on whether essential or non-essential genes are being studied as well as the reason of the study. These methods investigate leishmania using a reverse genetics approach that allows the phenotype to be studied. This work summarizes the current knowledge on the use of gene engineering methods in *Leishmania*, the necessary modifications of the procedures and discusses their limitations and advantages.

Key words: leishmania, leishmaniasis, CRISPR-Cas9, gene engineering

Seznam zkratek

Cdk1 – cyklin-dependentní kináza 1

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRK3 – Cdc2-příbuzná kináza 3

DCL – Dicer-like enzym

DHCH1 – gen pro methenyltetrahydrofolát cyclohydrolázu

DiCre – dimerizovatelná Cre rekombináza

DSB – double strand breaks

HDR – homology-directed repair

L. – *Leishmania*

MMEJ – microhomology-mediated end joining

NHEJ – non-homologous end joining

PAM – protospacer-sousedící motiv

PCR – polymerázová řetězová reakce

pre-crRNA – prekurzorové crRNA

RISC – RNA-inducing silencing komplex

RNAi – RNA interference

sgRNA – single guide RNA

siRNA – small interference RNA

SSA – single-strand annealing

TALENs – transcription activator-like effector nucleases

tracrRNA – *trans*-encoded small RNA

ZNFs – zinc-finger nucleases

1 Úvod

Leishmanióza patří sedm nejdůležitějších parazitárních onemocnění na světě, kterým se ročně nakazí až 1 milion lidí. Leishmaniózu způsobují parazité rodu *Leishmania* a k nákaze dochází během sání infikované samice flebotoma na hostiteli. Existují tři hlavní formy onemocnění, z nichž nejnebezpečnější je viscerální forma (kala-azar), dále kutánní a mukokutánní forma. Onemocnění často končí závažnými komplikacemi až smrtí, protože v současné době spolehlivá léčba nebo očkování. Navíc jsou dostupné léky mnohdy toxické (Pearson & Sousa, 1996; WHO, 2022).

Za účelem nalezení nových terapeutických cílů a léků se v současné době zkoumají geny zodpovědné za patogenitu leishmanií. K tomuto studiu se stále častěji využívají metody genového inženýrství, které jsou nástrojem pro výzkum, ovlivnění a regulaci genové exprese esenciálních i neesenciálních genů. Mezi nejdůležitější metody patří CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice), RNA interference (RNAi), dimerizovatelná Cre rekombináza (DiCre), plasmid shuffle (záměna plazmidů) a gene tagging (Santi & Murta, 2022). Tyto moderní metody umožňují zkoumat výsledný fenotyp přístupem reverzní genetiky a umožňují cílený zásah do genomu organismu a manipulaci umožňující jeho změny a opravy (Hardy et al., 2010).

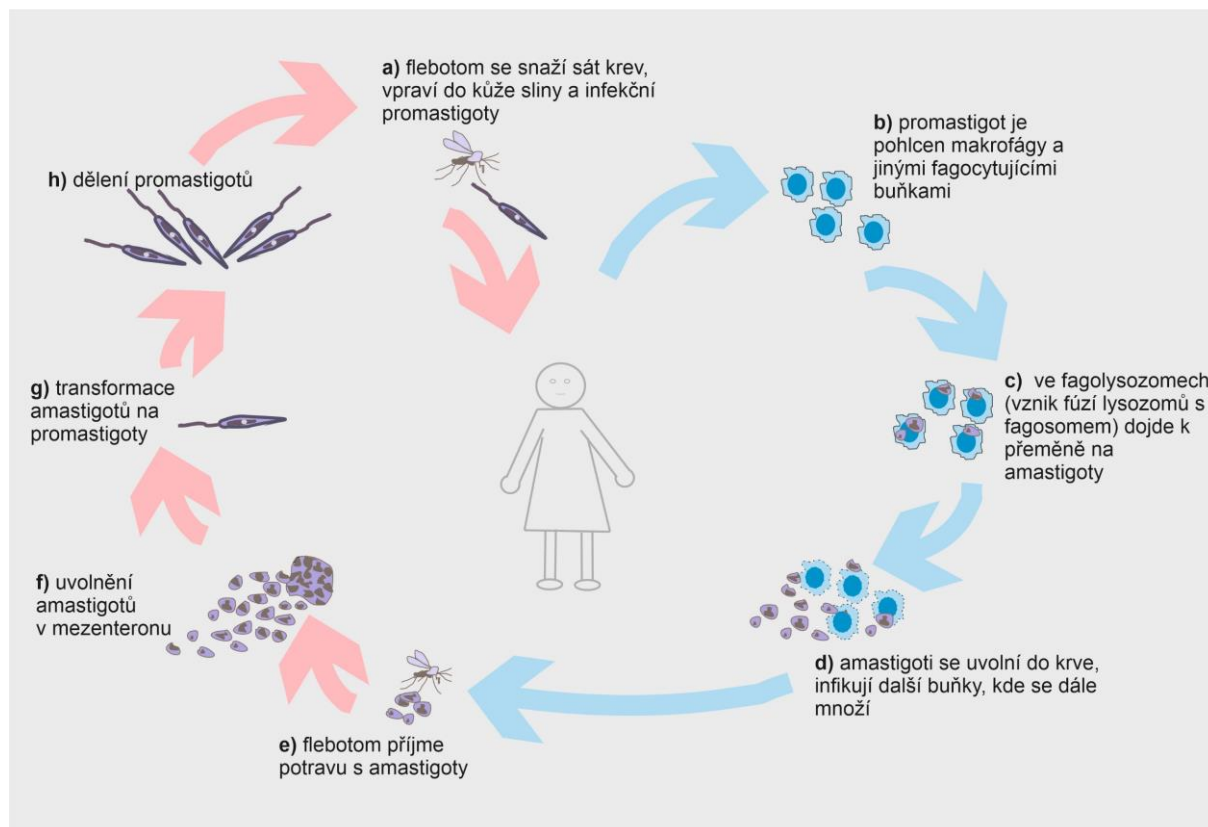
Jedním z nejnadějnějších systémů pro využití ke genové manipulaci u leishmanií se jeví CRISPR/Cas9, který umožňuje rychlou, účinnou a nenáročnou editaci genomu. Systém obsahuje protein Cas9, který je specificky naváděn pomocí single guide RNA (sgRNA) k cílové sekvenci, kde způsobuje dvouvláknové zlomy. Dvouvláknové zlomy jsou využívány ke genové manipulaci, která vede ke změnám v sekvenci DNA (Canver MC et al, 2014).

Cílem této bakalářské práce bylo popsat nejčastěji používané metody genového inženýrství a jejich využití u leishmanií. V rámci této práce byla shrnuta základní fakta pro manipulaci s genomem leishmanií a problematika genového inženýrství. Dále byly porovnány výhody a nevýhody jednotlivých metod, nezbytné modifikace postupů a zhodnocena jejich využitelnost v současném a budoucím výzkumu.

2 Leishmanie

Leishmanióza patří mezi sedm nejdůležitějších parazitárních onemocnění na světě (WHO, 2022). Jedná se o onemocnění vyskytující se v tropickém pásu celého světa, které způsobuje zhruba 20 druhů parazita rodu *Leishmania* (Trypanosomatida, Kinetoplastidae) (Torres-Guerrero et al., 2017; WHO, 2022). V závislosti na druhu parazita, imunitním stavu hostitele a dalších faktorech způsobuje v lidském organismu různě závažné klinické projevy. Existují tři hlavní formy onemocnění. U viscerální formy napadá parazit orgány, nejčastěji slezinu a játra, z toho důvodu může být často letální a po malárii ji řadíme jako druhé nejsmrtelnější parazitární onemocnění (Pearson & Sousa, 1996; McCall et al., 2015). V případě kutánní formy se objevují kožní léze. V případě mukokutánního onemocnění dochází k rozvoji lézí v mukózních tkáních. V riziku onemocnění leishmaniózou je celosvětově až 350 milionů lidí ve více než 98 endemických oblastech. Ročně je evidován téměř 1 milion nových případů, které až u 70 000 nakažených končí letálně. Vzhledem k vysokému počtu nakažených a rozšiřování oblastí výskytu přenašečů bylo vyvinuto mnoho metod pro diagnostiku a výzkum těchto parazitů (Pearson & Sousa, 1996; Torres-Guerrero et al., 2017). Bohužel v současné době neexistuje spolehlivé léčivo bez výrazných vedlejších účinků ani není dostupná vakcinace, proto je výzkum nových léčiv a vakcín hlavním předmětem bádání mnoha laboratoří (Santi & Murta., 2022).

Rod *Leishmania* je v současnosti rozdělen na 4 podrody – *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* a *Sauroleishmania*. Zatímco v rodu *Sauroleishmania* nalezneme druhy infikující převážně plazy, v rodech *Leishmania*, *Viannia* a *Mundinia* se vyskytují i druhy způsobující onemocnění u lidí. Vektorem tohoto onemocnění jsou samice dvoukřídlého krevsajícího hmyzu rodů *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) ve Starém světě a *Lutzomyia* (Diptera, Psychodidae) v Novém světě. V posledních letech je navíc stále pravděpodobnější, že jsou do přenosu leishmanií z rodu *Mundinia* zapojeni i tiplíci (Diptera, Ceratopogonidae) (Seblova et al., 2015; Chanmol et al., 2019; Becvar et al., 2021). Kromě tiplíků se také diskutuje řada dalších alternativních přenašečů, na příklad klíšťata a blechy, ale přenos těmito skupinami bezobratlých nebyl nikdy prokázán (Ferreira et al., 2009; Dantas-Torres, 2011). Parazit často bývá přenosný specificky právě jedním druhem, na příklad v souvislosti s jeho specifickými membránovými povrchovými lipofosfoglykany. Po nákaze se dostává do krevního oběhu nebo dermis, kde infikuje makrofágy, neutrofilů a dendritické buňky (obrázek 1). Často dochází k více vpichům (probing), a proto pozorujeme u některých pacientů více lézí (Cecílio et al., 2014).



Obrázek 1. Životní cyklus leishmanií (člověk, zvíře) začíná a) vpravením infekčních promastigotů do kůže při sání krve samičkou flebotoma. b) Po nákaze se dostávají promastigoti do krevního oběhu nebo dermis, kde jsou pohlceni (fagocytováni) makrofágy, neutrofilů a dendritickými buňkami. Existuje také možnost, že se makrofág nakazí pohlcením nakaženého neutrofilu. c) Následně dojde ve fagolysosomech, které vznikají fúzí lysozomů a fagosomů, k přeměně promastigotů na amastigoty. d) Poté se amastigoti začnou v buňkách množit a rozpadem buněk se uvolní do krve a infikují další buňky, kde se dále množí jednoduchým dělením. e) Do vektora se amastigoti dostanou opět potravou, kdy nasají infikovanou krev. f) Poté dojde k uvolnění amastigotů z mezenteronu vektora, g) jejich transformaci z amastigotů na promastigoty a h) dělení promastigotů. a) Životní cyklus ve vektorovi se uzavírá infikováním dalšího hostitele (upraveno dle CDC, 2022).

V rámci svého životního cyklu se leishmanie vyskytují ve více morfoloicky odlišných formách (obrázek 1). Amastigoti se nachází intracelulárně v mononukleárních fagocytech (makrofázích, neutrofilech a dendritických buňkách) savců (Ogden & Melby, 2009). Rozměr těla amastigotů je 2-10 μm . Mají kulovitý až oválný tvar a nemají viditelný bičík. Ve vektorovi najdeme protáhlou pohyblivou formu – promastigoty. Promastigoti mají zhruba 15-25 μm dlouhé, oválné a štíhlé tělo. Při obarvení pozorujeme nejvíce viditelné jádro, na anteriorní straně kinetoplast a bičík. Promastigoti se nachází v zažívacím traktu vektora, ve středním střevě (mezenteronu) nalezneme neinfekční procyklické promastigoty. Během vývoje v přenašeči

dochází k diferenciaci ve virulentní metacyklickou formu, která se dostává do hostitele během sání vektora. V hostiteli dochází k diferenciaci metacyklických promastigotů na amastigoty, kteří jsou nadále lokalizováni uvnitř makrofágů. K invazi makrofágů dochází dvěma způsoby. První cesta je přes receptory na buněčném povrchu, druhá nepřímo, když makrofág pohltí nakažený neutrofil. Pak je *Leishmania* uzavřena do fagolysosomu, který vzniká fúzí lysosomu s fagozomem (Ogden & Melby, 2009). Následně dojde ve fagolysosomech k přeměně na amastigoty. Amastigoti začnou po pomnožení v buňkách hostitele uvolňovat do krve a infikují další buňky, kde se dále množí. Poté se potravou dostanou opět do krevsajícího vektora.

Leishmanie jako zástupce kinetoplastid obsahuje kromě jaderné DNA také kinetoplast (mitochondriální DNA). Tito paraziti mají diploidní genom, u kterého často mohou vznikat aneuploidie. Haploidní genom u *Leishmania* spp. má zhruba 32,5 Mbp rozdělených nejčastěji do 36 chromozomů (Kazemi, 2011).

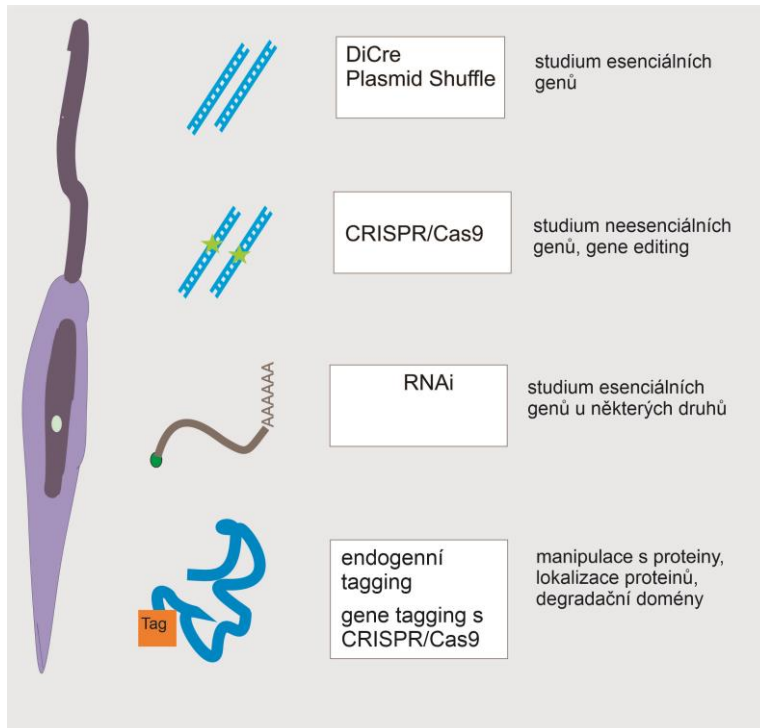
3 Genové inženýrství

Při studiu leishmanií se v současné době stále více využívá metod genového inženýrství. Tyto moderní DNA technologie umožňují zásah do genomu organismu a manipulaci umožňující jeho změny a opravy (Robert & Baylis, 2008). U leishmanií je manipulace s genomem z mnoha důvodů složitější než u jiných Trypanosomatidae a je často nutné postupy modifikovat. Mezi nejdůležitější metody patří CRISPR/Cas9, další používané metody jsou RNA interference (RNAi), dimerizovatelná Cre rekombináza (DiCre), plasmid shuffle, gene tagging a další (obrázek 2). Tyto metody umožňují zkoumání leishmanií přístupem reverzní genetiky (reverse genetics), která se na rozdíl od přímé genetiky (forward genetics), která se snaží najít genetický základ fenotypu, zaměřuje na to, jaké fenotypy vzniknou mutací konkrétního genu (Hardy et al., 2010; Bramwell et al., 2014).

Volba metody závisí především na tom, zda studujeme esenciální nebo neesenciální geny. Esenciální geny jsou takové, které jsou nezbytné pro životaschopnost a normální funkci organismu. Manipulace s esenciálními geny jsou komplikované, protože kvůli své nezastupitelné úloze v organismu nemohou být kompletně odstraněny z genomu (Huang et al., 2008), protože by vznikl letální fenotyp (Murta et al., 2009). Neesenciální geny nejsou nezbytné pro klíčové procesy v organismu (centrální metabolismus, replikace DNA, translace), ale mohou organismu přinášet selekční výhodu (Zhang & Lin, 2009; Xu et al., 2011).

Pro studium funkce genů, mechanismů rezistence a dalších aspektů biologie organismů se často využívají různé přístupy sloužící k regulaci genové exprese. Za využití metod

genového inženýrství lze ovlivňovat míru genové exprese i u málo exprimovaných proteinů, částečně nefunkčních nebo u těch, které mají negativní účinky na buňku. Díky možnosti vytvořit linie s potlačenou (under expression) nebo zvýšenou (over expression) genovou expresí lze tyto metody využít v různých typech studií (Fire et al., 1998; Kapler et al., 1990).



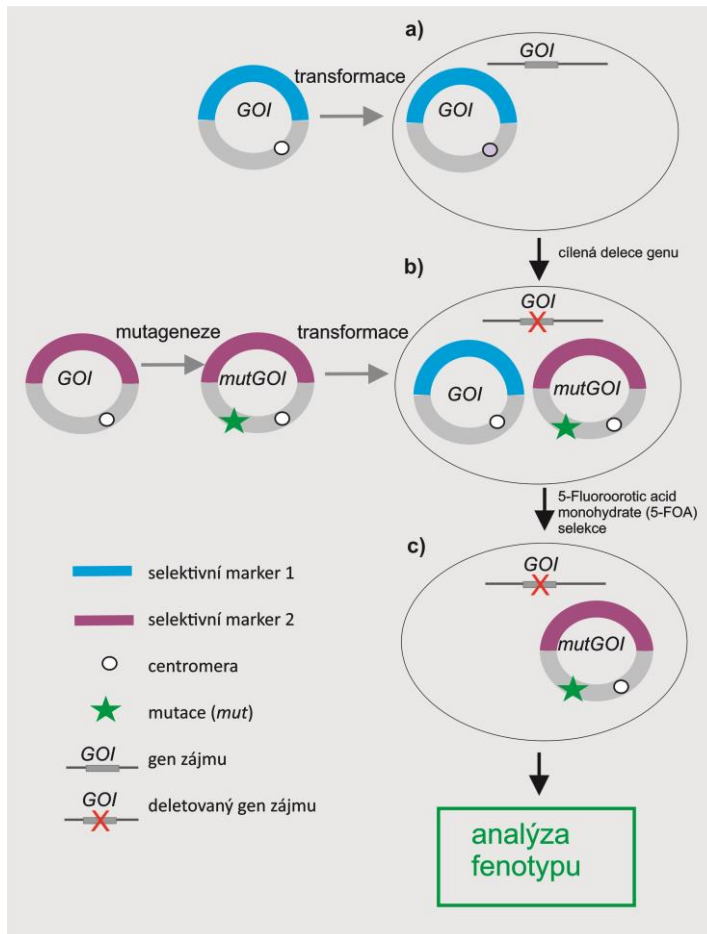
Obrázek 2. Přehled nejdůležitějších metod používaných v genovém inženýrství při studiu leishmanií (upraveno dle Duncan et al., 2017).

4 Metody

4.1 Plasmid shuffle (záměna plazmidů)

V posledních letech se při studiu esenciálních genů u leishmanií začíná používat metoda nazývaná plasmid shuffle (Duncan et al., 2017). Tato metoda byla zavedena ke studiu funkce esenciálních genů a funkčních vztahů proteinů v celém genomu kvasinek (Huang et al., 2008). Princip této metody je založen na naklonování esenciálního genu do plasmidu se selektivním markerem, který je následně vložen do buňky. V transformované buňce dojde k odstranění chromozomální kopie tohoto esenciálního genu. Poté se do buňky vloží na jiném plasmidu mutovaná forma genu s odlišným selektivním markerem (obrázek 2). V selektivním médiu rostou pouze buňky, které obsahují oba plasmidy, a tudíž na jednom z plasmidů nesou mutovanou formu genu. Pomocí dalšího selektivního média se buňka zbaví plasmidu

s nemutovanou kopií genu (Sikorski & Boeke, 1991; Fan & Xiao, 2021). Tyto buněčné linie s jedním plazmidem dále zkoumáme a zjišťujeme jejich fenotyp (Fan & Xiao, 2021).



Obrázek 3. Schéma metody plasmid shuffle. Metoda využívá a) naklonování esenciálního genu zájmu (GOI) do plasmidu se selektivním markerem (označen modře), který je následně vložen do buňky. Ve transformované buňce dojde k odstranění chromozomální kopie tohoto esenciálního genu. b) Poté se do buňky vloží na jiném plasmidu mutovaná forma genu s odlišným selektivním markerem (označen červeně). V selektivním médiu rostou pouze buňky, které obsahují oba plazmidy. c) Při další kultivaci v přítomnosti dalšího selektivního média se buňka zbaví plasmidu s nemutovanou kopií genu a tuto buněčnou linii s jedním plazmidem, který nese mutovanou formu genu využíváme k analýze fenotypu (upraveno dle Fan & Xiao, 2021).

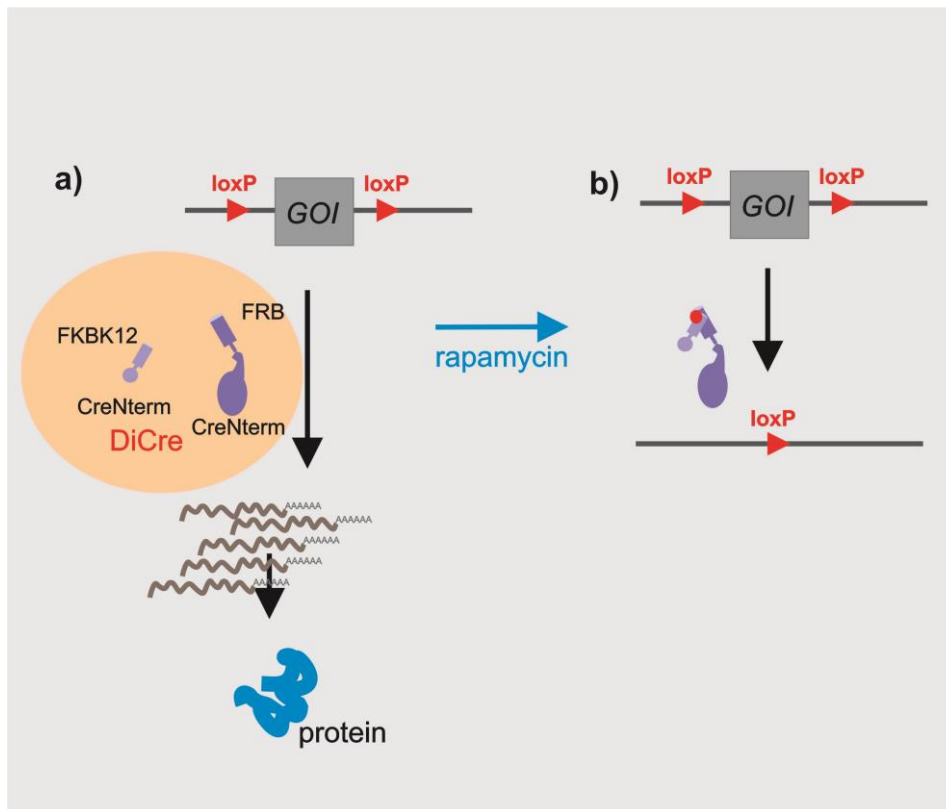
Tato metoda již byla použita i při studiu leishmanií. Murta et al. studovali esencialitu genu pro methenyltetrahydrofolát cyclohydrolázu (DHCH1) (Murta et al., 2009). Autoři zjistili, že se jedná o esenciální gen a prokázali, že aktivitu DHCH1 u leishmanií lze inhibovat DHCH inhibitorem, což z něj dělá jeden z kandidátních cílů pro terapii (Murta et al., 2009). Další skupina využila tuto metodu pro studium proteinu CYP51. Autoři prokázali, že tento gen je esenciální pro *L. donovani* a jeho inhibicí dojde k zastavení růstu a mohl by být využit při

léčbě viscerální leishmaniózy. Chromozomální knockout *CYP51* genů lze provést jen za podmínky epizomální komplementace, kdy parazit nemůže ztratit epizom ani v případě negativní selekce (McCall et al., 2015).

4.2 DiCre

DiCre je další metodou, s jejíž pomocí lze studovat esenciální geny, regulovat genovou expresi a zjišťovat, které geny jsou nezbytné pro buněčnou proliferaci a další klíčové procesy (Jullien et al., 2003; 2007). Původně se metoda využívající Cre rekombinázu používala u bakterií (Sauer & Henderson, 1988), u experimentů na kvasinkách (Sauer, 1987) a při zkoumání myších a dalších savčích buněk (Nagy, 2000). Cre rekombináza je protein izolovaný z bakteriofága P1, který patří do rodiny tyrosin rekombináz. Pro studium leishmanií byla důležitá modifikace enzymu na dimerizovatelnou Cre rekombinázu (DiCre), která má menší cytotoxický efekt než Cre (Hassan et al., 2001).

DiCre je metoda, díky které je možné provádět inducibilní knockout, a proto se často využívá pro studium esenciálních genů (Duncan et al., 2019). Principem metody je ohraničení cílového genu sekvencemi loxP. LoxP jsou místa o délce 34 bp, složené ze dvou 13 bp invertovaných repetitivních oddělených 8 bp dlouhým spacerem (Hoess et al., 1986). Tato místa rozpoznává Cre rekombináza, díky které následně dochází ke genetické modifikaci (místně-specifické rekombinaci). Po dimerizaci a následné aktivaci DiCre za pomoci rapamycinu dojde k rekombinaci mezi dvěma loxP místy a k odstranění ohraničeného místa (Jullien et al., 2003; 2007) (obrázek 4). V závislosti na orientaci loxP míst dojde k delecí nebo inzerci (cis orientace) nebo translokaci (trans orientace) studovaného genetického materiálu mezi jednotlivými chromozomy (Sternberg & Hamilton, 1981; Nagy, 2000). Následuje analýza fenotypu (Duncan et al., 2019). Účinnost enzymu lze kontrolovat zřizováním první jednotky s doménou FKBP12 (FK506-binding protein) a druhé s doménou FRB (binding domain of the FKBP12–rapamycin-associated protein) (Jullien et al., 2003; 2007; Duncan et al., 2019).



Obrázek 4. Schéma metody DiCre. Principem této metody je ohraničení genu zájmu (GOI) specifickými sekvencemi loxP. Tato místa rozpoznává dimerizovatelná Cre rekombináza (DiCre). a) Bez přítomnosti rapamycinu nedojde k dimerizaci a aktivaci DiCre, a tím nedojde k místně-specifické rekombinaci mezi dvěma loxP místy. Dochází tedy k transkripci genu zájmu a následné translaci za vzniku proteinu. b) V přítomnosti rapamycinu dojde k dimerizaci a následné aktivaci DiCre, která vede k rekombinaci mezi dvěma loxP místy a k odstranění (deleci) ohraničeného úseku DNA. Tímto inducibilním knockoutem nedojde k transkripci a nevzniká protein (upraveno dle Briquet et al., 2021).

4.2.1 Využití DiCre u *Leishmania* spp.

Upravená metoda DiCre je díky flexibilitě jeden z nejvýznamnějších nástrojů delecí cílových genů (Santos et al. 2017; Duncan et al., 2019; Van Duyne, 2021). Byla využita při studiu mnoha parazitických prvoků jako jsou na příklad *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* (Andenmatten et al., 2013; Collins et al., 2013) nebo různých druhů leishmanií (Duncan et al., 2016).

U *L. mexicana* byla využita DiCre metoda ke studiu esenciality Cdc2-příbuzné kinázy 3 (CRK3) (Duncan et al., 2016). CRK3 gen kóduje cdc2-příbuzný protein s kinázovou aktivitou vůči histonu H1 (Hassan et al., 2001) a je důležitý pro životního cyklus tohoto prvoka. Tato studie prokázala, že CRK3 funguje jako funkční homolog cyklin-dependentní kinázy 1 (Cdk1)

(hlavního regulátoru buněčného cyklu). Delece CRK3 u promastigotů vedla k zastavení růstu v G2/M fázi a autoři poukázali na terapeutickou využitelnost CRK3 (Duncan et al., 2016).

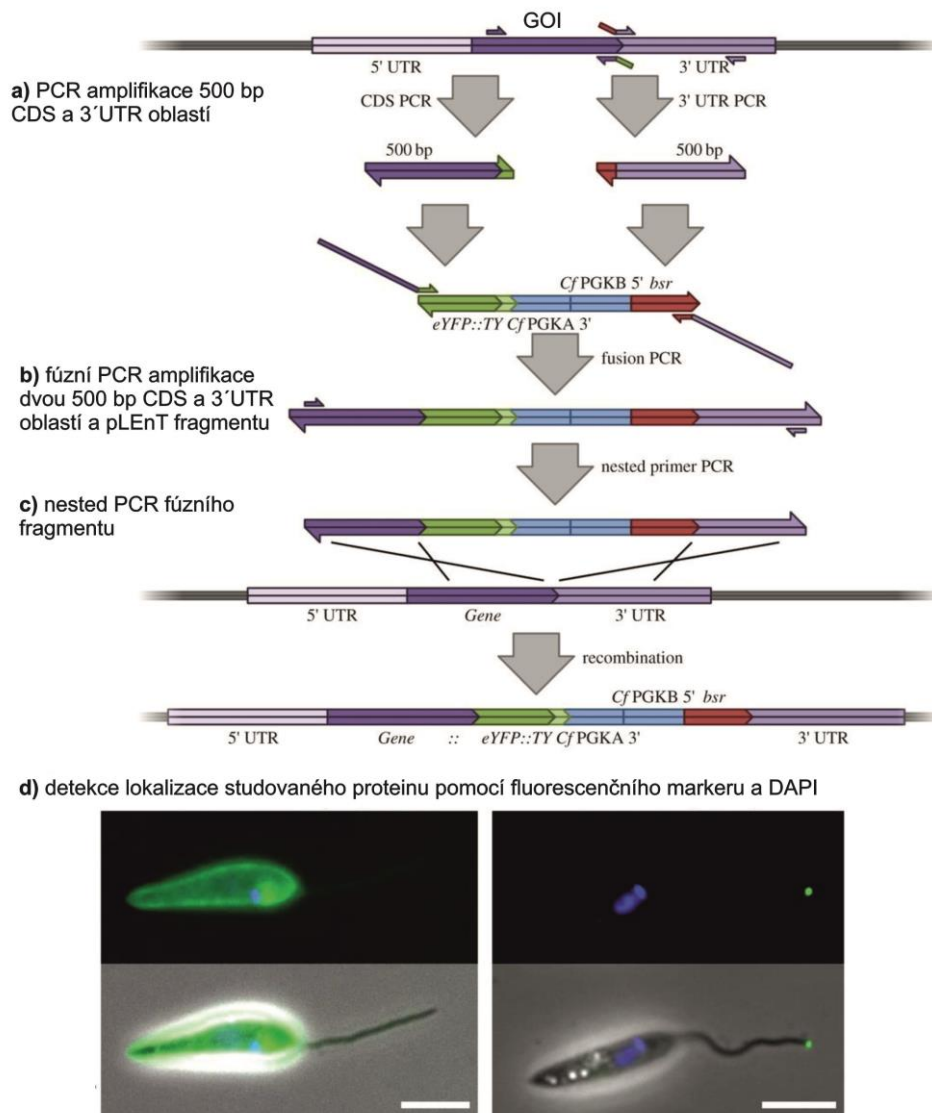
Další práce studovala účinky řízené exprese genu RAD9 kódující kontrolní protein Rad9, reagující na poškození DNA, pomocí DiCre rekombinázy u *L. major* (Santos et al., 2017). Při rapamycinem indukované aktivaci došlo k expresi genu, a to u integrované i epizomální kopie. Bylo zjištěno, že u procyklických promastigotů *L. major* je C-terminální doména kontrolního proteinu Rad9 nezbytná pro jeho správnou subcelulární lokalizaci (Santos et al., 2017).

4.3 Gene tagging (endogenous tagging)

Gene tagging je metoda, která umožňuje označit libovolné geny v genomu různých organismů a díky tomu sledovat jejich lokalizaci a na příklad porovnávat míru genové exprese během různých stádií životního cyklu (Halliday et al., 2019). Tato metoda, která byla poprvé popsána v 90. letech 20. století, využívá epitope tagging ke značení proteinů exprimovaných z plazmidů (Munro & Pelham, 1987). Postupně došlo k vývoji této metody a dnes se většinou využívá endogenous gene tagging, který umožňuje přímé označení proteinů v genomu organismu (Roberts et al., 2017). Přímé zabudování fluorescenční nebo jiné značky umožňuje sledovat míru genové exprese a lokalizovat ji bez nutnosti využití selekčního tlaku (Beneke et al., 2017; Kanca et al., 2017).

I přes své limitace se gene tagging stal účinným nástrojem genového inženýrství při studiu leishmanií (Dean et al., 2015). K tomu vytvořili autoři plazmid spojený s dlouhým PCR primerem pro fúzní PCR. Tento systém umožní vytvořit amplikony s dostatečně dlouhými homologními oblastmi pro cílenou integraci genů u *L. mexicana*, které kódují proteiny označené na obou koncích nebo v kódující sekvenci proteinu (obrázek 5). Systém je univerzální a umožňuje značení různých míst v celém genomu (Dean et al., 2015).

U leishmanií byla metoda gene tagging také využita k vizualizaci exprimovaných proteinů u promastigotů *L. amazonensis* s využitím plazmidu pNUS (Tetaud et al., 2001; 2002). Transformované buňky byly pěstovány dlouhodobě pod selekčním tlakem, pokud však bylo léčivo odstraněno, nebylo možno fluorescenci detekovat. Pro porovnání výsledků jednotlivých studií bylo důležité vytvoření zdroje referenčních organelových markerů pomocí značených proteinů (Halliday et al., 2019).



Obrázek 5. Gene tagging u leishmanií pomocí fúzní PCR a plazmidu pLENTv2. Metoda gene tagging, která umožňuje označení studovaných proteinů, je založena na a) amplifikaci dvou úseků genu zájmu (GOI): oblast CDS (coding DNA sequence) a oblast 3' UTR. b) Vzniklé dva fragmenty se dále spojí s fragmentem plazmidu (pLENTv2) pomocí fúzní PCR za vzniku dlouhého PCR produktu. c) Vzniklý fúzní PCR produkt je upraven pomocí nested PCR a vnesen na plazmidu do buněk. d) Protein je následně vizualizován fluorescenční značkou (převzato z Dean et al., 2015).

4.3.1 Gene tagging s využitím CRISPR/Cas9

Výrazného vylepšení metody gene tagging bylo dosaženo v kombinaci s metodou CRISPR/Cas9, díky čemuž je rychlejší, jednodušší, levnější a účinnější (Beneke et al., 2017). Metoda umožňuje vložit značku (tag) také za pomoci PCR produktu s krátkou homologní oblastí, což u samotného gene tagging není možné. Při využití CRISPR/Cas9 lze pomocí Cas9

vytvořit dvouvláknový zlom a v jeho okolí integrovat 30 bp homologní úsek ohraničené kazety (Canver MC et al, 2014). Další výhodou tohoto systému je jeho flexibilita díky sériím vektorů a dostupnosti mnoha epitopových a fluorescenčních markerů. Tento systém lze aplikovat pro N- i C-terminální značení. Nevýhodou tohoto přístupu je omezení pouze na kmeny leishmanií s exprimujícím funkčním CRISPR/Cas9 systémem (Beneke et al., 2017).

4.4 CRISPR/Cas9

4.4.1 Úvod, historie

Pravděpodobně nejvyužívanější metodou genového inženýrství je u leishmanií v dnešní době systém CRISPR/Cas9 (Cong & Zhang, 2015), jehož název pochází z anglické zkratky Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (česky segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice). Základem této metody byl objev CRISPR lokusu v genomu *Escherichia coli* v roce 1987, který obsahuje krátké přímé repetice oddělené krátkými sekvencemi (Ishino et al., 1987). O 20 let později následovalo objevení proteinů Cas, které s CRISPR RNA vytvářejí komplex schopný rozpoznat virové sekvence a štěpit je (Doudna & Charpentier, 2014).

U mikroorganismů – bakterií a archeí patří tento systém mezi složky adaptivní imunity (Cong & Zhang, 2015) působící proti virům a cizorodým plasmidům (Jinek et al., 2012). Během imunitní reakce jsou elementy cizorodých nukleových kyselin štěpeny pomocí RNA naváděné nukleázy (Makarova et al., 2011). Tento systém lze experimentálně upravit tak, aby mohl být použit k manipulaci s genomem. Mezi výhody tohoto systému patří jeho rychlost, finanční nenáročnost, účinnost a flexibilita. V dnešní době se nejčastěji používá systém CRISPR/Cas9 z Gram-pozitivní bakterie *Streptococcus pyogenes* (Ferretti et al., 2001). Celý postup se skládá několika kroků: výběru místa, molekulárního klonování, vnesení guide RNA (gRNA) a proteinu Cas9 do buněk. Následuje ověření místa štěpení a proběhlé modifikace genomu (inzerce, delece nebo homologní rekombinace) (Cong & Zhang, 2015; Beneke et al., 2017).

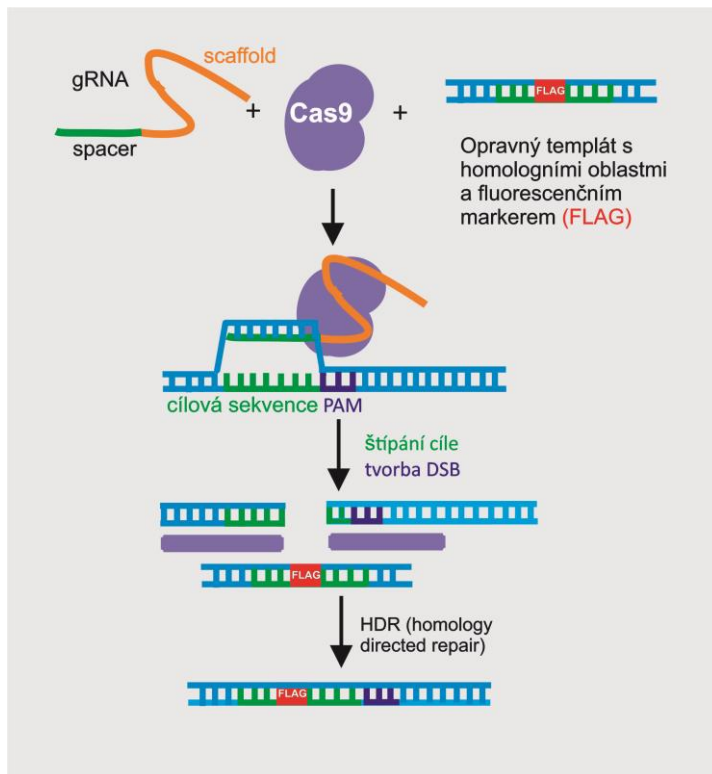
V posledních letech nahradil CRISPR/Cas9 podobné metody sloužící k úpravě genomu, na příklad metody využívající zinc-finger nucleases (ZNFs) nebo transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (Ran et al., 2013).

4.4.2 Rozdělení systémů, protein Cas9

U bakterií a archeí rozlišujeme tři typy (I-III) CRISPR systémů. Každý z nich obsahuje skupinu CRISPR-asociovaných (Cas) genů, nekódující RNA a přímé repetice proložené krátkými

variabilními sekvencemi (Makarova et al., 2011; Ran et al., 2013). Složky adaptivní imunity fungují ve třech krocích: (i) vložení krátké sekvence spaceru do uspořádání CRISPR, (ii) transkripce, maturace prekurzorové crRNA (pre-crRNA) a tvorba individuálních crRNA a (iii) štěpení nukleové kyseliny Cas proteiny řízené crRNA (Makarova et al., 2011).

V genovém inženýrství se nejčastěji využívá systém typu II obsahující protein Cas9, který je vhodný pro generaci crRNA a štěpení cílové DNA (Makarova et al., 2011). Cas9 je RNA dependentní DNA endonukleáza obsahující dvě nukleázové domény: doménu podobnou RuvC blízko amino-konce a doménu HNH (McrA-like doménu) uprostřed proteinu, která je zodpovědná za cílové štěpení. Systém II štěpí pre-crRNA za tvorby duplexu mezi *trans*-encoded small RNA (tracrRNA) a částí repetice v pre-crRNA. První štěpení pre-crRNA probíhá v oblasti repetice. Štěpení je katalyzované RNasou III za přítomnosti Cas9 (Makarova et al., 2011). Lokusy CRISPR se většinou skládají z několika nesouvislých přímých repetic oddělených spacersy, asociovanými s geny Cas (Barrangou, 2007). Tyto vymezené úseky DNA kódují součásti crRNA a operon genů *cas* kóduje součásti Cas proteinu (Doudna & Charpentier, 2014). Spojením zralé crRNA spárované s *trans*-aktivující tracrRNA dochází k řízení proteinu Cas9 asociovaného s CRISPR, který tvoří místně specifické dvouvláknové zlomy na cílové DNA. V místech komplementárních k crRNA-guide sekvenci vyštěpí HNH nukleázová doména Cas9 komplementární vlákno a RuvC-like doména Cas9 štěpí nekomplementární vlákno DNA. Tyto dvě RNA, které navádí Cas9, mohou být zfúzované dohromady (3' konec crRNA a 5' konec tracrRNA) a vytvořit single-guide RNA (sgRNA) (Jinek et al., 2012). Tyto dvě domény, stejně tak protein Cas9, lze dále mutovat a rozšiřovat jejich funkce a vylepšovat specifitu (Makarova et al., 2011). Pomocí 20-nukleotidové (nt) sekvence lze Cas9 přemístit téměř k jakémoliv cílové DNA v bezprostřední blízkosti protospacer-sousedícího motivu (PAM) (obrázek 6). Tímto přístupem lze generovat specifické mutace pomocí oprav dvouvláknových zlomů DNA (Jinek et al., 2012). Pro dopravení sgRNA k cílové DNA lze využít PCR amplikony obsahující expresní kazetu nebo plazmidy exprimující sgRNA (Ran et al., 2013).



Obrázek 6. Schéma systému CRISPR/Cas9. Metoda je založena na schopnosti Cas9 proteinu přemístit jakýkoliv DNA templát s využitím krátké nekódující navádějící RNA (gRNA). Tato gRNA se skládá z cílově specifické RNA (crRNA) a pomocné trans-aktivační crRNA (tracrRNA) a navede Cas9 na specifický genomový lokus pomocí párování bází mezi crRNA a cílovou sekvencí. Pro štěpení je nezbytný protospacer-sousedící motiv (PAM), což je 3 nukleotidový sekvenční motiv v cílové DNA. Po vazbě k cílové sekvenaci Cas9 iniciuje specifický dvouvláknový zlom (DSB, double-strand break), který je následně opraven pomocí homology directed repair (HDR) nebo jiných buněčných reparačních mechanismů (upraveno dle Addgene, 2022).

4.4.3 CRISPR/Cas9 u *Leishmania* spp.

První zmínka o vydařeném genovém knockoutu pomocí CRISPR u leishmanií pochází z roku 2015 (Sollelis et al., 2015; Zhang & Matlashewski, 2015). Metoda je založená na opravách dvojitých zlomů (double strand breaks – DSB), např. pomocí single-strand annealing (SSA), microhomology-mediated end joining (MMEJ) nebo homology-directed repair (HDR) kazet (Zhang & Matlashewski, 2019). U jiných organismů se tyto zlomy opravují také pomocí mechanismu non-homologous end joining (NHEJ) (Jinek et al., 2012), který ale u leishmanií chybí (Zhang & Matlashewski, 2015).

Konkrétně Sollelis et al., 2015 použili CRISPR/Cas9 u *L. major*. Autoři použili jednokolovou transfekci dvou plasmidů ke knockoutu lokusu 2 kódujícího paraflagelární tyč.

Na jednom plasmidu docházelo k expresi Cas9 a druhý nesl sgRNA pod kontrolou U6snRNA promotoru dohromady s donorovou DNA (Sollelis et al., 2015). Ve stejném roce byl představen také přístup umožňující delecii, inzerci a C-koncové značení genů u *L. donovani* (Zhang & Matlashewski, 2015). Později byl systém vylepšen pomocí triple guide RNA (gRNA) expresního vektoru, díky kterému se podařilo deletovat všech 11 genů multigenové rodiny A2. Dále došlo k inovaci v použití jen jednoho plasmidu umožňujícím expresi Cas9 a transkripci sgRNA pod promotorem RNA polymerázy I u *L. donovani*, *L. major* a *L. mexicana* (Zhang et al., 2017).

Významným milníkem pro využití a automatizaci celého procesu bylo vytvoření online platformy LeishGEdit.net umožňující automatický návrh potřebných primerů, čímž byl rapidně zrychlen proces generace mutantních linií (Beneke et al. 2017). Autoři dále vytvořili parentální linie *L. mexicana* nesoucí plasmid obsahující Cas9 a T7 RNA polymerázu. Pomocí PCR byly generovány templáty, které byly po transfekci do leishmanií transkribovány *in vivo* T7 RNA polymerázou. Díky PCR expresi DNA konstruktů je možné rychle a spolehlivě provádět modifikace leishmanií během několika hodin a za použití pouze jednoho kola transfekce generovat nulové mutanty u promastigotů *L. major* a *L. mexicana* (Beneke et al., 2017). V dalších letech stejní autoři vytvořili sérii plasmidů pT a pPLOT, jejichž využití výrazně urychlilo a zjednodušilo celý proces generace buněčných linií (Beneke & Gluenz, 2019). Tyto plazmidy jsou nyní dostupné na portálu LeishGEdit.net. Beneke & Gluenz, 2020 pokračovali ve vývoji CRISPR pomocí unikátních 17 nukleotidových kódů (barcodes), které umožnily sledovat několik mutantních linií současně. Každý mutant je označen specifickým barcodem, vložen do studovaného systému a po určitém časovém intervalu je izolována DNA. Pomocí sekvenování nové generace se kvantifikuje množství jednotlivých mutantů. Bar-seq primery je možno získat pro všechny geny z databáze TriTrypDB (Beneke & Gluenz, 2020).

Jelikož z důvodu aktivního systému RNAi nelze u *L. braziliensis* úspěšně využít epizomálních vektorů (Lye et al., 2010), byla vytvořena linie *L. braziliensis* exprimující protein Cas9 a T7 RNA polymerázu umožňující knockout a další úpravy genů (Espada et al., 2021) např. mezi nejnovější studie patří úspěšná delece *Cen* genu pomocí systému CRISPR/Cas9 a generace živých atenuovaných parazitů vhodných pro využití jako infekčních modelů (Volpedo et al., 2022). Další studie zkoumala životaschopnost *L. braziliensis Cen*^{-/-} kmenu vytvořených pomocí CRISPR/Cas9. Při *in vitro* pokusech byla prokázána horší životaschopnost buněk a při *in vivo* pokusech nedocházelo u infikovaných zvířat ke tvorbě lézí. Na základě těchto pokusů autoři označili tuto linii jako vhodného kandidáta pro další testování při tvorbě vakcíny proti jihoamerické leishmanióze (Sharma et al., 2022). Díky výše popsaným

vlastnostem se *Cen*^{-/-} leishmanie jeví jako vhodný model k vývoji vakcíny pro lidi, která stále chybí a z důvodu omezené dostupnosti léků by její zavedení představovalo v endemických oblastech účinnou zbraň v boji proti leishmanióze (Volpedo et al., 2022).

4.4.4 Výhody a limitace CRISPR/Cas9 systému

Systém CRISPR je porovnání s ostatními využitelnými metodami jednodušší na design, vysoce specifický, účinný a vhodný pro editaci genomu různých buněk a organismů (Ran et al., 2013). Mezi výhody CRISPR/Cas9 patří možnost odstranit více alel určitého genu v jednom kole selekce, protože u leishmanií jsou důležité geny často kódovány na nadpočetných chromozomech (Rogers et al., 2011). Systém je také možno využít při studiu genové dóze u leishmanií, která pravděpodobně hraje roli v rezistenci proti lékům, virulenci a rychlé adaptaci promastigotů i amastigotů v médiu nebo *in vivo* (Leprohon et al., 2014). V neposlední řadě je výhodou systému jeho rychlost, protože při delších kultivacích a manipulacích *in vitro* ztrácí parazit virulenci. Současnou limitací této metody je nedostatek inducibilních systémů CRISPR/Cas9 potřebných k delecí esenciálních genů. Tuto limitaci by mohla překonat podmíněná aktivace CRISPR/Cas9, například pomocí split-Cas9 nebo tetracyklinem indukovanou expresí (Nguyen et al., 2016). Další výzkum a optimalizace této metody by mohl přinést možnost celogenomových studií k identifikaci esenciálních genů, které kódují možné cíle terapie (Zetsche et al., 2015; Nguyen et al., 2016).

4.5 RNA interference

RNAi je další metoda genového inženýrství umožňující snížení genové exprese (Fire et al., 1998; Kolev et al., 2011). Princip této metody je založen na štěpení dvouvláknové RNA (ds) na malé duplexy v přítomnosti dvou Dicer-like enzymů (DCL1 a DCL2). Malé duplexy dsRNA následně jsou štěpeny na single strand (ss) small interference RNA (siRNA) a využity jako naváděcí sekvence enzymem Argonaut. Dicer následně dimerizuje s faktorem R2D2 a společně s duplexem siRNA vytváří iniciační komplex (RDI). Vytvoření tohoto komplexu je nezbytné pro vytvoření RNA-inducing silencing komplexu (RISC) a následnou degradaci celého transkriptu, čímž ve výsledku dochází ke snížení exprese proteinů (Liu et al., 2003).

U parazitických protist, konkrétně u *T. brucei*, byla RNAi objevena v roce 1998 (Ngô et al., 1998). Z důvodu ztráty Dicer-like a Argonaute proteinů selekčním tlakem v průběhu evoluce je RNAi dráha nefunkční u většiny druhů leishmanií, mezi které patří *L. major*, *L. donovani* a *L. mexicana*, a z toho důvodu nevyužitelná k funkční analýze genů (Lye et al., 2010; Ullu et al., 2004; Cerutti & Casas-Mollano, 2008). Přítomnost dráhy RNAi byla potvrzena u *L.*

(*Viannia braziliensis*) umožňující její využití pro regulaci exprese reportérových a endogenních genů (Lye et al., 2010). Lye et al., 2010 se zabývali umlčením exprese genů pomocí RNAi u *L. braziliensis*, které bylo úspěšné pro geny kódující proteiny paraflagelární tyče. Další studie se zabývala *Leishmania RNA virus 1* (LRV1) u *L. braziliensis* a *L. guyanensis*. Tento virus je zodpovědný za zvýšenou virulenci a dokáže přežít i v případě aktivní dráhy RNAi. Za pomoci RNAi byly generovány LRV1 negativní linie, které v infikovaných makrofázích nevyvolávaly zánětlivou cytokinovou odpověď (Brettmann et al., 2016).

4.6 Další metody

V poslední době se u leishmanií používá také několik dalších metod genového inženýrství, na příklad inducibilní expresní systémy (Yan et al., 2001), destabilizace proteinů pomocí destabilizačních fúzních domén (Madeira da Silva et al., 2009) nebo dihydrofolát reduktázových domén (Podešvová et al., 2017), delece substitucí alel (Cruz et al., 1991), zvýšení genové exprese a heterologní exprese (Kapler et al., 1990) a cos-seq metoda (Gazanion et al., 2016). Těmito metodami se v této práci ale nezabývám z důvodu menší využívanosti než u výše popsaných metod (Santi & Murta., 2022).

5 Závěr

Přestože leishmanióza patří mezi závažná parazitární onemocnění, stále nejsou známy funkce všech genů a proteinů v tomto organismu a jejich vztah k patogenicitě. Moderní metody genomového inženýrství otevírají nové možnosti manipulace s genomem leishmanií, což je důležité nejen pro samotné vědecké poznání, ale také pro nalezení nových terapeutických cílů a léků.

Mezi nejvíce využívané metody pro studium leishmanií patří v současnosti CRISPR/Cas9, RNA interference (RNAi), dimerizovatelná Cre rekombináza (DiCre), plasmid shuffle a gene tagging (tabulka 1). V poslední době se u leishmanií zavádí také inducibilní expresní systémy, metody destabilizace proteinů, delece substitucí alel, zvýšení genové exprese, heterologní exprese a cos-seq metody, ale tyto metody se prozatím využívají jen zřídka. Každá z metod má své výhody a nevýhody a volba závisí na zaměření studie.

V současné době patří mezi nejdůležitější metody genomového inženýrství CRISPR technologie, kterou lze využít ke generování mutantních fenotypů u leishmanií a dalších patogenních organismů. I přes relativně krátkou existenci překonal systém CRISPR/Cas9 starší metody genomové manipulace v mnoha parametrech. Metoda CRISPR/Cas9 umožňuje nejen funkční analýzu genů, ale také celogenomový screening, studium regulace genové exprese i značení proteinů, které lze využít k jejich lokalizaci. I když je CRISPR/Cas9 v současnosti nejčastěji využívaným nástrojem pro genomové úpravy leishmanií, je stále ještě ve stádiu vývoje a hledají se nové modifikace, zjednodušují se pracovní postupy a vyvíjí se nové buněčné linie a plazmidy. Mezi největší výhody tohoto systému patří jeho rychlost, finanční nenáročnost, účinnost a flexibilita, ale také komerční dostupnost chemikálií a jednotlivých komponent k provádění experimentů. Ukazuje se, že lze také překonat současné limitace z důvodu nedostatečné aktivace CRISPR/Cas9 u některých druhů leishmanií, a to využitím nových linií a indukovanou expresí, na příklad pomocí split-Cas9 nebo indukovanou expresí tetracyklinem.

Další vhodnou metodou pro studium leishmanií je DiCre, která umožňuje studovat esenciální geny, regulovat genomovou expresi a zjišťovat, které geny jsou nezbytné pro buněčnou proliferaci a další klíčové procesy. Rozvoji této metody u leishmanií předcházela objev dimerizovatelné Cre rekombinázy, která je pro ně méně toxická než samotná Cre. Další z metod využívaných u leishmanií je RNAi. Její široké použití je však limitováno u většiny druhů leishmanií, na příklad u *L. major*, *L. donovani* a *L. mexicana*, a to z důvodu absence dráhy RNAi, která byla ztracena při větvení podrodu *Viannia*. Také plasmid shuffle lze využít ke studiu esenciálních genů u leishmanií, které by mohly být terapeuticky využitelné. Další z metod nazývaná gene tagging se pak převážně využívá pro studium proteinů a jejich

lokalizace ve viabilním systému. Zejména její spojení s CRISPR/Cas9 nabízí velmi účinný nástroj pro studium virulence leishmanií. Obecně lze říci, že důležitým faktorem při výběru metody pro gene tagging je její rychlost a způsob značení proteinu. Vzhledem k tomu, že samotné značení proteinu může také ovlivňovat jeho funkci, je žádoucí omezit manipulaci na minimum a zavést systém kontrol pro ověření, že k něčemu takovému nedošlo, stejně jako při využití ostatních metod.

Většina prací zapojujících nové metody genového inženýrství u leishmanií byla provedena na čtyřech nejrozšířenějších druzích: *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* a *L. braziliensis*. Díky těmto metodám se tyto druhy stávají v poslední době lépe prostudované a díky tomu slouží jako modelové organismy pro výzkum i ostatních druhů. Dále je nutné zmínit, že je často nezbytné postupy metod genového inženýrství využívané u jiných organismů modifikovat a optimalizovat pro studium leishmanií. To vede k větší finanční i časové náročnosti při zavádění moderních metod u těchto parazitů. Navíc u některých druhů leishmanií došlo ke změnám genomu, které komplikují využití těchto metod. Jedním z příkladů je výše zmíněná nefunkčnost RNAi dráhy z důvodu ztráty jejích klíčových komponent, což neumožňuje využít metodu RNAi u parazitů z podrodů *Leishmania* a *Sauroleishmania*. Dalším příkladem je nedostatek inducibilních systémů CRISPR/Cas9 potřebných k delecii esenciálních genů u některých druhů leishmanií, která limituje využití tohoto systému. Některé limitace týkající se využitelnosti CRISPR/Cas9 se již daří překonávat, na příklad vytvořením parentální linie *L. mexicana* nesoucí plasmid obsahující Cas9 a T7 RNA polymerázu nebo přípravou buněčných linií se zabudováním těchto klíčových komponent do genomické DNA.

Přestože publikované práce u leishmanií většinou studují jeden gen nebo protein, v budoucnosti se očekává studium celé řady genů a proteinů současně. Revoluční byl popis barkódů, které umožňuje kvantifikovat desítky až stovky jednotlivých mutantů současně pomocí sekvenování nové generace. Tato metoda nabízí možnost sledovat všechny mutantní linie v různých časových intervalech najednou. Výhodou je, že barkódy pro všechny geny jsou veřejně dostupné v databázi TriTrypDB. Dále je dostupná také celá řada vhodných primerů, plasmidů a buněčných linií pro manipulace s leishmaniemi na online portálu LeishGEdit.net. Využití těchto online databází umožňuje nejen zrychlení návrhu primerů, ale také možnost srovnání výsledků pocházejících z různých laboratoří. Pro porovnání výsledků jednotlivých studií bylo také důležité vytvoření zdroje referenčních organelových markerů pomocí značených proteinů, která byla publikována v roce 2019.

V současné době vzniká také celá řada projektů, které se zabývají genetickými modifikacemi leishmanií, jako je na příklad projekt LeishGEM (<http://leishgem.org/>). Tento

projekt využívá vysoce výkonné genetické nástroje k pochopení patogenicity leishmanií. Projekt využívá reverzní genetiky a studuje fenotypy *in vitro* a *in vivo* v myších modelech s cílem sledovat změny jejich chování (množení, pohyb, přežívání, tvorba lézí atd.). Projekt má dvě fáze, kdy se na základě prvotního screeningu vytipovávají klíčové geny pro jejich následnou hlubší analýzu. V projektu je zapojena řada mezinárodních pracovišť.

Očekávaný vývoj stále dokonalejších nástrojů molekulární biologie v budoucnosti umožní nejen pochopit procesy a příspěvek jednotlivých genů k chování leishmanií, ale také identifikovat nové terapeutické cíle k léčbě této nemoci. Očekává se také, že rozvoj metod genového inženýrství pro vektory onemocnění, o kterých je dosud jen velmi málo známo, umožní v budoucnosti lepší pochopení leishmaniózy.

Tabulka 1. Přehled nejdůležitějších metod genového inženýrství využívaných při studiu leishmanií

Metoda	Použití	Limitace, klady, zápory
Gene tagging	Lokalizace cílových proteinů	Univerzálně použitelný
CRISPR/Cas9	Studium neesenciálních genů	Velmi perspektivní, rychlé, zdokonalování systému pro práci s esenciálními geny
DiCre	Studium esenciálních genů	Přímá možnost studia fenotypu – biologický kontext, méně časově náročné než plasmid shuffle
RNAi	Studium esenciálních genů	Změny nejsou trvalé, fungují pouze u některých druhů
Plasmid shuffle	Studium funkce proteinů	Přímá možnost studia fenotypu – biologický kontext, časově náročné

6 Literatura

- Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ, Jullien N, Herman JP, Meissner M. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*. 2013;10(2):125-127.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-1712.
- Becvar T, Vojtkova B, Siriyasatien P, Votypka J, Modry D, Jahn P, Bates P, Carpenter S, Volf P, Sadlova J. Experimental transmission of *Leishmania (Mundinia)* parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *PLoS Pathog*. 2021;17(6):e1009654.
- Beneke T, Gluenz E. Bar-seq strategies for the LeishGEdit toolbox. *Mol Biochem Parasitol*. 2020;239:111295.
- Beneke T, Gluenz E. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. *Methods Mol Biol*. 2019;1971:189-210.
- Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci*. 2017;4(5):170095.
- Bramwell KK, Teuscher C, Weis JJ. Forward genetic approaches for elucidation of novel regulators of Lyme arthritis severity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:76.
- Brettmann EA, Shaik JS, Zangger H, Lye LF, Kuhlmann FM, Akopyants NS, Oswald DM, Owens KL, Hickerson SM, Ronet C, Fasel N, Beverley SM. Tilting the balance between RNA interference and replication eradicates *Leishmania RNA virus 1* and mitigates the inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(43):11998-12005.
- Briquet S, Gissot M, Silvie O. A toolbox for conditional control of gene expression in apicomplexan parasites. *Mol Microbiol*. 2022;117(3):618-631.
- Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2014;289(31):21312-24.
- Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Front Immunol*. 2014;5:480.
- Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*. 2006;50(2):81-99.
- Collins CR, Das S, Wong EH, Andenmatten N, Stallmach R, Hackett F, Herman JP, Müller S, Meissner M, Blackman MJ. Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol Microbiol*. 2013;88(4):687-701.

Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol.* 2015;1239:197-217.

Cruz A, Coburn CM, Beverley SM. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7170-4.

Dean S, Sunter J, Wheeler RJ, Hodgkinson I, Gluenz E, Gull K. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* 2015;5(1):140197.

Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096.

Duncan SM, Jones NG, Mottram JC. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 2017;216:30-38.

Duncan SM, Myburgh E, Alves-Ferreira EV, Mottram JC. DiCre-Based Inducible Disruption of *Leishmania* Genes. *Methods Mol Biol.* 2019;1971:211-224.

Duncan SM, Myburgh E, Philipon C, Brown E, Meissner M, Brewer J, Mottram JC. Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. *Mol Microbiol.* 2016;100(6):931-944.

Espada CR, Quilles JC Jr, Albuquerque-Wendt A, Cruz MC, Beneke T, Lorenzon LB, Gluenz E, Cruz AK, Uliana SRB. Effective Genome Editing in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Stably Expressing Cas9 and T7 RNA Polymerase. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:772311.

Fan L, Xiao W. Study Essential Gene Functions by Plasmid Shuffling. *Methods Mol Biol.* 2021;2196:53-62.

Ferreira MG, Fattori KR, Souza F, Lima VM. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2009;165(1-2):150-154.

Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najjar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(8):4658-63.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-811.

Ogden GB, Melby PC. *Leishmania*. Editor: Schaechter M. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, 2009, s. 663-673. ISBN 9780123739445.

Gazanion É, Fernández-Prada C, Papadopoulou B, Leprohon P, Ouellette M. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(21):E3012-21.

Halliday C, Billington K, Wang Z, Madden R, Dean S, Sunter JD, Wheeler RJ. Cellular landmarks of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 2019;230:24-36.

Hardy S, Legagneux V, Audic Y, Paillard L. Reverse genetics in eukaryotes. *Biol Cell*. 2010;102(10):561-580.

Hassan P, Fergusson D, Grant KM, Mottram JC. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;113(2):189-198.

Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(5):2287-300.

Huang Z, Sugang RS, Lin YY, Shi X, Boeke JD, Pan X. Plasmid-chromosome shuffling for non-deletion alleles in yeast. *Nat Methods*. 2008;5(2):167-169.

Chanmol W, Jariyapan N, Somboon P, Bates MD, Bates PA. Development of *Leishmania orientalis* in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and the biting midge *Culicoides soronensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta Trop*. 2019;199:105157.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.

Robert JS, Baylis F. Genetic Engineering. Editor: Heggenhougen HK. International Encyclopedia of Public Health. Academic Press, 2008, s. 35-39. ISBN 9780123739605.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821.

Jullien N, Goddard I, Selmi-Ruby S, Fina JL, Cremer H, Herman JP. Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre). *PLoS One*. 2007;2(12):e1355.

Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, Herman JP. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(21):e131.

Kanca O, Bellen HJ, Schnorrer F. Gene Tagging Strategies To Assess Protein Expression, Localization, and Function in *Drosophila*. *Genetics*. 2017;207(2):389-412.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol*. 1990;10(3):1084-94.

Kazemi B. Genomic organization of leishmania species. *Iran J Parasitol*. 2011;6(3):1-18.

Leprohon P, Fernandez-Prada C, Gazanion É, Monte-Neto R, Ouellette M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014;5(1):26-35.

- Kolev NG, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryot Cell*. 2011;10(9):1156-63.
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*. 2003;301(5641):1921-5.
- Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, Tschudi C, Ullu E, Beverley SM. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001161.
- Madeira da Silva L, Owens KL, Murta SM, Beverley SM. Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7583-8.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-477.
- McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G, Johnston JB, Chen S, Kellar D, Siqueira-Neto JL, Roush WR, Podust LM, McKerrow JH. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003588.
- Munro S, Pelham HR. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70. *EMBO J*. 1984;3(13):3087-93.
- Murta SM, Vickers TJ, Scott DA, Beverley SM. Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase and the synthesis of 10-CHO-THF are essential in *Leishmania major*. *Mol Microbiol*. 2009;71(6):1386-401.
- Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26(2):99-109.
- Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14687-92.
- Nguyen DP, Miyaoka Y, Gilbert LA, Mayerl SJ, Lee BH, Weissman JS, Conklin BR, Wells JA. Ligand-binding domains of nuclear receptors facilitate tight control of split CRISPR activity. *Nat Commun*. 2016;7:12009.
- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of *Leishmaniasis*. *Clin Infect Dis*. 1996;22(1):1-13.
- Podešvová L, Huang H, Yurchenko V. Inducible protein stabilization system in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 2017;214:62-64.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-2308.

Roberts B, Haupt A, Tucker A, Grancharova T, Arakaki J, Fuqua MA, Nelson A, Hookway C, Ludmann SA, Mueller IA, Yang R, Horwitz R, Rafelski SM, Gunawardane RN. Systematic gene tagging using CRISPR/Cas9 in human stem cells to illuminate cell organization. *Mol Biol Cell*. 2017;28(21):2854-2874.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res*. 2011;21(12):2129-42.

Santi AMM, Murta SMF. Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:826287.

Santos RERS, Silva GLA, Santos EV, Duncan SM, Mottram JC, Damasceno JD, Tosi LRO. A DiCre recombinase-based system for inducible expression in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2017;216:45-48.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5166-70.

Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987;7(6):2087-96.

Seblova V, Sadlova J, Vojtkova B, Votypka J, Carpenter S, Bates PA, Volf P. The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0004060.

Sharma R, Avendaño Rangel F, Reis-Cunha JL, Marques LP, Figueira CP, Borba PB, Viana SM, Beneke T, Bartholomeu DC, de Oliveira CI. Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;11:790418.

Sikorski RS, Boeke JD. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol*. 1991;194:302-318.

Sollelis L, Ghorbal M, MacPherson CR, Martins RM, Kuk N, Crobu L, Bastien P, Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Sterkers Y. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol*. 2015;17(10):1405-1412.

Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*. 1981;150(4):467-486.

Tetaud E, Lecuix I, Sheldrake T, Baltz T, Fairlamb AH. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(2):195-204.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. *Leishmaniasis*: a review. *F1000Res*. 2017;6:750.

Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2004;6(6):509-519.

Van Duyne GD. Cre Recombinase. *Microbiol Spectr*. 2015;3(1):MDNA3-0014-2014.

Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Holcomb EA, Zhang WW, Lypaczewski P, Cox B, Fultz R, Mishan C, Verma C, Huston RH, Wharton AR, Dey R, Karmakar S, Oghumu S, Hamano S, Gannavaram S, Nakhasi HL, Matlashewski G, Satoskar AR. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. *NPJ Vaccines*. 2022;7(1):32.

Xu P, Ge X, Chen L, Wang X, Dou Y, Xu JZ, Patel JR, Stone V, Trinh M, Evans K, Kitten T, Bonchev D, Buck GA. Genome-wide essential gene identification in *Streptococcus sanguinis*. *Sci Rep*. 2011;1:125.

Yan S, Myler PJ, Stuart K. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;112(1):61-69.

Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol*. 2015;33(2):139-142.

Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D455-458.

Zhang WW, Lypaczewski P, Matlashewski G. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for *Leishmania* and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms. *mSphere*. 2017;2(1):e00340-16.

Zhang WW, Matlashewski G. CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. *mBio*. 2015;6(4):e00861.

Zhang WW, Matlashewski G. Single-Strand Annealing Plays a Major Role in Double-Strand DNA Break Repair following CRISPR-Cas9 Cleavage in *Leishmania*. *mSphere*. 2019;4(4):e00408-19.

Internetové zdroje

Addgene, 2022, <https://www.addgene.org/crispr/tagging/> [3. 5. 2022]

Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2022, <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> [3. 5. 2022]

WHO, 2022, <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [27. 4. 2022]