

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ondřej Brzoň

Regulace genové exprese u anaerobních parazitických protist a využití poznatků v praxi

Regulation of gene expression in anaerobic parasitic protist and practical application of knowledge

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Zuzana Zubáčová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

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

V Praze dne 12. 5. 2014

Ondřej Brzoň

Poděkování:

V první řadě bych rád poděkoval své školitelce, Zuzce Zubáčové, za všechny rady a připomínky bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Poděkovat bych chtěl také Anie Karnkowské za společné diskuze o promotorech, které mi při sepisování práce také velmi pomohly. A dále pak všem, kteří mě během celého studia podporovali.

Abstrakt

Vzhledem ke svému významu pro každou buňku je dnes regulace genové exprese často studovaná na všech svých úrovních. Na druhou stranu, informace o regulaci genové exprese u protist jsou prozatím omezeny prakticky pouze na několik modelových organismů. Z anaerobních protist se jedná zejména o tři druhy parazitující u člověka: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* a *Giardia intestinalis*. Teprve v poslední době se výzkum rozšířil i na některé další organismy (např. *Entamoeba invadens* nebo některé druhy rodu *Spiroucleus*).

Tato práce se zabývá regulací genové exprese na úrovni struktury promotorových oblastí genů kódujících proteiny a využitím těchto poznatků při konstrukci transfekčních systémů, které jsou jedním z nejefektivnějších a nejsilnějších nástrojů studia molekulární a buněčné biologie.

Klíčová slova: promotor, 5`upstream, 3`downstream, UTR, transkripce, mRNA, genom, transfekční systém, elektroporace, *Trichomonas*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Spiroucleus*

Abstract

Because of its importance for every single cell, regulation of gene expression is often studied at all levels today. On the other hand, rather sparse amount of information is available for protists and our understanding of their gene expression is nearly limited to several model organisms. Three anaerobic human parasites have been studied in details: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis*. Most recently, some others anaerobic protists (e.g. *Entamoeba invadens* or some species of *Spiroucleus* genus) have been researched as well.

This work is focused on the structure of promoter regions in protein coding genes and application of this knowledge in construction of transfection systems as one of the most effective and powerful tools in molecular and cell biology.

Key words: promoter, 5`upstream, 3`downstream, UTR, transcription, mRNA, genome, transfection system, electroporation, *Trichomonas*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Spiroucleus*

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Struktura promotorů genů kódujících proteiny	2
3. Transfekční systémy.....	3
4. Trichomonády.....	5
4.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
5. Entaméby.....	9
5.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	9
5.2. <i>Entamoeba invadens</i>	13
6. Diplomonády.....	14
6.1. <i>Giardia intestinalis</i>	14
6.2. <i>Spiroucleus</i> spp.	19
7. Závěr	22
8. Literatura.....	23

1. Úvod

Regulace genové exprese je základním mechanismem každé buňky, díky němuž může regulovat svůj vývoj, udržovat homeostázu a přizpůsobovat se okolnímu prostředí. Studium genové exprese v eukaryotních buňkách je zaměřeno zejména na živočichy (Metazoa) a také na rostliny (Plantae) a houby (Fungi). Naopak poznatků o protistech je zatím poměrně málo a jsou omezeny prakticky pouze na několik organismů. Jedná se především o druhy, které jsou patogenní pro člověka (Gomez a kol., 2010; Vaňáčová a kol., 2003).

V eukaryotních buňkách probíhá regulace na každé úrovni genové exprese. Jako nejdůležitější a nejčastější bod pro regulaci se ukazuje iniciace transkripce. Ta v sobě zahrnuje především stavbu promotorových oblastí a také rozeznání a následně vazbu transkripčních faktorů na konkrétní oblasti promotorů. To umožní nasednutí RNA polymerázy a zahájení transkripce. Genová exprese je pak dále regulována na postranskripční úrovni (např. sestřih pre-mRNA, řízení rychlosti degradace mRNA), translačními a postranslačními úpravami a také strukturálními změnami v chromatinu (Gomez a kol., 2010).

Pokrok v poznání regulace transkripce umožnil sestrojení transfekčních systémů, které se staly jedním z nejdůležitějších nástrojů moderní molekulární biologie. Uplatňují se zejména v určování struktury a funkce genů a také zpětně v poznávání mechanismu genové exprese. Do budoucna lze předpokládat uplatnění transfekčních systémů například v genové terapii apod. (Luo a Saltzman, 2000).

Tato práce si klade za cíl:

- Charakterizovat genom a promotorové oblasti genů kódujících proteiny u vybraných zástupců anaerobních parazitických protist, především u *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* a *Giardia intestinalis*.
- Popsat sestrojené transfekční systémy a příklady jejich využití u těchto organismů.

2. Struktura promotorů genů kódujících proteiny

V eukaryotních buňkách zajišťuje expresi genů kódujících proteiny (strukturních genů) RNA polymeráza II. Ta potřebuje k zahájení transkripce přítomnost regulačních sekvencí promotoru, které se nacházejí obvykle 35 – 40 nukleotidů před i za počátkem transkripce. Jádra promotorových oblastí obsahují konzervované motivy, které interagují s RNA polymerázou II a obecnými transkripčními faktory (především transkripčním faktorem II D, TFIID). Konzervovaných motivů bylo nalezeno poměrně velké množství, nicméně žádný z nich není univerzální pro všechny promotory. Nejprozkoumanějším motivem je TATA box, často zkoumaný je také iniciátor (Inr). Dalšími jsou například DPE (downstream promoter element), BRE (B recognition element) a MTE (motif ten element) Mimo těchto jaderných motivů obsahují často eukaryotické promotory různé zesilovače a tlumiče transkripce (Atkinson a Halfon, 2014; Juven-Gershon a kol., 2008).

- TATA box

TATA box je pravděpodobně nejstarší a nejvíce rozšířený motiv eukaryotní motiv, byl také jako první objeven. Sekvenčně podobné motivy byly popsány i u některých archeí. Konsenzuální sekvence není udávána úplně jednotně. Jedna z variant je TATA(A/T)A(G/A), přičemž sekvence TATATAAG byla určena jako optimální pro rozpoznání TATA-binding proteinem (TBD). Ten je součástí TFIID. TATA box se obvykle nachází 31 až 26 nukleotidů před počátkem transkripce, místo startu transkripce TATA box determinuje. Tento motiv se u člověka nachází asi u jedné třetiny promotorů (Smale a Kadonaga, 2003).

- Iniciátor

Iniciátor je motiv funkčně podobný TATA boxu, může fungovat nezávisle na něm. Nachází se kolem počátku transkripce (-2 až +4). Konsenzuální sekvence u octomilky (TCA(G/T)TPy) a u savců (PyCANTPyPy) je velmi podobná. U octomilky se tento motiv vyskytuje asi u 69 % promotorů (Smale a Kadonaga, 2003).

3. Transfekční systémy

Transfekce je metoda, při které dochází k vložení nukleové kyseliny do eukaryotních buněk, v užším slova smyslu, bez použití metod virové infekce. Postupy využívající virové vektory pak označujeme jako transdukcii. Transfekce je jednou ze základních metod dnešní molekulární biologie, využívaná například pro výzkum struktury a funkce genů, regulace genové exprese atd. Existují dva základní typy transfekce. Přechodná, kdy lze expresi genů pozorovat desítky hodin až několik dní v závislosti na typu transfekovaných buněk, a trvalá (stabilní), při které se plazmidy začleňují do genomu transfektantů nebo zůstávají v buňce jako epizomy. (Promega, 2013, kap. Transfection).

- Plazmidy

Většina dnešních transfekčních systémů využívá k transfekci plazmidových vektorů. Plazmid je molekula DNA, obvykle kruhová, která je schopna se sama replikovat nezávisle na jaderném genomu. V přírodě se plazmidy vyskytují především u bakterií a archeí a hrají významnou roli v horizontálním genovém přenosu (HGT) (Gogarten a kol., 2009, s. 19–21).

Plazmidový vektor se skládá z několika základních částí: replikátoru, klonovacích míst k vložení zkoumaných genů s regulačními oblastmi a značkami a obvykle také selekčních a případně reportérových genů. Replikátor obsahuje místo začátku transkripce (nejčastěji sekvenci *ori* z *E.coli*) a kóduje také RNA a proteiny nezbytné k replikaci plazmidu. Pro selekci se používají nejčastěji geny pro rezistenci na antibiotika. K selekci bakterií se ve většině případů používá rezistence k ampicilinu, u eukaryot rezistence například k hygromycinu, puromycinu, geneticinu nebo neomycinu. Alternativně lze využít například rezistenci k infekci některými bakteriofágy nebo pozitivní selekci na základě exprese barevných produktů (Ausubel a kol., 2001, kap. 1.5).

Jako reportérové geny, které slouží zejména ke kontrole funkčnosti a síly zvoleného promotoru, se používají například geny pro chloramfenikol acetyltransferázu (*cat*), luciferázu (*luc*), nebo široké spektrum fluorescenčních proteinů (především zelený fluorescenční protein a jeho varianty). K exprimovaným proteinům lze připojovat na C- i N- konce značky (tagy), které usnadňují jejich detekci a purifikaci (polyhistidinový, hemaglutininový, GFP tag atd.) (Delgadillo a kol., 1997; Jerlström-Hultqvist a kol., 2012a).

Regulace exprese vložených genů v transfekčních systémech používaných u protist je umožněna díky sekvencím pro *TetO* (*tet* operátor) a *TetR* (*tet* represor). Míra genové exprese v těchto vektorech je pak regulovatelná pomocí tetracyklinu nebo jeho analogu doxycyklinu. Plazmidy umožňující tuto regulaci byly z parazitických protist vyvinuty například pro *Trypanosoma brucei* (Wirtz a Clayton, 1995; Wirtz a kol., 1999), *Trypanosoma cruzi* (Wen a kol., 2001), *Entamoeba histolytica* (Hamann a kol., 1997; Ramakrishnan a kol., 1997), *Giardia intestinalis* (Sun a Tai, 2000), *Toxoplasma gondii* (Meissner a kol., 2001), *Leishmania donovani* (Yan a kol., 2002, 2001) a *Trichomonas vaginalis* (Ortiz a Johnson, 2003).

Většina dnešních plazmidových vektorů je v kazetovém (modulovém) formátu, který umožňuje výměnu jednotlivých součástí. Základ nově vytvářených plazmidů pro transfekci protist obvykle tvoří komerčně dostupné vektory jako pGEM (Promega) nebo pBluescript (Agilent Technologies) schopné replikace v eukaryotních buňkách (Sun a kol., 1998; Yee a Nash, 1995).

- Metody

Metody používané k transfekci lze rozdělit do tří velkých skupin: biochemické, fyzikální a virové metody. Biochemické metody maskují záporný náboj nukleových kyselin a usnadňují tak přechod přes plazmatickou membránu. Pro vyšší účinnost jsou kombinovány například s teplotním šokem. Tento typ transfekce je zprostředkován pomocí fosforečnanu vápenatého, DEAE-dextranu nebo liposomů (Ausubel a kol., 2001, kap. 1.8; Luo a Saltzman, 2000).

Mezi fyzikální metody patří mikro-injekce, použití genové pistole a elektroporace. U transfekce protist se používá v podstatě výhradně elektroporace. Jde o metodu založenou na krátkých elektrických impulzech, které způsobí vznik pórů v membráně a umožní tak vstup exogenních nukleových kyselin do buňky. Výhodou je především rychlost, vysoká účinnost a také univerzálnost. Elektroporaci lze použít k transfekci prakticky jakéhokoli typu buněk (Promega, 2013, kap. Transfection). Nejpoužívanějšími přístroji jsou Gene Pulser XCell (Bio-Rad) a AMAXA Nucleofector (Lonza), používaný například pro transfekci plazmódií (Janse a kol., 2006; Jongco a kol., 2006) nebo trypanosom (Burkard a kol., 2007). Genová pistole se používá například k transfekci *Tetrahymena thermophila* (Cassidy-Hanley a kol., 1997; El-Haddad a kol., 2013) nebo rozsivek (Falciatore a kol., 1999; Jiroutová a kol., 2010).

4. Trichomonády

Rod *Trichomonas* (Trichomonadida: Trichomonadidae) patří do skupiny Parabasala a zahrnuje druhy žijící v urogenitální soustavě nebo ústní dutině savců a ptáků. U trichomonád se vyskytuje tzv. kryptopleuromitóza, unikátní způsob dělení jádra, při kterém zůstává zachována během mitózy jaderná membrána a dělicí vřeténko je mimojaderné (typický znak pro parabasalidy jako celek). Vnitřní kostru buňky tvoří axostyl složený z mikrotubulů. Podle parabazálního aparátu, mohutně vyvinutého Golgiho komplexu, který je asociován žíhanými fibrilami, byla celá skupina dokonce pojmenována. Trichomonády rodu *Trichomonas* mají vyvinuty čtyři přední bičíky a undulující membránu (Volf a Horák, 2007, s. 67–68).

U parabasalidů jsou jako organely zajišťující energetický metabolismus namísto mitochondrie přítomny hydrogenosomy. Jedná se o deriváty mitochondrie obalené dvojitou membránou produkující molekulární vodík. Role hydrogenosomů v nejrůznějších metabolických drahách je pravděpodobně větší než se dlouho předpokládalo. Analýza proteomu hydrogenosomu u *T. vaginalis* ukázala vazbu například na syntézu FeS center, odpověď na oxidativní stres a metabolismus aminokyselin (Schneider a kol., 2011).

Kromě nejprozkoumanější *T. vaginalis* jsou dalšími zástupci rodu *Trichomonas* *T. gallinae*, způsobující těžká onemocnění ptáků s vysokou mortalitou a *T. tenax*, žijící v ústní dutině lidí, jehož patogenita je nejasná (Volf a Horák, 2007, s. 69).

4.1. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis je původcem častého a celosvětově rozšířeného sexuálně přenášeného onemocnění lidí, urogenitální trichomonózy. Celosvětově se každoročně nakazí přibližně 170 miliónů lidí, prevalence nemoci je nejvyšší v jižní a jihovýchodní Asii a subsaharské Africe (Lyons a Carlton, 2004).

Infekce probíhá u přibližně poloviny žen a většiny mužů asymptomaticky, popřípadě pouze s malými záněty sliznice pohlavních cest. Při propuknutí onemocnění symptomy u žen zahrnují záněty vagíny a děložního hrdla, u mužů záněty prostaty a nadvarlat, které mohou vést ke sterilitě. Nemoc většinou spontánně nevymizí, k léčbě se používají

5-nitroimidazolové preparáty. Trichomonóza usnadňuje přenos viru HIV a v těhotenství může vést k předčasným porodům (Volf a Horák, 2007, s. 68–69).

- Genom

Nejvýznamnějšími charakteristikami genomu *Trichomonas vaginalis* je jeho extrémní repetitivnost a časté zmnožení genů až celých genových rodin. Velikost je odhadována na 160 Mbp, přičemž repetitivní sekvence mají podíl nejméně 65 %. To značně komplikuje určení jeho dalších vlastností. Genom *T. vaginalis* je organizovaný do šesti chromozomů (Carlton a kol., 2007).

Původně bylo odhadováno, že počet genů kódujících proteiny je okolo 60 000. V 65 genech byly nalezeny introny. Průměrné délka kódujícího genu byla určena na 930 bp. Obsah GC párů v genomu dosahuje 32 %, u kódujících sekvencí je o něco vyšší (36 %) (Carlton a kol., 2007). Odhad počtu genů kódujících proteiny byl postupně snížen na 46 000 (Smith a Johnson, 2011) a následně na 30 000 (Gould a kol., 2013).

U celkem 152 genů byl určen jako pravděpodobný původ horizontální genový přenos z bakterií. Stejně jako u *Entamoeba histolytica* (viz kap. 5.1.) je většina těchto genů zapojena do různých metabolických drah (65 %). Nejčastěji kódují enzymy metabolismu aminokyselin a sacharidů (Alsmark a kol., 2013). Důležitou roli v regulaci metabolických drah hraje železo, které se také podílí na regulaci transkripce genů (např. metalopeptidáz a cysteinových proteáz) (Horváthová a kol., 2012).

Velikost genomu je jedna z největších mezi prvoky. Formulovaná hypotéza hledá příčinu velikosti a repetitivnosti genomu v působení efektu hrdla láhve (*bottleneck effect*) na předka *T. vaginalis* během přesunu z trávicí do urogenitální soustavy. To mohlo ve spojitosti s nižším selekčním tlakem vyústit v hromadění repetitivních sekvencí a genové duplikace (Carlton a kol., 2007). Vzhledem k velikostem genomů i jiných zástupců třídy Trichomonadea se ale také může jednat o důsledek redukce velkého genomu předka trichomonád (Zubáčová a kol., 2008).

- Promotorové oblasti

V promotorových oblastech *T. vaginalis* byly identifikovány tři hlavní konzervované motivy. Iniciátor (Inr) a dva motivy, které byly nalezeny pouze u tohoto organismu, pojmenované jako motivy 3 a 5 (M3, M5) (Smith a kol., 2011).

Iniciátor má konsenzuální sekvenci TCAPy(T/A) (Schumacher a kol., 2003), vyskytuje se v přibližně 75 % 5' nepřekládaných oblastí a má nejdůležitější roli v regulaci genové exprese *T. vaginalis* (Carlton a kol., 2007).

Motiv M5 s konsenzem CCTTT se vyskytuje především u genů, u kterých Inr chybí. Vyskytuje se v podobných vzdálenostech od začátku translace (-10 až -15 nukleotidů, u Inr -5 až -20) a je jeho funkční alternativou. Transkripce genů obsahující tento motiv začíná na druhém cytosinu, u Inr RNA polymeráza II rozeznává typicky adenosin. Geny s motivem M5 z 85 % kódují ribozomální proteiny (Smith a kol., 2011).

Motiv M3 byl nalezen u 12 % genů přibližně 20 až 25 nukleotidů před startem translace. Konsenzuální sekvence je (A/G/T)(A/G)C(G/C)G(T/C)T(T/A/G), která je specificky rozpoznávána transkripčním faktorem M3BP. Pozice tohoto motivu vůči začátku translace a role v regulaci jejího začátku naznačují, že u *T. vaginalis* plní roli TATA boxu (Smith a kol., 2011).

Kromě předchozích motivů se u genů kódujících histony nachází 20 až 40 nukleotidů před startem translace motiv M2, regulující pravděpodobně hlavně transkripci genů ovlivňujících buněčný cyklus (Cong a kol., 2010).

V krátkých 3' nepřekládaných oblastech se nachází polyadenylační signál s konsenzuální sekvencí UAAA, který se překrývá s terminačním kodonem UAA (Espinosa a kol., 2002; Fuentes a kol., 2012).

- Transfekční systémy

Transfekční systém popsáný v roce 1997, sestavený na základě plazmidu pBluescript, využívá pro expresi inzertu 5' a 3' nepřekládané oblasti (UTR) z genu pro α -sukcinyl-CoA syntetázu B (α -SCSB) o délce 1661, respektive 449 nukleotidů. Vytvořeny byly tři varianty plazmidů. První dva obsahují jako reportérové geny sekvence pro chloramfenikol acetyltransferázu (*cat*), v druhém případě pro luciferázu (*luc*). Třetí vektor umožňuje selekci v transformované kultuře díky zařazení genu pro neomycin fosfotransferázu (*neo*). Funkčnost této varianty byla testována použitím paromomycinu o koncentraci 50 μ g/ml (Delgadillo a kol., 1997).

Možnost regulace genové exprese pomocí tetracyklinu umožňuje další transfekční systém. Do kazety využívající opět nepřekládané oblasti genu α -SCSB o délce 342 (5')

a 450 (3') bp byla zaklonována do 5' UTR sekvence *Tet* operátoru (*tetO*), mezi Inr a start kodon. Reportérový gen *cat* byl ve finálním plazmidu nahrazen genem pro puromycin N-acetyltransferázu (*pac*) ze *Streptomyces*, umožňující selekci pomocí puromycinu. Nepřekládané oblasti ze stejného genu jsou použity i v kazetě obsahující tet represor (*TetR*). Vektor nesoucí gen *neo* využívá pro expresi nepřekládané oblasti z genu pro α -tubulin. Maximální míra exprese byla pozorována při koncentraci tetracyklinu 5 $\mu\text{g/ml}$, snižování nebo zvyšování koncentrace expresi snižuje. Pro selekci lze použít geneticin G418 o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ a puromycin o koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ (Ortiz a Johnson, 2003).

Transfekční vektor na bázi virové RNA využívá sekvence z *T. vaginalis* viru (TVV). Jedná se o dsRNA vir ze skupiny Totiviridae, příbuzný *G. lamblia* viru, pomocí kterého byly dříve sestrojeny vektory pro *G. intestinalis* (viz kap. 6.1.). Spojené sekvence genů *neo* a EGFP (enhanced green fluorescent protein) byly vloženy mezi 5' a 3' nepřekládané oblasti z TVV o délkách 289 bp a 174 bp. Kostra vektoru pochází z plazmidu pPloyII/SfiNot, selekce probíhala první čtyři dny s geneticinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, následně byla zvýšena na 550 $\mu\text{g/ml}$ (Li a kol., 2012).

Sestrojení transfekčních systémů pomohlo například k určení struktury promotorových oblastí *T. vaginalis* (Smith a kol., 2011). V současnosti se pro transfekci trichomonád často používá plazmid TagVag. Používaný je například k určení a potvrzení lokalizace proteinů a jejich importu do hydrogenosomů. Kostru vektoru tvoří plazmid pAPluc (Surinya a kol., 1998). Obsahuje dva hemagglutininové tagy, k dispozici jsou varianty pro označení na C- i N-konci proteinů. Původní 5' UTR z AP65-1 byla nahrazena 340 bp dlouhou sekvencí z genu pro α -sukcinyl-CoA syntetázu (Hrdý a kol., 2004; Rada a kol., 2011). Vektor TagVag lze použít i k transfekci *Tritrichomonas foetus*. Tento plazmid byl také společně s vektorem pONDRA použit ve studii dokazující stejný mechanismus importu proteinů do hydrogenosomů *T. vaginalis* a mitosomů *G. intestinalis* (viz kap. 6.1.) (Doležal a kol., 2005). U všech zmíněných transfekčních systémů se k transformaci buněk používá elektroporace.

5. Entaméby

Rod *Entamoeba* (Pelobiontida: Entamoebidae) patří do skupiny archaméb, Amebozoa. Buňky tohoto rodu obsahují jedno jádro, ostatní organelová výbava je značně redukována. Chybí Golgiho aparát, peroxisomy a bičíky včetně bazálních tělísek. Entaméby mají pouze redukovaný derivát mitochondrie, mitosom (Volf a Horák, 2007, s. 122).

Funkce mitosomů není ještě stoprocentně objasněna, studie provedené u *E. histolytica* popisují jako hlavní funkci objevenou dráhu pro metabolismus síry, která se podílí na syntéze sulfolipidů a buněčné proliferaci. Tato metabolická dráha byla u jiných organismů nalezena pouze v cytoplazmě, nebo v plastidech, lokalizace v mitosomu je unikátní (Mi-ichi a kol., 2011, 2009).

5.1. *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica je nejvýznamnějším zástupcem svého rodu. Je to lidský parazit žijící v tlustém střevě způsobující měňavkovou úplavici (měňavkovou dyzenterii). Někdy kolonizuje i jiné orgány (nejčastěji játra), kde způsobuje abscesy. Onemocnění se vyskytuje zejména v oblastech se sníženou hygienou, symptomy se projeví jen zlomku infikovaných. Přesto se celosvětově jedná o desítky miliónů lidí, desítky tisíc na nákazu zemrou. V ČR se nemoc vyskytuje jen vzácně, většinou je importovaná (Volf a Horák, 2007, s. 122; Weedall a Hall, 2011).

K přenosu infekce dochází pomocí odolných čtyřjaderných cyst ze znečištěné vody nebo potravy. Z nich se vyvíjejí v tlustém střevě trofozoiti, kteří ve většině případů žijí jako komezálové (forma minuta). Vlivem některých faktorů (např. změna střevní mikroflóry a kyslíkový stres) se *E. histolytica* může změnit na formu magna, která invaduje střevní stěny a vytváří léze. Forma magna ztrácí schopnost vytvářet cysty. Nemoc se projevuje krvavým průjmem. Ve výjimečných případech může dojít až k protrhnutí střeva. Symptomatické infekce se léčí pomocí metronidazolu nebo emetinu (Volf a Horák, 2007, s. 122).

Morfologicky neodlišitelná od *E. histolytica* je *Entamoeba dispar*, která je ale neinvazivní a nepatogenní. Na základě molekulárních znaků byly oba druhy odděleny v roce 1993 (Diamond a Clark, 1993). Některá dříve publikovaná data o prevalenci infekce *E. histolytica* a projevení symptomů pouze u 10 % nakažených, tak mohou být zkreslena.

Přesto je šance na propuknutí symptomatického onemocnění poměrně malá (Weedall a Hall, 2011).

- Genom

Velikost genomu *E. histolytica* je přibližně 23,8 Mbp. Nalezeno bylo 9 938 genů, průměrný gen obsahuje 1 167 bp a průměrná vzdálenost mezi geny je 800 bp. Kódující sekvence mají v genomu podíl 49 %, obsah GC párů je 24 %. Průměrný kódovaný protein má délku 389 aminokyselin. Čtvrtina predikovaných genů obsahuje introny, 6 % z celkového počtu jich obsahuje více než jeden. Průměrný intron má délku přibližně 102 bp (Clark a kol., 2007; Loftus a kol., 2005).

Chromozomy entaméby nekondenzují a dosud nebyl jednoznačně určen jejich počet. Nejasná zůstává také ploidie organismu. Určení znesnadňuje široká variabilita velikosti homologických chromozomů z různých izolátů *E. histolytica*. To je pravděpodobně způsobeno rozdílnými délkami subtelometrických oblastí, o kterých se spekuluje, že obsahují repetice genů pro tRNA (Loftus a kol., 2005). Studie zabývající se karyotypem *E. histolytica* určila pomocí pulzní elektroforézy 14 chromozomů v rozpětí velikostí od 0,3 do 2,2 megabází, funkční ploidii předpovídá minimálně na 4 (Willhoeft a Tannich, 1999).

Metabolické dráhy jsou poměrně redukovány a neobvykle velká část je díky horizontálnímu genovému přenosu (HGT) bakteriálního původu. V celém genomu bylo identifikováno 96 genů pocházejícího z nedávného HGT, 58 % z nich je součástí metabolických drah (Loftus a kol., 2005). Schází proteiny Krebsova cyklu a, vzhledem k absenci mitochondrie nepřekvapivě, proteiny elektronového transportního řetězce. Část enzymů glykolytické dráhy je prokaryontního původu. S výjimkou syntézy serinu a cysteinu postrádá *E. histolytica* ostatní dráhy biosyntézy aminokyselin, není ani schopná syntetizovat *de novo* puriny, pyrimidiny a ani mastné kyseliny (Loftus a kol., 2005).

- Promotorové oblasti

Stavba promotorových oblastí u *E. histolytica* je poměrně zvláštní. Byly nalezeny tři konzervované motivy v jádře promotoru: TATA box, GAAC motiv a iniciátor. Umístění TATA boxu a iniciátoru je typické pro tyto motivy, sekvence ale neodpovídají konsenzu u vyšších eukaryot (GTATTAAA(G/C) u TATA boxu a AAAAATTCA u Inr) (Pearson a Singh, 2010; Singh a kol., 1997). Motiv GAAC (GAAC) byl u *E. histolytica* popsán poprvé

a je u protist neobvyklý. Tento element je schopen zajišťovat start transkripce nezávisle na TATA boxu a iniciátoru, jeho pozice je v rámci různých genů variabilní (Singh a Rogers, 1998).

Na genu *hgl5* (galaktose-inhibitable lectin heavy subunit gene) byly popsány byly regulační elementy URE (upstream regulatory element). URE3 má funkci tlumiče transkripce, URE1, URE2, URE3 a URE4 transkripci zesilují (Bhattacharya a kol., 2000; Gilchrist a kol., 1997; Purdy a kol., 1996).

5' a 3' nepřekládané oblasti jsou krátké, polyadenylační signál odpovídá konsenzuálnímu UA(A/U)UU (Clark a kol., 2007; Zamorano a kol., 2008).

- Transfekční systémy

Plazmidové vektory umožňující dočasnou transfekci u *E. histolytica* byly popsány v polovině 90. let 20. Století. Systémy umožňující stabilní transfekci následovaly krátce po nich. Tyto vektory byly stěžejní například pro charakteristiku promotorů u entaméby (Pearson a Singh, 2010).

Jeden z prvních plazmidů sestrojených pro dočasnou transfekci využívá jako reportérový gen bakteriální chloramfenikol acetyltransferázu (*cat*), jejíž expresi zajišťují 5' a 3' nepřekládané oblasti z genu pro aktin o délkách 480 a 600 bp. Byl také vytvořen hybridní plazmid obsahující 5' oblast (1430 bp) z genu pro lektin. Oba geny pocházejí z genomu *E. histolytica*. (Nickel a Tannich, 1994). Nahrazením *cat* genu genem pro neomycin fosfotransferázu (*neo*) u těchto plazmidů vznikly vektory umožňující selekci buněk rezistentních na geneticin G418 až do koncentrace 100 µg/ml, stále pouze u dočasné transfekce. (Hamann a kol., 1995).

Ve druhé popsané dočasné transfekci je použit jako reportérový gen luciferáza, obklopená 5' a 3' nepřekládanými oblastmi z genu *hgl1* (heavy galaktose-binding lectin gene) o délkách 1000 a 2300 bp. Vektor vznikl na základě plazmidu pGEM-luc (Purdy a kol., 1994). Pro stabilní transfekci byla luciferáza nahrazena, kvůli citlivosti *E. histolytica* na geneticin, opět genem *neo*. Použitá koncentrace G418 byla 24 µg/ml. Funkční plazmid byl sestrojen i s použitím 5' a 3' nepřekládaných oblastí pocházejícím z genu pro aktin (1000 a 3000 bp) (Vines a kol., 1995).

Další plazmidy, které vycházejí z předchozích, umožňují stabilní transfekci díky použití genu *hyg* pro rezistenci na hygromycin místo genu *neo*. Díky použití genu pro *TetR* (Tet Repressor Protein) je genová exprese regulovatelná tetracyklinem. Exprese *TetR* je zajištěna nepřekládanými oblastmi z ferredoxinu (500 a 2000 bp), respektive 5' oblastí z lektinu (485 bp) a 3' z aktinu (600bp) Použitá koncentrace hygromycinu v kulturách byla 10 a 15 µg/ml (Gilchrist a kol., 1995; Hamann a kol., 1997; Ramakrishnan a kol., 1997).

Transfekce *E. histolytica* je v porovnání s jinými modelovými organismy relativně obtížná. Nejpoužívanější transfekční metodou je elektroporace, někdy se používá také lipofekce. Kromě charakteristiky promotorových oblastí (Purdy a kol., 1996; Singh a Rogers, 1998) byly transfekční systémy použity například pro studium metabolických drah v mitochondriích (Mi-ichi a kol., 2011, 2009) a mechanismů importu proteinů do této organely (Doležal a kol., 2010).

5.2. *Entamoeba invadens*

Entamoeba invadens je parazitem plazů, u nichž vyvolává onemocnění podobné lidské měňavkové úplavici. Přestože je jen poměrně vzdáleně příbuzná *E. histolytica*, stal se z ní důležitý modelový organismus pro studium encystace a excystace, díky schopnosti tvořit cysty i *in vitro* (Ehrenkaufner a Singh, 2012; Weedall a Hall, 2011).

- Genom

Genom *E. invadens* je větší než u *E. histolytica*, obsahuje necelých 41 Mbp, určeno bylo 11 549 genů. Délka průměrného genu je podobná jako u *E. histolytica*, vzdálenost mezi geny je obecně o něco větší. Genomy obou druhů jsou hodně repetitivní. Kódující sekvence mají v genomu podíl pouze 38 %, obsah GC párů je zhruba 30 %. U 35 % genů se předpokládá přítomnost minimálně jednoho intronu (Ehrenkaufner a kol., 2013).

- Transfekční systémy

Transfekční systémy pro *E. invadens* byly vyvinuty teprve v poslední době. Vzhledem k tomu, že jsou používány zejména pro studium encystace, promotorové oblasti musí pocházet z genu, který je silně exprimován v trofozoitech i cystách. Jako vhodný gen se ukázal *rpl3* (ribosomal protein gene L3), který byl použit k první dočasné transfekci *E. invadens*. Základem vektoru je plazmid pBlueScript, jako reportérový gen byla použita luciferáza (Singh a kol., 2012a). Stabilní transfekce byla umožněna přidáním genu *neo*, který k expresi využívá nepřekládané oblasti z genu *rps10* (ribosomal protein gene S10) (Singh a kol., 2012b).

Ze základu pBlueScript vychází také druhý plazmid pro stabilní transfekci. Pro selekci je opět použit gen *neo* obklopený nepřekládanými oblastmi z genu pro enolázu. Inzert je exprimován pomocí 5' a 3' oblastí kasein kinázy II. Tento vektor umožňuje tagování proteinu na C- i N-konci pomocí 3×MYC. Oba systémy k transfekci využívají elektroporaci (Ehrenkaufner a Singh, 2012).

6. Diplomonády

Diplomonadida je řád protist ze skupiny Excavata. Stavba buňky je symetrická podle jedné osy a obsahuje dvě sady organel, včetně dvou jader. Mezi diplomonády patří druhy žijící paraziticky, komenzálně i volně, obývají anaerobní nebo mikroaerobní prostředí. Čtyři z osmi rodů patřících do tohoto řádu obsahují zástupce parazitujících na obratlovcích (*Hexamita*, *Spiroucleus*, *Octomitus*, *Giardia*) (Volf a Horák, 2007, s. 65).

Diplomonády nemají klasickou mitochondrii, a proto bývaly považovány za nejprimitivnější eukaryota. Navíc mají, díky laterálnímu genovému přenosu, některé metabolické dráhy bakteriálního původu (Andersson a kol., 2007). Recentní studie však ukázaly, že diplomonády nemají mitochondrii sekundárně. Do dnešní doby se podařilo nalézt deriváty mitochondrie, popřípadě pouze mitochondriální geny, ve všech zkoumaných amitochondriálních eukaryotech kromě oxymonád (Kolísko a kol., 2008; Müller a kol., 2012; Williams a kol., 2013).

6.1. *Giardia intestinalis*

Zástupci rodu *Giardia* (Diplomonadida: Giardiaidae) se vyskytují v tenkém střevě především u obratlovců, ale i u ptáků a obojživelníků. Vzhledem k významu v humánní medicíně byla dlouho z diplomonád zkoumána prakticky pouze *G. intestinalis*. Dodnes zůstává nejprozkoumanějším zástupcem a patří mezi nejvýznamnější modelové organismy (Jerlström-Hultqvist a kol., 2010b).

Giardia intestinalis (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) je původcem jednoho z nejrozšířenějších onemocnění způsobeného parazitem, přestože symptomatická infekce proběhne jen v přibližně polovině případů. Každoročně giardióza propukne celosvětově u přibližně 280 milionů lidí, v ČR se jedná o stovky případů. Onemocnění se projevuje nekrvavým průjmem spolu s bolestí břicha a nevolností. V duodenu dochází k poruchám štěpení vstřebávání tuků a sacharidů, v důsledku čehož vzniká steatorrhea jako typický příznak giardiózy. Onemocnění ve většině případů proběhne akutně a po několika týdnech samo vymizí. V případě léčby se nejčastěji používají 5-nitroimidazolové preparáty. Mezi hostiteli se *G. intestinalis* přenáší čtyřjadernými cystami pomocí kontaminované vody nebo potravin (Ankarklev a kol., 2010; Volf a Horák, 2007, s. 67).

Giardia nemá schopnost fagocytózy a živí se pinocyticky, pevně přichycená ke stěně enterocytů pomocí přísavného disku, který je na ventrální straně buňky. Ten je tvořen z mikrotubulů a lamel a při každém dělení buňky je dezintegrován a vytvořen znovu (Volf a Horák, 2007, s. 65). Místo klasické mitochondrie se u *G. intestinalis* vyskytují mitosomy. Tyto orgány jsou z derivátů mitochondrie nejvíce redukovanou formou, kompletně ztratily svůj genom a dramatickou redukcí prošel i proteom. Biosyntéza FeS klastrů je jediná pozorovaná funkce mitosomu, ostatní funkce typické pro mitochondrie mitosomy ztratily (Jedelský a kol., 2011; Tachezy, 2008).

Z genetického hlediska je komplex *G. intestinalis* tvořen sedmi rozdílnými genotypy (označovány jako A až H). Tyto tzv. asambláže od sebe nejsou morfologicky odlišitelné, ale na genomové úrovni vykazují takové odlišnosti, že je lze považovat za samostatné druhy. Pro člověka jsou patogenní asambláže A (např. kmen WB) a B (např. kmen GS). Genomová analýza u těchto genotypů ukázala 77% shodu v nukleotidech a 78% shodu v aminokyselinových sekvencích u ortologních proteinů. Bylo identifikováno pouze několik genů specifických pro jednu, nebo druhou asambláž, s výjimkou genové rodiny VSP (variable surface protein), které jsou naopak naprosto odlišné. Genotyp A roste rychleji a je snadněji transfekovatelný pomocí epizomálních plazmidů (Jerlström-Hultqvist a kol., 2010a).

- Genom

Genom *G. intestinalis* byl popsán nejdříve na asambláži A (Morrison a kol., 2007). Struktura i velikost genomu je velmi kompaktní. Genom obsahuje 11,7 Mbp. Bylo nalezeno 6 470 kódovaných proteinů, průměrná délka kódující sekvence je 1 283 bp a průměrná vzdálenost mezi geny 372 bp. Obsah GC párů v genomu je 49 %. Genom obsahuje 4 introny, které mají kanonická GT/AG sestřihová místa a obsahují repetitivní AC motivy. Ty jsou podobná motivům v intronech *T. vaginalis*. To naznačuje, že oba organismy sdílejí stejný mechanismus sestřihu.

Obě diploidní jádra *G. intestinalis* obsahují kompletní kopie genomu a obě jsou transkripčně aktivní. Přestože je *Giardia* tetraploidní organismus, míra heterozygotity je velice malá: 0,01 % u genotypu A a 0,5% u genotypu B. Je pravděpodobné, že za udržování tohoto stavu a potlačování heterozygotity jsou zodpovědné některé biologické procesy, které ale nebyly doposud popsány (Jerlström-Hultqvist a kol., 2010a; Morrison a kol., 2007;

Yu a kol., 2002). Zajímavé je, že každé z jader nese jiný počet chromozomů. Jejich přesný počet není dosud stoprocentně jasný, nicméně u asambláže A bylo určeno 20 chromozomů (9+11) a u asambláže B 21 chromozomů (10+11) (Tůmová a kol., 2007).

Giardia intestinalis má pouze omezený metabolický aparát, čímž se ale neliší od ostatních anaerobních parazitů. Nebyly nalezeny žádné homologické enzymy účastníci se Krebsova cyklu a biosyntézy purinů a pyrimidinů. Metabolismus aminokyselin je výrazně limitovaný. *Giardia* také nedokáže syntetizovat lipidy *de novo*, nicméně geny pro enzymy umožňující v omezené míře prodlužovat mastné kyseliny, modifikovat fosfolipidy nebo skládat sfingolipidy přítomny v genomu jsou. Část glykolytické dráhy vykazuje vyšší podobnost s bakteriálními homology než s homology u jiných eukaryot, podobně jako u *T. vaginalis* a *E. histolytica*. (Morrison a kol., 2007)

- Promotorové oblasti

Vzhledem k malé vzdálenosti mezi geny jsou promotorové oblasti také krátké, kompaktní a leží blízko kódujících oblastí. Regulace genové exprese na této úrovni a na úrovni úpravy RNA není tak komplexní jak je obvyklé. Byly nalezeny pouze 4 z 12 transkripčních iniciačních faktorů přítomných u *Saccharomyces* (Morrison a kol., 2007). Konzervovaná oblast byla objevena 30 bp před začátkem transkripce, obsahuje zejména adeniny a thyminy, ale strukturálně se nejedná o TATA box. Další konzervovaná oblast je těsně před startem transkripce, která má funkci iniciátoru. Obsahuje řadu purinů (hlavně adeninů) přerušenu jedním až čtyřmi pyrimidiny (obvykle thyminem) (Holberton a Marshall, 1995). Velikost 5' nepřekládaných oblastí je obvykle do 14 nukleotidů, u 3' nepřekládaných oblastí se typicky pohybuje mezi 10 až 30 nukleotidy. Konsenzuální polyadenylační sekvence je u *G. intestinalis* AGUAAA (Adam, 2000; Morrison a kol., 2007; Yee a kol., 2000).

Ve studii zabývající se geny kódujícími histony (Yee a kol., 2007), byl popsán 15 bp konzervovaný motiv pojmenovaný him (histone motif), vyskytující se ve všech genech pro histony a u některých byly nalezeny struktury určené jako CAT boxy.

- Transfekční systémy

První dvě úspěšné přechodné transfekce byly popsány v roce 1995. První systém využívá plazmidový vektor (Yee a Nash, 1995), druhý virový vektor (Yu a kol., 1995). V některých

ohledech si jsou oba systémy podobné. K transfekci využívají elektroporaci, jiné metody (např. lipofekce) nebyly úspěšné. Oba systémy pro genovou expresi také potřebují přítomnost 5' promotorových oblastí a 3' oblastí s polyadenylačním signálem pocházejícím přímo z genomu *G. intestinalis*. Pro stabilní transfekci jsou také limitovány přítomností pouze dvou selekčních markerů a to geny *pac* (puromycin N-acetyltransferáza, kóduje rezistenci na puromycin) a *neo* (neomycin fosfotransferáza, kóduje rezistenci na geneticin) (Davis-Hayman a Nash, 2002).

Virový vektor využívá 367 a 300 bp dlouhé 5' a 3' nepřekládané oblasti z giardiaviru (*G.lambli*a virus, GLV). Jedná se o ds RNA vir s ikosahedrální strukturou, o velikosti genomu přibližně 6,3 kb, který se přirozeně vyskytuje u většiny izolátů *G. intestinalis*. K úspěšné transfekci, pomocí *in vitro* připravené RNA, je v tomto případě infekce tímto virem nezbytná. Jako reportérový gen byla opět použita luciferáza. Její exprese byla pozorována přibližně pět dní (Davis-Hayman a Nash, 2002; Yu a kol., 1995).

Stabilní transfekci umožňuje vektor pGDH5/NEO/GLV. Pro selekci využívá gen *neo* obklopený oblastmi z glutamát dehydrogenázy (*gdh*), pro transkripci inzertu využívá chimerické sekvence složené z GLV nepřekládaných oblastí a zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Geneticin byl ke kultuře přidán jeden den po elektroporaci. První týden byla jeho koncentrace 150 µg/ml, následně byla zvýšena na 750 µg/ml (Liu a kol., 2005).

Základ pro několik prvních plazmidových vektorů tvoří plazmid pGEM. Jako reportérový gen slouží luciferáza, která je obklopena 5' a 3' sekvencemi z glutamát dehydrogenázy (Yee a Nash, 1995). Stabilní transfekce byla umožněna použitím *pac* genu a tedy selekcí na rezistenci k puromycinu. Finální koncentrace antibiotika byla 100 µM. (Singer a kol., 1998). Na základě tohoto plazmidu byl později vyvinut vektor, který umožňuje regulaci genové exprese pomocí tetracyklinu (Sun a Tai, 2000).

Další vyvinutý plazmidový vektor umožňující stabilní transfekci je epizomální pRAN*neo/GDH/luc*, který vychází z plazmidu pBluescript. Pro selekci je použit gen *neo*, 5' a 3' nepřekládané oblasti pro selekční marker pocházejí z genu *ran* (Ras-like nuclear protein). Délka oblastí je 650 a 250 bp. Luciferáza využívá k expresi promotor z glutamát dehydrogenázy (*gdh*). Selekcce byla zahájena opět po 24 hodinách, první čtyři dny byla koncentrace geneticinu 150 µg/ml a poté byla zvýšena na 600 µg/ml (Sun a kol., 1998).

Tyto vektory pomohly studiu oblastí biologie *G. intestinalis* týkající se regulace transkripce, funkce genů a transportu proteinů (Davis-Hayman a Nash, 2002). Významným pokrokem bylo určení struktury promotorových oblastí některých genů, například genů pro α -tubulin a glutamát dehydrogenázu (Elmendorf a kol., 2001; Yee a kol., 2000).

Modifikací plazmidu pRAN*neo/GDH/luc* byl vytvořen plazmid pONDRA-HA. Gen pro luciferázu byl nahrazen kazetou s HA tagem pocházejícím z vektoru TagVag. Pomocí těchto 2 plazmidů bylo dokázáno, že mitosomy *G. intestinalis* a hydrogenosomy *T. vaginalis* sdílejí stejný mechanismus importu proteinů (Doležal a kol., 2005).

Plazmidy umožňující označení proteinů na C-konci byly publikovány v roce 2011. Pro označení slouží trojitý hemaglutininový a 3×MYC tag. K selekci lze kromě puromycinu a neomycinu použít také blasticidin. Tyto plazmidy byly použity k lokalizaci cyklinu B a aurora kinázy. Koncentrace puromycinu byla 10 $\mu\text{g/ml}$ a blasticidinu 75 $\mu\text{g/ml}$ (Gourguechon a Cande, 2011).

Purifikace a označení proteinů na N- i C-konci je možné u nově sestrojených plazmidů z roku 2012. Expese je zajištěna promotorovou oblastí (206 bp) pocházející z nejvíce exprimovaného genu *G. intestinalis*, ornithin-karbamoyltransferázy (*oct*). K purifikaci studovaných proteinů se používají SF-TAP¹ a SBP-GST² tagy. Selektce proběhla v puromycinu o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, expresi genu *pac* zajišťují 47 a 123 bp dlouhé nepřekládané oblasti z *gdh*. Tento plazmid byl také základem pro vektor používaný při transfekci *S. salmonicida*, viz kapitola 6.2.1. (Jerlström-Hultqvist a kol., 2012a, 2012b).

¹ SBP-GST: Streptavidin binding protein-glutathione S-transferase

² SF-TAP: Strep II-FLAG-tandem affinity purification

6.2. *Spiroucleus* spp.

Rod *Spiroucleus* (Diplomonadida: Hexamitidae) zahrnuje několik druhů žijících v zažívacím traktu různorodých hostitelů. Část žije komenzálně, některé druhy jsou pro své hostitele patogenní a způsobují enteritidy tenkého střeva a průjemová onemocnění (Volf a Horák, 2007, s. 65).

6.2.1. *Spiroucleus salmonicida*

Spiroucleus salmonicida parazituje u lososovitých ryb a může způsobit značné ekonomické ztráty v jejich chovech. Morfologicky je neodlišitelný od *S. barkhanus*, komenzála volně žijících populací lososů. Původně byly jako *S. barkhanus* popsány oba druhy (Jørgensen a Sterud, 2007; Roxström-Lindquist a kol., 2010).

- Genom

Genom *S. salmonicida* má velikost 12,6 Mbp v devíti chromozomech, identifikováno bylo 8 067 genů kódujících proteiny. Průměrná délka proteinu je 373 aminokyselin, v genomu se celkově vyskytuje 72 % kódujících oblastí a je tedy velice kompaktní. Popsány byly pouze čtyři introny, z nichž tři z nich byly potvrzeny experimentálně. Introny mají kanonická GT/AG sestřihová místa a vyskytují se v nich repetitivní AC motivy, podobné dříve nalezeným u *T. vaginalis* a *G. intestinalis*. Obsah GC párů v genomu je poměrně malý (33 %), přičemž v kódujících oblastech je vyšší než v nekódujících (36 % a 25 %) (Xu a kol., 2014).

Spiroucleus salmonicida má více enzymů než *G. intestinalis* pro energetický metabolismus sacharidů a aminokyselin, pro dráhy zapojené do odpovědi na oxidativní stres a syntézu Fe-S center (Xu a kol., 2014).

- Promotorové oblasti

V porovnání s *G. intestinalis* je transkripce u *S. salmonicida* na úrovni struktury promotorových oblastí více regulovaná. Promotory *S. salmonicida* obsahují řadu regulačních sekvencí, z nichž mají největší význam TATA box, C-bohatý motiv a sekvence bohatá na adenin na místě iniciátoru (Inr) (Xu a kol., 2014).

Sekvence TATA boxu byla popsána u 81 % promotorových oblastí genů, nejčastěji mezi 60 až 50 bázemi před iniciačním kodonem. V genomu byl objeven také divergentní TATA-binding protein (TBP). U 33 % genů se vyskytuje těsně před iniciačním kodonem ATG sekvence minimálně tří adeninů, která pravděpodobně částečně plní roli iniciátoru. C-bohatý motiv byl nalezen u 17 % promotorů a to přibližně 10 párů bází před začátkem transkripce (Xu a kol., 2014).

Průměrná délka 3' nepřekládané oblasti mezi terminačním kodonem a polyA koncem je pouze 13,2 bází. Podobně krátké sekvence byly popsány u *G. intestinalis*. Na rozdíl od většiny ostatních prozkoumaných eukaryot, kde jsou tyto sekvence podstatně delší a jsou jim připisovány důležité funkce v regulaci stability a translace mRNA (Andersson a kol., 2007). Zajímavostí je, že k ukončení transkripce se u *S. salmonicida* používá pouze jeden unikátní terminační kodon TGA. Vzhledem k velikosti 3' nepřekládané oblasti dochází v některých případech k překryvu této oblasti s terminačním kodonem, který pak tvoří jádro konsenzuální polyadenylační sekvence AGTGA (Xu a kol., 2014).

- Transfekční systémy

Pro *S. salmonicida* byl vytvořen epizomální vektor pro stabilní transfekci. Je založen na existujícím vektoru pro *G. intestinalis* na bázi plazmidu pBluescript (Jerlström-Hultqvist a kol., 2012a, 2012b). Jako selekční marker v eukaryotních buňkách lze použít geny pro puromycin N-acetyltransferázu (*pac*), neomycin fosfotransferázu (*nptII*) a blasticidin S-deaminázu (*bsr*). Ideální koncentrace antibiotik pro selekci jsou 50 µg/ml puromycinu, 15 µg/ml blasticidinu a 150 µg/ml geneticinu. *Pac* a *bsr* geny využívají pro svoji správnou expresi 5' a 3' nepřekládané oblasti pocházející z ornithin-karbamoyltransferázy (*oct*), gen *nptII* byl spojen s nepřekládanými oblastmi z fruktóza-bisfosfát aldolázy (*fbpa*). Pro expresi studovaných genů byla použita 3' UTR z ribozomálního proteinu S15A, pro vektory s N-terminálním tagem je zařazena 5' UTR z α -tubulinu.

Vektor umožňuje využití čtyř epitopových tagů na N-konci (3×HA³, 2×OLLAS⁴, SBP-GST, SF-TAP) a pět na C-konci (předchozí a 3×MYC tag). 3×HA, 2×OLLAS 3×MYC tagy slouží pro zjištění lokalizace proteinů, SF-TAP a SBP-GST tagy pro jejich purifikaci (Jerlström-Hultqvist a kol., 2012a).

³ HA: hemaglutinin

⁴ OLLAS: *Escherichia coli* OmpF linker and mouse langerin fusion sequence

Vytvoření stabilního transfekčního systému pro *S. salmonicida* umožňuje využít tento organismus jako alternativní modelový organismus vedle *G. intestinalis* pro studium diplomonád. Tento systém byl úspěšně využit například ke studiu hydrogenosomů *S. salmonicida* (Jerlström-Hultqvist a kol., 2013).

6.2.2. *Spiroucleus vortens*

Spiroucleus vortens napadá sladkovodní tropické ryby, zejména cichlidy. Poprvé byl izolován ze skaláry amazonské (*Pterophyllum scalare*) (Poynton a kol., 1995). Je původcem děrové nemoci [hole in the head disease] a působí ztráty v chovech okrasných akvariálních ryb (Paull a Matthews, 2001). Recentní studie naznačují, že v buňkách *S. vortens* jsou přítomny hydrogenosomy i mitosomy (Millet a kol., 2013, 2010).

- Transfekční systémy

Sestrojený plazmidový vektor pro stabilní transfekci *S. vortens* obsahuje pro selekci kultur *pac* gen pro rezistenci na puromycin. Jeho expresi zajišťují 5' a 3' nepřekládané oblasti z α -tubulinu o délkách 100 a 50 bp. Koncentrace puromycinu pro selekci byla 50 $\mu\text{g/ml}$. Jako epitopové tagy pro lokalizaci proteinu jsou použity zelený fluorescenční protein a AU1. Pro purifikaci je použit tandem affinity purification (TAP) tag. Exprese studovaného genu je pod kontrolou promotoru z histonu H3 *S. vortens* (Dawson a kol., 2008).

7. Závěr

Trichomonas vaginalis, *Entamoeba histolytica* a *Giardia intestinalis* jsou celosvětově rozšíření parazité lidí, kteří mohou způsobovat nebezpečná onemocnění. Genomy všech těchto organismů obsahují poměrně velké množství genů bakteriálního původu pocházející z nedávného horizontálního genového přenosu. Tyto geny jsou zapojeny zejména do různých metabolických drah. Genom *G. intestinalis* je velmi kompaktní, obsahuje 12 Mbp, 6 500 genů a téměř žádné introny. Oproti tomu genom *T. vaginalis* je jedním z největších mezi prvoky. Jeho velikost je 160 Mpb, podle nejnovějších průzkumů obsahuje 30 000 genů, z nichž 65 má alespoň jeden intron. U *T. vaginalis* jsou časté genové amplifikace a 65 % genomu obsahuje repetitivní oblasti. Hodně repetitivní je i genom *E. histolytica*, který má velikost 24 Mbp a obsahuje 10 000 genů, z nichž čtvrtina má introny.

Téměř veškeré poznatky, které máme o regulaci genové exprese v eukaryotních buňkách, pocházejí ze studia živočichů a v menší míře také rostlin a hub. Výzkum protist, který se tradičně zaměřuje zejména na parazity člověka, ukazuje, že na úrovni stavby promotorů se tyto organismy podstatně liší jak od vyšších eukaryot tak mezi sebou navzájem.

TATA box, který je tradičně považovaný za nejdůležitější konzervovaný motiv v jádře promotorů eukaryot, byl u *E. histolytica* a *G. intestinalis* nalezen pouze v podobě, která sekvenčně neodpovídá konsenzu vyšších eukaryot. U *T. vaginalis* nebyl nalezen vůbec, ale funkčně ho pravděpodobně nahrazuje motiv M3, který je u trichomonády unikátní. Naopak u *Spironucleus salmonicida* byl objeven TATA box s naprosto jednoznačnou sekvencí.

Minimálně u *T. vaginalis* se zdá, že největší roli v promotoru má iniciátor, přesto sekvence ani tohoto motivu často neodpovídá konsenzu.

Náš výzkum promotorů protist rodu *Monocercomonoides* (Oxymonadida) prozatím odhalil přítomnost TATA-binding proteinu, analýza konzervovaných motivů zatím probíhá.

Transfekční systémy sestrojené pro tyto organismy umožnily studium širokých oblastí jejich biologie. Kromě studia regulace genové exprese a funkcí genů jsou často používány pro výzkum derivátů mitochondrií těchto protist a napomáhají poznání jejich evolučního původu.

8. Literatura

- Adam, R.D., 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* 30, 475–84.
- Alsmark, C., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Nakjang, S., Martin Embley, T. a Hirt, R.P., 2013. Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome Biol.* 14, R19.
- Andersson, J.O., Sjögren, A.M., Horner, D.S., Murphy, C.A., Dyal, P.L., Svärd, S.G., Logsdon, J.M., Ragan, M.A., Hirt, R.P. a Roger, A.J., 2007. A genomic survey of the fish parasite *Spironucleus salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. *BMC Genomics* 8, 51.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. a Svärd, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 413–22.
- Atkinson, T. a Halfon, M., 2014. Regulation of gene expression in the genomic context. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 9, e201401001.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. a Struhl, K., 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A. a Bhattacharya, S., 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 30, 401–10.
- Burkard, G., Fragoso, C.M. a Roditi, I., 2007. Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153, 220–3.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C.M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vaňáčová, Š., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perlea, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T.R., Shu, C.-L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdý, I., Horváthová, L., Zubáčová, Z., Doležal, P., Malik, S.-B., Logsdon, J.M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.-H., Lee, Y.-S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M. a Johnson, P.J., 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207–12.
- Cassidy-Hanley, D., Bowen, J., Lee, J.H., Cole, E., VerPlank, L.A., Gaertig, J., Gorovsky, M.A. a Bruns, P.J., 1997. Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. *Genetics* 146, 135–47.

- Clark, C.G., Alsmark, U.C.M., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P.G., Samuelson, J., Noël, C.J., Hirt, R.P., Embley, T.M., Gilchrist, C. a, Mann, B.J., Singh, U., Ackers, J.P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillén, N., Duchêne, M., Nozaki, T. a Hall, N., 2007. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* 65, 51–190.
- Cong, P., Luo, Y., Bao, W. a Hu, S., 2010. Genomic organization and promoter analysis of the *Trichomonas vaginalis* core histone gene families. *Parasitol. Int.* 59, 29–34.
- Davis-Hayman, S.R. a Nash, T.E., 2002. Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 1–7.
- Dawson, S.C., Pham, J.K., House, S.A., Slawson, E.E., Cronembold, D. a Cande, W.Z., 2008. Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spironucleus vortens*. *BMC Microbiol.* 8, 71.
- Delgadillo, M.G., Liston, D.R., Niazi, K. a Johnson, P.J., 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4716–20.
- Diamond, L.S. a Clark, C.G., 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 340–4.
- Doležal, P., Dagley, M.J., Kono, M., Woly nec, P., Likić, V.A., Foo, J.H., Šedinová, M., Tachezy, J., Bachmann, A., Bruchhaus, I. a Lithgow, T., 2010. The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 6, e1000812.
- Doležal, P., Šmíd, O., Rada, P., Zubáčová, Z., Bursać, D., Šuřák, R., Nebesárová, J., Lithgow, T. a Tachezy, J., 2005. *Giardia* mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10924–9.
- Ehrenkaufer, G.M. a Singh, U., 2012. Transient and stable transfection in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 184, 59–62.
- Ehrenkaufer, G.M., Weedall, G.D., Williams, D., Lorenzi, H. a, Caler, E., Hall, N. a Singh, U., 2013. The genome and transcriptome of the enteric parasite *Entamoeba invadens*, a model for encystation. *Genome Biol.* 14, R77.
- El-Haddad, H., Przyborski, J.M., Kraft, L.G.K., McFadden, G.I., Waller, R.F. a Gould, S.B., 2013. Characterization of TtALV2, an essential charged repeat motif protein of the *Tetrahymena thermophila* membrane skeleton. *Eukaryot. Cell* 12, 932–40.

- Elmendorf, H.G., Singer, S.M., Pierce, J., Cowan, J. a Nash, T.E., 2001. Initiator and upstream elements in the alpha2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 157–69.
- Espinosa, N., Hernández, R., López-Griego, L. a López-Villaseñor, I., 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 289, 81–6.
- Falciatore, A., Casotti, R., Leblanc, C., Abrescia, C. a Bowler, C., 1999. Transformation of Nonselectable Reporter Genes in Marine Diatoms. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 1, 239–251.
- Fuentes, V., Barrera, G., Sánchez, J., Hernández, R. a López-Villaseñor, I., 2012. Functional analysis of sequence motifs involved in the polyadenylation of *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Eukaryot. Cell* 11, 725–34.
- Gilchrist, C.A., Purdy, J., Mann, B.J. a Petri, W.A., 1997. Control of gene expression in *Entamoeba histolytica* by a cis-acting upstream regulatory element. *Arch. Med. Res.* 28 Spec No, 39–40.
- Gilchrist, C.A., Streets, H.L., Ackers, J.P. a Hall, R., 1995. Transient expression of luciferase in *Entamoeba histolytica* driven by the ferredoxin gene 5' and 3' regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74, 1–10.
- Gogarten, M.B., Gogarten, J.P. a Olendzenski, L., 2009. *Horizontal Gene Transfer, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O. a Rodríguez, M.A., 2010. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 726045.
- Gould, S.B., Woehle, C., Kusdian, G., Landan, G., Tachezy, J., Zimorski, V. a Martin, W.F., 2013. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int. J. Parasitol.* 43, 707–19.
- Gourguechon, S. a Cande, W.Z., 2011. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell* 10, 142–5.
- Hamann, L., Buss, H. a Tannich, E., 1997. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 83–91.
- Hamann, L., Nickel, R. a Tannich, E., 1995. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8975–9.
- Holberton, D. V a Marshall, J., 1995. Analysis of consensus sequence patterns in *Giardia* cytoskeleton gene promoters. *Nucleic Acids Res.* 23, 2945–53.

- Horváthová, L., Šafaříková, L., Basler, M., Hrdý, I., Campo, N.B., Shin, J.-W., Huang, K.-Y., Huang, P.-J., Lin, R., Tang, P. a Tachezy, J., 2012. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol. Evol.* 4, 1017–29.
- Hrdý, I., Hirt, R.P., Doležal, P., Bardonová, L., Foster, P.G., Tachezy, J. a Embley, T.M., 2004. *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432, 618–22.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W. a Waters, A.P., 2006. High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 60–70.
- Jedelský, P.L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A.J., Beltrán, N.C., Lithgow, T. a Tachezy, J., 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* 6, e17285.
- Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J. a Svärd, S.G., 2010a. Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbes* 1, 379–82.
- Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E. a Svärd, S.G., 2012a. Stable transfection of the diplomonad parasite *Spiroucleus salmonicida*. *Eukaryot. Cell* 11, 1353–61.
- Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Xu, F., Hjort, K., Ek, B., Steinhauß, D., Hultenby, K., Bergquist, J., Andersson, J.O. a Svärd, S.G., 2013. Hydrogenosomes in the diplomonad *Spiroucleus salmonicida*. *Nat. Commun.* 4, 2493.
- Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J.O., Svärd, S.G. a Andersson, B., 2010b. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics* 11, 543.
- Jerlström-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestedt, S., Hellman, U. a Svärd, S.G., 2012b. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryot. Cell* 11, 864–73.
- Jiroutová, K., Kořený, L., Bowler, C. a Oborník, M., 2010. A gene in the process of endosymbiotic transfer. *PLoS One* 5, e13234.
- Jongco, A.M., Ting, L.-M., Thathy, V., Mota, M.M. a Kim, K., 2006. Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 242–50.
- Jørgensen, A. a Sterud, E., 2007. The marine pathogenic genotype of *Spiroucleus barkhanus* from farmed salmonids redescribed as *Spiroucleus salmonicida* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 531–41.

- Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J.W. a Kadonaga, J.T., 2008. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 253–9.
- Kolíško, M., Čepička, I., Hampl, V., Leigh, J., Roger, A.J., Kulda, J., Simpson, A.G.B. a Flégr, J., 2008. Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. *BMC Evol. Biol.* 8, 205.
- Li, W., Ding, H., Zhang, X., Cao, L., Li, J., Gong, P., Li, H., Zhang, G., Li, S. a Zhang, X., 2012. The viral RNA-based transfection of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 110, 1305–10.
- Liu, Q., Zhang, X., Li, J., Ying, J., Chen, L., Zhao, Y., Wei, F. a Wu, T., 2005. *Giardia lamblia*: stable expression of green fluorescent protein mediated by giardiavirus. *Exp. Parasitol.* 109, 181–7.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri, W.A., Clark, C.G., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M. a Hall, N., 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–8.
- Luo, D. a Saltzman, W., 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18, 33–7.
- Lyons, E.J. a Carlton, J.M., 2004. Mind the gap: bridging the divide between clinical and molecular studies of the trichomonads. *Trends Parasitol.* 20, 204–7.
- Meissner, M., Brecht, S., Bujard, H. a Soldati, D., 2001. Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 29, e115.
- Mi-ichi, F., Abu Yousuf, M., Nakada-Tsukui, K. a Nozaki, T., 2009. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21731–6.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D. a Nozaki, T., 2011. Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1263.
- Millet, C.O.M., Cable, J. a Lloyd, D., 2010. The diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens* produces hydrogen. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 400–4.

- Millet, C.O.M., Williams, C.F., Hayes, A.J., Hann, A.C., Cable, J. a Lloyd, D., 2013. Mitochondria-derived organelles in the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens*. *Exp. Parasitol.* 135, 262–73.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E.J., Palm, D., Passamanek, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G. a Sogin, M.L., 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921–6.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G.M. a Martin, W.F., 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 444–95.
- Nickel, R. a Tannich, E., 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7095–7098.
- Ortiz, D. a Johnson, P.J., 2003. Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 43–49.
- Paull, G.C. a Matthews, R.A., 2001. *Spironucleus vortens*, a possible cause of hole-in-the-head disease in cichlids. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 197–202.
- Pearson, R.J. a Singh, U., 2010. Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cell. Microbiol.* 12, 1681–90.
- Poynton, S.L., Fraser, W., Francis-Floyd, R., Rutledge, P., Reed, P. a Nerad, T.A., 1995. *Spironucleus vortens* N. Sp. from the Freshwater Angelfish *Pterophyllum scalare*: Morphology and Culture. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 731–742.
- Promega, 2013. Protocols & Applications Guide [WWW Document]. <http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/>
- Purdy, J., Mann, B., Pho, L. a Petri, W., 1994. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7099–7103.
- Purdy, J.E., Pho, L.T., Mann, B.J. a Petri, W.A., 1996. Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 91–103.

- Rada, P., Doležal, P., Jedelský, P.L., Bursac, D., Perry, A.J., Šedinová, M., Smíšková, K., Novotný, M., Beltrán, N.C., Hrdý, I., Lithgow, T. a Tachezy, J., 2011. The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. PLoS One 6, e24428.
- Ramakrishnan, G., Vines, R.R., Mann, B.J. a Petri, W.A., 1997. A tetracycline-inducible gene expression system in *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 84, 93–100.
- Roxström-Lindquist, K., Jerlström-Hultqvist, J., Jørgensen, A., Troell, K., Svärd, S.G. a Andersson, J.O., 2010. Large genomic differences between the morphologically indistinguishable diplomonads *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida*. BMC Genomics 11, 258.
- Schneider, R.E., Brown, M.T., Shiflett, A.M., Dyall, S.D., Hayes, R.D., Xie, Y., Loo, J. a a Johnson, P.J., 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. Int. J. Parasitol. 41, 1421–34.
- Schumacher, M. a, Lau, A.O.T. a Johnson, P.J., 2003. Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote. Cell 115, 413–24.
- Singer, S.M., Yee, J. a Nash, T.E., 1998. Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 92, 59–69.
- Singh, N., Ojha, S., Bhattacharya, A. a Bhattacharya, S., 2012a. Establishment of a transient transfection system and expression of firefly luciferase in *Entamoeba invadens*. Mol. Biochem. Parasitol. 183, 90–3.
- Singh, N., Ojha, S., Bhattacharya, A. a Bhattacharya, S., 2012b. Stable transfection and continuous expression of heterologous genes in *Entamoeba invadens*. Mol. Biochem. Parasitol. 184, 9–12.
- Singh, U. a Rogers, J., 1998. The novel core promoter element GAAC in the *hgl5* gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions. J. Biol. Chem. 273, 21663–8.
- Singh, U., Rogers, J.B., Mann, B.J. a Petri, W. a, 1997. Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the *hgl5* gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 8812–7.
- Smale, S.T. a Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. Annu. Rev. Biochem. 72, 449–79.
- Smith, A. a Johnson, P., 2011. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. Res. Microbiol. 162, 646–54.

- Smith, A.J., Chudnovsky, L., Simoes-Barbosa, A., Delgadillo-Correa, M.G., Jonsson, Z.O., Wohlschlegel, J. a Johnson, P.J., 2011. Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1444–58.
- Sun, C.H., Chou, C.F. a Tai, J.H., 1998. Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 123–32.
- Sun, C.H. a Tai, J.H., 2000. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 51–60.
- Surinya, K.H., Cox, T.C. a May, B.K., 1998. Identification and Characterization of a Conserved Erythroid-specific Enhancer Located in Intron 8 of the Human 5-Aminolevulinate Synthase 2 Gene. *J. Biol. Chem.* 273, 16798–16809.
- Tachezy, J., 2008. Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes, *Microbiology Monographs*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Tůmová, P., Hofstetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O. a Král, J., 2007. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* 116, 65–78.
- Vaňáčková, Š., Liston, D.R., Tachezy, J. a Johnson, P.J., 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 235–255.
- Vines, R.R., Purdy, J.E., Ragland, B.D., Samuelson, J., Mann, B.J. a Petri, W. a, 1995. Stable episomal transfection of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71, 265–7.
- Volf, P. a Horák, P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton.
- Weedall, G.D. a Hall, N., 2011. Evolutionary genomics of *Entamoeba*. *Res. Microbiol.* 162, 637–45.
- Wen, L.M., Xu, P., Benegal, G., Carvahó, M.R., Butler, D.R. a Buck, G. a, 2001. *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. *Exp. Parasitol.* 97, 196–204.
- Willhoeft, U. a Tannich, E., 1999. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 41–53.
- Williams, C.F., Millet, C.O.M., Hayes, A.J., Cable, J. a Lloyd, D., 2013. Diversity in mitochondrion-derived organelles of the parasitic diplomonads *Spironucleus* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 29, 311–2.
- Wirtz, E. a Clayton, C., 1995. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268, 1179–83.

- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. a Cross, G. a, 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 89–101.
- Xu, F., Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Astvaldsson, A., Svärd, S.G. a Andersson, J.O., 2014. The Genome of *Spiroplasma salmonicida* Highlights a Fish Pathogen Adapted to Fluctuating Environments. *PLoS Genet.* 10.
- Yan, S., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S., Myler, P.J. a Stuart, K., 2002. A low-background inducible promoter system in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 217–23.
- Yan, S., Myler, P.J. a Stuart, K., 2001. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 61–9.
- Yee, J., Mowat, M.R., Dennis, P.P. a Nash, T.E., 2000. Transcriptional Analysis of the Glutamate Dehydrogenase Gene in the Primitive Eukaryote, *Giardia lamblia*. IDENTIFICATION OF A PRIMORDIAL GENE PROMOTER. *J. Biol. Chem.* 275, 11432–11439.
- Yee, J. a Nash, T.E., 1995. Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5615–9.
- Yee, J., Tang, A., Lau, W.-L., Ritter, H., Delpont, D., Page, M., Adam, R.D., Müller, M. a Wu, G., 2007. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. *BMC Mol. Biol.* 8, 26.
- Yu, D.C., Wang, A.L., Wu, C.H. a Wang, C.C., 1995. Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4867–72.
- Yu, L.Z., Birky, C.W. a Adam, R.D., 2002. The Two Nuclei of *Giardia* Each Have Complete Copies of the Genome and Are Partitioned Equationally at Cytokinesis. *Eukaryot. Cell* 1, 191–199.
- Zamorano, A., López-Camarillo, C., Orozco, E., Weber, C., Guillen, N. a Marchat, L.A., 2008. In silico analysis of EST and genomic sequences allowed the prediction of cis-regulatory elements for *Entamoeba histolytica* mRNA polyadenylation. *Comput. Biol. Chem.* 32, 256–63.
- Zubáčová, Z., Cimbůrek, Z. a Tachezy, J., 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161, 49–54.