

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

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



Veronika Kaiserová

**Metody RNAi a CRISPR a jejich využití pro genetické manipulace  
parazitických protist**

Use of RNAi and CRISPR system in genetic modifications of parasitic protists

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha 2017

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 15. 8. 2017

Podpis

Děkuji doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při sepisování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

# Obsah

## Abstrakt

## Seznam zkratk

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 RNA interference.....</b>	<b>2</b>
2.1 Malé nekódující molekuly RNA .....	2
2.1.1 Biogeneze miRNA .....	2
2.2 Dicer .....	3
2.3 Průběh dráhy RNA interference .....	4
2.4 Zesílení účinku RNA interference.....	5
<b>3 Využití RNA interference ke genetickým manipulacím u parazitických protist.....</b>	<b>7</b>
3.1 Využití metody RNAi u <i>Plasmodium</i> spp. ....	7
3.2 Využití metody RNAi u <i>Trypanosoma</i> spp. ....	9
3.2.1 RNAi u <i>Trypanosoma brucei</i> .....	9
3.2.2 RNAi u <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>T. congolense</i> a <i>T. evansi</i> .....	12
3.3 Využití metody RNAi u <i>Leishmania</i> spp. ....	13
<b>4 CRISPR.....</b>	<b>15</b>
4.1 Evoluční původ CRISPR/Cas systémů.....	15
4.2 Klasifikace CRISPR/Cas systémů .....	17
4.3 CRISPR/Cas systém typu II jako nástroj genového inženýrství .....	19
4.3.1 Protein Cas9 .....	19
<b>5 Využití CRISPR/Cas systému II ke genetickým manipulacím u parazitických protist.....</b>	<b>22</b>
5.1 Využití metody CRISPR u <i>Plasmodium</i> spp.....	22
5.2 Využití metody CRISPR u <i>Trypanosoma</i> spp.....	24
5.3 Využití metody CRISPR u <i>Leishmania</i> spp. ....	25
<b>6 Závěr.....</b>	<b>27</b>
<b>7 Přehled literatury .....</b>	<b>28</b>

## Seznam zkratek

RNAi	RNA interference
dsRNA	dvouvláknová RNA
miRNA	micro RNA
siRNA	small interfering RNA
AGO	protein Argonute
DCR	protein Dicer
RISC	RNA-induced silencing complex
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
UTR	untranslated region
nt	nukleotidy
CRISPR	Clustred Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas	CRISPR-associated genes
sgRNA	single guide RNA
crRNA	CRISPR RNA
tracrRNA	trans-activating RNA
HDR	homology directed repair
NHEJ	non-homologous end joining
MMEJ	microhomology-mediated end joining
WHO	World Health Organization

## Abstrakt

RNA interference slouží jako obranný mechanismus, pomocí něhož se organismy brání proti cizorodým nukleovým kyselinám. RNAi negativně ovlivňuje translaci vazbou malých nekódujících molekul RNA ke komplementárnímu úseku mRNA, která je následně degradována. Novinkou v oblasti genového inženýrství je metoda CRISPR, která spočívá v modulaci genové exprese tvorbou dvouvláknových zlomů v cílové sekvenci DNA pomocí ribonukleoproteinového komplexu složeného z prokaryotické endonukleázy Cas9 a sgRNA. Obě zmíněné metody jsou použitelné pro funkční analýzu proteinů a charakterizaci metabolických drah u studovaných organismů. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o metodách RNAi a CRISPR a o jejich využití k editaci genomů parazitických protist.

**Klíčová slova:** CRISPR, Cas9, sgRNA, RNA interference, siRNA, miRNA, parazitická protista, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*

## Abstract

In organisms, RNA interference serves as a defence mechanism against foreign nucleic acids. RNAi has a negative effect on translation, via the binding of small non-coding molecules to the complementary region of mRNA, resulting in its degradation. CRISPR, a new method of genetic engineering, is based upon modulating genetic expression via creating double-stranded breaks in target DNA, aided by a ribonucleoprotein complex, consisting of the prokaryotic endonuclease Cas9 and sgRNA. Both of the aforementioned methods can be utilised in functional analysis of proteins and the characterisation of metabolic pathways in organisms of interest. This work summarises the current state of knowledge regarding RNAi and CRISPR and their use in genome editing of parasitic protists.

**Key words:** CRISPR, Cas9, sgRNA, RNA interference, siRNA, miRNA, parasitic protists, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*

# 1 Úvod

Parazitické prvoci jsou jednobuněčné organismy, z nichž mnohé způsobují závažná onemocnění, která jsou každoročně příčinou značných ekonomických ztrát i úmrtí velkého počtu lidí a hospodářských zvířat po celém světě. U mnoha z těchto onemocnění nebyla dosud vyvinuta účinná léčba, natož vakcinace. Metody genového inženýrství založené na modulaci genové exprese hrají klíčovou roli v odhalení genů zodpovědných za patogenicitu těchto organismů. Tyto poznatky jsou dále využitelné k identifikaci potenciálních terapeutických cílů a k vývoji nových chemoterapeutik aplikovatelných v boji proti příslušným patogenům.

Genový knockout je jednou z metod genového inženýrství spočívající v záměrném vyřazení určitého genu z funkce. Výsledkem je pozměněný fenotypový projev, což vede k odhalení role cíleného genu u studovaného organismu. Za rozvoj metody genového knockoutu byla roku 2007 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu Mariu Capecchimu, Martinu Evansovi a Oliveru Smithiesovi. Klasický genový knockout je ovšem poměrně náročný z hlediska provedení, a to hned z několika důvodů. Prvním z nich je fakt, že v diploidní buňce existují pro každý gen minimálně dvě alely. K docílení efektivního umlčení exprese určitého genu musíme tedy poškodit všechny alely příslušného genu. Spolu s mutovanou nefunkční formou genu se jako kontrola do genomu vkládá často i gen pro rezistenci vůči vybranému antibiotiku sloužícímu jako selekční nástroj. Využití této techniky je však komplikované v případě, kdy se jedná o tzv. multi-copy gene (tj. gen s větším počtem kopií), z důvodu nutnosti použití velkého počtu selekčních genů a antibiotik. V neposlední řadě je nutné zmínit, že vypnutí genu je v případě klasického genového knockoutu definitivní, jelikož dochází k zásahu do genomu, a není možné tento proces regulovat. Proto se dnes upřednostňují metody fungující na principu dočasné změny exprese, při které nedochází k modifikaci chromozomální DNA.

Jednou z těchto metod je RNA interference (RNAi), která má původ v eukaryotickém imunitním systému sloužícím k obraně proti cizorodým nukleovým kyselinám. Umlčování genů při RNAi probíhá na úrovni mRNA, která je při tomto ději degradována. Výsledkem je utlumení translace příslušného proteinu. Za objev RNAi u hádátka *Caenorhabditis elegans* byla roku 2006 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu profesorům Andrew Fire a Craig Mello. Novinkou ve svém oboru je metoda CRISPR, která byla poprvé použita v roce 2012 a je do jisté míry revoluční, protože ji lze použít i u organismů, u kterých RNAi nefunguje. CRISPR má původ v prokaryotickém imunitním systému, který efektivně rozpoznává a ničí virové a plazmidové sekvence. Systém uzpůsobený k editaci genomu se skládá z ribonukleoproteinového komplexu prokaryotické endonukleázy Cas9 a sgRNA schopného rozpoznat cílovou DNA sekvenci a způsobit v ní dvouvláknové zlomy vedoucí ke změnám v genomové sekvenci. Cílem této práce bude shrnout dosavadní poznatky o metodách RNAi a CRISPR a o jejich využití k editaci genomů parazitických protist. Dalším cílem bude porovnat využitelnost metody CRISPR s metodou RNAi u parazitických protist.

## 2 RNA interference

### 2.1 Malé nekódující molekuly RNA

Malé nekódující molekuly RNA lze nalézt u většiny eukaryotických organismů. Jsou odvozeny z delších prekurzorů dvouvláknové RNA (dsRNA) a jejich finální délka se pohybuje v rozmezí od 21 do 25 nukleotidů. Dle původu prekurzorů dělíme malé RNA molekuly do dvou skupin. První skupina zahrnuje tzv. micro RNA (miRNA), které jsou kódovány jaderným genomem a jsou tedy endogenního původu. Do druhé skupiny patří tzv. small interfering RNA (siRNA), které vznikají štěpením virové nebo transpozonové RNA a mají tedy exogenní původ (Bartel, 2004).

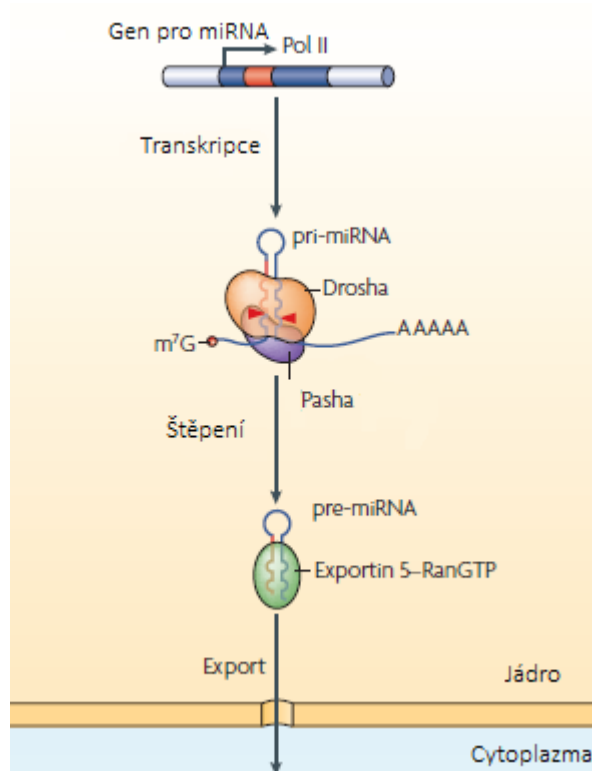
Oba výše zmíněné typy RNA molekul se odlišným způsobem podílejí na negativní regulaci genové exprese. MiRNA blokuje translaci vazbou na 3'UTR oblast (untranslated region) cílové mRNA, čímž zabraňuje pohybu ribozomu a následnému vzniku proteinu. V druhém případě dochází pomocí siRNA k rozpoznání komplementárního úseku na cílové mRNA a k její následné degradaci pomocí endonukleáz (He and Hannon, 2004).

Existence malých nekódujících RNA molekul byla poprvé popsána roku 1993 při studiu genu *lin-4* přítomného u hlístice *Caenorhabditis elegans*. Výsledkem studie byl objev krátkých molekul miRNA vzniklých přepisem genu *lin-4*, které regulují proces translace vazbou na 3' nepřekládanou oblast (UTR) *lin-14* mRNA (Lee et al., 1993). Posléze bylo na hmyzím modelu *Drosophila melanogaster* prokázáno, že úseky dsRNA o délce 21–23 nukleotidů jsou klíčové pro spuštění dráhy RNA interference (Zamore et al., 2000).

#### 2.1.1 Biogeneze miRNA

Průběh dráhy vedoucí ke vzniku miRNA shrnuje níže uvedený obrázek 1. Geny pro miRNA jsou v genomu organizovány v tzv. klastrech a jsou přepisovány jako jedna transkripční jednotka do polycistronního primárního transkriptu zvaného pri-miRNA (Lee et al., 2002). Ten je rozpoznán jaderným multiproteinovým komplexem zvaným microprocessor, který se skládá z endonukleázy Drosha (rodina RNáz III) a RNA vazebného proteinu Pasha (Lee et al., 2003). Pri-miRNA je štěpena endonukleázou Drosha na prekurzory o délce zhruba 70 nukleotidů zvané pre-miRNA, které zaujímají konformaci vlásenky a které mají na 3'konci charakteristický 2 nt dlouhý přesah. Tento přesah je rozpoznán exportinem-5, který umožní následný transport pre-miRNA z jádra do cytoplazmy. V cytoplazmě dochází ke štěpení pre-miRNA enzymem Dicer za vzniku zralých miRNA (Denli et al., 2004).





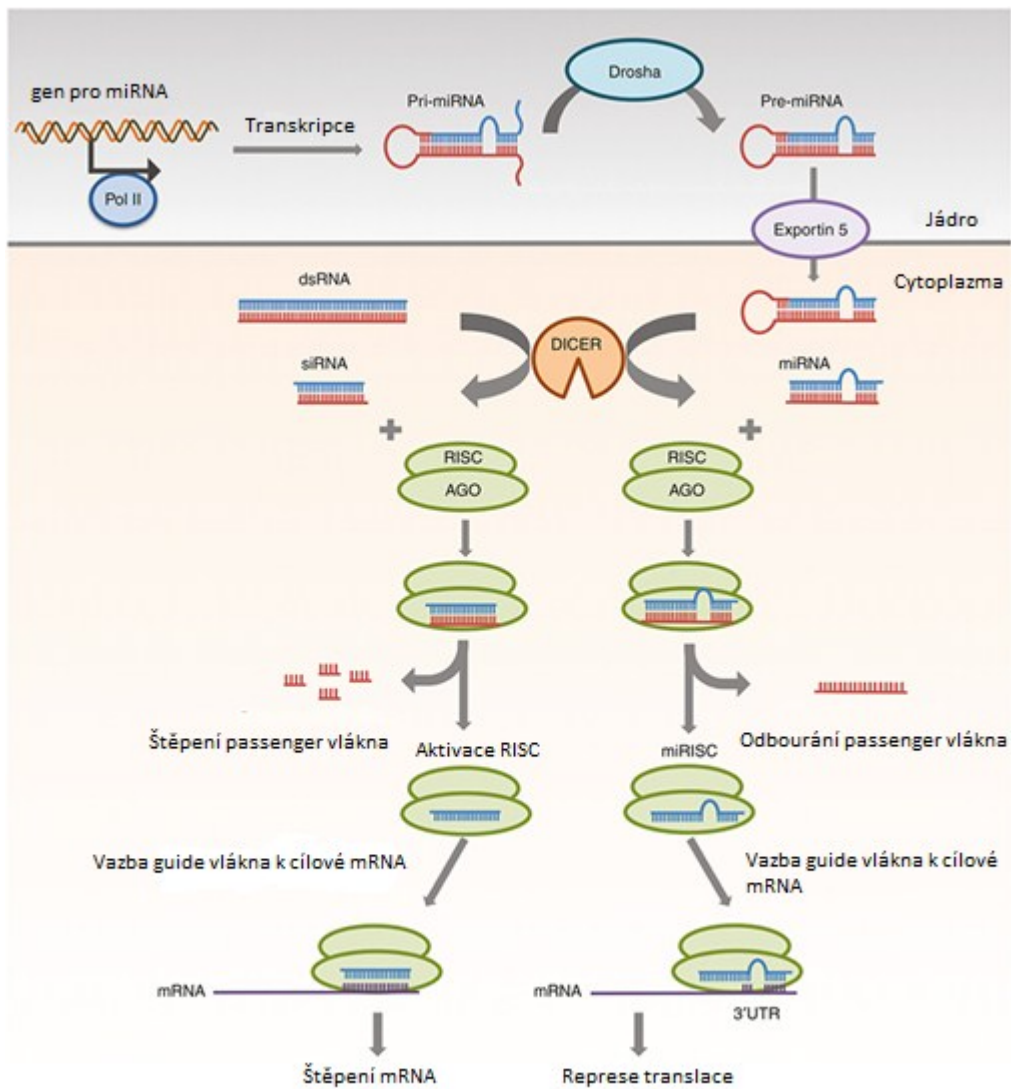
Obrázek 1: Dráha vedoucí ke vzniku microRNA – Geny pro miRNA jsou přepisovány pomocí RNA polymerázy II v primární transkript zvaný pri-miRNA. Ten je následně upraven aktivitou proteinového komplexu (microprocessor) složeného z endonukleázy Drosha a RNA vazebného proteinu Pasha za vzniku dsRNA prekurzorů (pre-miRNA) s charakteristickým 2 nt přesahem na 3'konci. Tento přesah je rozpoznán jaderným exportním faktorem (exportin 5), který umožňuje transport pre-miRNA z jádra do cytoplazmy (Kim et al., 2009).

## 2.2 Dicer

Dicer je multidoménový protein patřící do enzymové rodiny RNáz III, jehož molekulová hmotnost se pohybuje okolo 200 kDa. Jeho struktura je složena z následujících domén: DExH RNA helikázová/ATPázová doména, dvě katalytické domény, dsRNA vazebná doména (dsRBD) a konzervativní domény DUF 283 („domain of unknown function“) a PAZ, která se nachází také u proteinů rodiny Argonaute (MacRae et al., 2006). Předpokládaná funkce dsRBD a katalytických domén spočívá ve vazbě a následném štěpení dsRNA na fragmenty o délce cca 20 nt (Zhang et al., 2004). Tento předpoklad je podpořen faktem, že produkty štěpení mají na 3'konci 2 nt přesah a obsahují 5'fosfátovou a 3'hydroxylovou skupinu, což je charakteristickým rysem štěpení enzymovou rodinou RNáz III (Elbashir et al., 2001a). Zbylé domény se účastní výběru cílového místa štěpení a regulují aktivitu katalytických domén. Štěpení dsRNA na definované fragmenty je pravděpodobně umožněno inaktivací jednoho z katalytických míst na obou monomerech RNázové domény vlivem evolučně konzervované aminokyselinové záměny Glu za Pro. Výsledkem tohoto procesu je změna periodicity štěpení dsRNA z 11 nt u bakteriálních RNáz na 22 nt u Diceru (Blaszczuk et al., 2001).

## 2.3 Průběh dráhy RNA interference

Princip RNA interference spočívá v rozštěpení dvouvláknové RNA na krátké nepřekrývající se úseky, které jsou homologní k cílové mRNA a indukují utlumení genové exprese. Dráha RNAi může být spuštěna dvěma různými způsoby uvedenými na obrázku 2. První možností je vstup exogenní dsRNA do cytoplazmy, která je zde štěpena pomocí proteinu Dicer na kratší úseky siRNA indukující degradaci cílových mRNA. Druhá možnost spočívá v transportu pre-miRNA z jádra do cytoplazmy, kde po štěpení Dicer proteinem vzniknou molekuly miRNA zodpovědné za represi translace.



Obrázek 2: Mechanismus působení exogenní siRNA v buňce ve srovnání s účinkem endogenní miRNA (Lam et al., 2015).

Impulsem pro spuštění dráhy RNAi je tedy štěpení dsRNA, respektive pre-miRNA, proteinem Dicer na kratší dvouvláknové úseky siRNA (miRNA) (Bernstein et al., 2001). Dicer následně dimerizuje s faktorem R2D2 a společně s duplexem siRNA vytváří tzv. iniciační komplex (RDI). Existence tohoto komplexu je nezbytná pro následné sestavení multiproteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) (Liu et al., 2003). Faktor R2D2 funguje jako proteinový senzor termodynamické asymetrie vláken siRNA. Díky této schopnosti R2D2 orientuje duplex siRNA v rámci iniciačního komplexu tak, že 5'konec vlákna s nižší teplotou tání preferenčně interaguje s proteinem Dicer (Tomari et al., 2004). Později se vlivem této orientace vlákno s nižší teplotou tání stává tzv. antisense (guide) vláknem komplexu RISC (Kim et al., 2007).

Jedním z důležitých kroků při tvorbě multiproteinového komplexu RISC je disociace vláken duplexu siRNA a odbourání tzv. sense (passenger) vlákna. Dlouho se předpokládalo, že za oddělení vláken siRNA je zodpovědná ATP dependentní RNA helikáza aktivovaná bezprostředně po vytvoření iniciačního komplexu (Nykänen et al., 2001). Pozdější model však ukazuje, že k disociaci vláken siRNA dochází až po vazbě na komplex RISC (Matranga et al., 2005). V následujícím kroku zůstává v RISC navázáno pouze guide vlákno, které je komplementární vůči cílové mRNA (Martinez et al., 2002). Passenger vlákno je odštěpeno proteinem z rodiny Argonaute, čímž dojde k aktivaci komplexu RISC (Rand et al., 2005).

Nezbytnou součástí komplexu RISC je protein z rodiny Argonaute (např. Ago2), který tvoří jeho katalytickou podjednotku (Liu et al., 2004). Proteiny této rodiny se vyznačují molekulovou hmotností okolo 100 kDa a přítomností domén PAZ a PIWI (Cerutti et al., 2000). PAZ doména zprostředkovává kontakt 3'konce guide vlákna s komplexem RISC (Song et al., 2003). Za štěpení komplementární mRNA je zodpovědná doména PIWI, která obsahuje aktivní místo s konzervovaným motivem Asp-Asp-Glu a je tedy strukturně podobná RNáze H (Liu et al., 2004). K rozštěpení fosfodiesterové vazby dochází mezi 10. a 11. nukleotidem od 5'konce guide vlákna. (Elbashir et al., 2001b).

## **2.4 Zesílení účinku RNA interference**

Během analýzy siRNA produkovaných v průběhu dráhy RNAi u modelového organismu *Caenorhabditis elegans* byla v roce 2001 prokázána existence tzv. sekundárních siRNA. Následně bylo zjištěno, že tyto siRNA nepocházejí z dsRNA prekurzorů, nýbrž vznikají činností buněčných RNA-dependentních RNA polymeráz (Sijen et al., 2001). Tyto polymerázy využívají guide vlákno siRNA jako primer pro syntézu dsRNA podle cílové mRNA, která slouží jako templát (Lipardi et al., 2001). Nově syntetizované dsRNA jsou opět rozštěpeny enzymem Dicer za vzniku sekundárních siRNA. Výsledkem tohoto procesu je amplifikace signálu dráhy RNAi mezi buňkami živočichů nebo pletivy rostlin.

Využití RNA-dependentních RNA polymeráz v průběhu dráhy RNAi bylo prokázáno i u houby *Neurospora crassa* (Cogoni and Macino, 1999), huseníčku *Arabidopsis thaliana* (Dalmay et al., 2000) nebo hlenky *Dictyostelium discoideum* (Martens et al., 2002). V lidských buňkách nebyla amplifikace signálu tvorbou sekundárních siRNA prostřednictvím RdRp prokázána (Schwarz et al., 2002).

### 3 Využití RNA interference ke genetickým manipulacím u parazitických protist

Využitelnost metody RNA interference (RNAi) k úpravám genové exprese u parazitických protist byla poprvé prokázána v roce 1998, kdy po vnesení syntetické dsRNA s genem pro 5'UTR oblast  $\alpha$  tubulinu do buněk procyklické formy *Trypanosoma brucei* došlo ke specifické degradaci komplementární mRNA a k následnému snížení proteosyntézy  $\alpha$  tubulinu (Ngô et al., 1998). Od tohoto objevu byla přítomnost dráhy RNAi testována u řady dalších parazitických protist, jejichž přehled nabízí tabulka 1.

Tabulka 1: Přítomnost dráhy RNA interference u parazitických protist

Organismus	Ortholog Dicer	Ortholog Argonaute	Funkční dráha RNAi
<i>Trypanosoma brucei</i> *	ano	ano	ano
<i>Trypanosoma cruzi</i> *	ne	ano	ne
<i>Trypanosoma evansi</i> *	ano	ano	ano
<i>Trypanosoma congolense</i> *	ano	ano	ano
<i>Leishmania donovani</i> *	ne	ne	ne
<i>Leishmania major</i> *	ne	ne	ne
<i>Leishmania braziliensis</i> *	ano	ano	ano
<i>Plasmodium falciparum</i> *	ne	ne	ne
<i>Plasmodium berghei</i> *	ne	ne	ne
<i>Toxoplasma gondii</i>	ano	ano	ano
<i>Cryptosporidium</i> spp.	ne	ne	ne
<i>Theileria</i> spp.	ne	ne	ne
<i>Babesia bovis</i>	ne	ne	ne
<i>Eimeria tenella</i>	ne	ne	ne
<i>Giardia intestinalis</i>	ano	ano	ano
<i>Entamoeba histolytica</i>	ano	ano	ano

\* více informací o využití metody RNAi u těchto skupin bude uvedeno v dalších podkapitolách

#### 3.1 Využití metody RNAi u *Plasmodium* spp.

Rod *Plasmodium* (kmen Apicomplexa) sdružuje obligátní vnitrobuněčné parazity, pro které jsou typické dva aspekty: vstup do buňky pomocí apikálního komplexu a životní cyklus se třemi rozmnožovacími fázemi (merogonie, sporogonie, gamogonie). Zástupci rodu *Plasmodium* jsou známí především jako původci malárie, jež představuje jedno z hlavních zdravotních rizik v subtropických a

tropických oblastech celého světa. Jen v Africe je vlivem malárie infikováno 300 až 500 milionů lidí ročně a dle informací WHO více než půl milionu nakažených tomuto onemocnění podlehe.

První zpráva o využití metody RNAi u *Plasmodium falciparum* byla publikována v roce 2002, kdy se vědci zaměřili na umlčení exprese genu kódujícího dihydroorát dehydrogenázu (DHODH, enzym syntézy pyrimidinů). Ukázalo se, že elektroporace buněk krevní formy *P. falciparum* v přítomnosti dsRNA nesoucí sekvenci genu pro DHODH vedla ke specifické degradaci komplementární mRNA a k následnému snížení růstu buněk o 60 % (McRobert and McConkey, 2002).

V dalším experimentu se vědci zaměřili na cysteinové proteázy *P. falciparum* (falcipain-1 a -2). Ukázalo se, že inkubace buněk krevní formy *P. falciparum* v přítomnosti dsRNA nesoucí sekvence genů pro falcipain-1 a -2 vedla k inhibici růstu buněk *in vitro* a k hromadění hemoglobinu v potravní vakuole, čímž se potvrdila nepostradatelnost těchto enzymů v počáteční fázi procesu degradace hemoglobinu (Malhotra et al., 2002). V roce 2003 byl podobný pokus proveden *in vivo*. Injekční aplikace siRNA pro cysteinové proteázy berghepain-1 a 2 do myši infikované *Plasmodium berghei* vedla ke zvětšení potravní vakuoly u cirkulujících parazitů v důsledku hromadění hemoglobinu (Mohammed et al., 2003). O dva roky později byla dráha RNA interference využita k objasnění klíčové role cysteinové proteázy falcipain-2 v procesu uvolňování merozoitů z erytrocytů v průběhu životního cyklu *P. falciparum* (Dasaradhi et al., 2005).

Ve stejném roce proběhl také pokus s umlčením exprese transkripčního faktoru PfMyb1, při kterém byla odhalena jeho funkce v rámci vývojového cyklu *P. falciparum*. Ukázalo se, že vnesení dsRNA pro PfMyb1 do kultury *P. falciparum* negativně ovlivňuje proces přeměny trofozoitů ve schizonty. Linie s vnesenými dsRNA navíc vykazovaly snížení růstu o 40 % (Gissot et al., 2005). Velmi podobné výsledky přinesl experiment, při kterém byly do kultury *Plasmodium falciparum* vneseny dsRNA nesoucí gen pro histon deacetylázu (PfHDAC-1) (Sriwilaijaroen et al., 2009). Pro přežití a růst plasmodia jsou nezbytné také komponenty translačního iniciačního komplexu PfIF4E a PfIF4A, což bylo prokázáno přidáním dsRNA pro tyto iniciační faktory do kultury *P. falciparum*, které vedlo ke snížení růstu o 67 % (Tuteja and Pradhan, 2010).

Ačkoliv výše zmíněné pokusy prokázaly dsRNA řízenou degradaci mRNA, geny pro proteiny Dicer a Argonaute a molekuly miRNA, které jsou pro dráhu RNAi klíčové, nebyly zatím v genomu plasmodia identifikovány (Xue et al., 2008; Mueller et al., 2014; Bunnik et al., 2016). Baum et al. (2009) testovali přítomnost dráhy RNAi v plasmodiu vnášením dsRNA pro geny nesouvisející s vývojem a růstem parazita a analyzovali genom s použitím srovnávací bioinformatické metody. Ani jeden z těchto pokusů však nebyl úspěšný. Předchozí zjištění RNAi vysvětlují autoři tím, že vnesená dsRNA je pro *Plasmodium* přirozeně toxická. Druhá hypotéza se opírá o možnost existence alternativní dráhy RNAi fungující na odlišném principu. Tato hypotéza byla podpořena s identifikací 630 nekódujících molekul RNA v genomu *P. falciparum* patřících do tříd small nucleolar RNAs (snoRNA) a small

Cajal-body specific RNAs (scaRNA), které by mohly sloužit jako mediátory alternativní dráhy RNAi (Raabe et al., 2010). Možnost alternativní dráhy RNAi byla nastíněna také v pokusu z roku 2012, ve kterém byly umlčovány geny pro deoxyhypusine syntázu (DHS) a eukaryotický iniciační faktor (eIF-5a). *In vivo* aplikace siRNA pro DHS a eIF-5a do myši infikované *P. berghei* vedla k inhibici růstu plasmodia a tím k signifikantnímu snížení parazitémie (tj. počtu parazitů v krvi). Po vnesení siRNA *in vitro* do infikovaných krevních buněk došlo ke snížení hladiny odpovídajících mRNA, čímž se potvrdil předpoklad existence alternativní dráhy RNAi u plasmodia (Schwentke et al., 2012).

V poslední studii publikované v roce 2016 vědci vyvinuli nanočástici z chitosanu nesoucí dsRNA proti topoizomeráze II (PfTOP2), replikačnímu enzymu *P. falciparum*. Infikované erythrocyty vystavené působení volné dsRNA vykazovaly snížení růstu o 41 %. V případě chitosanové nanočástice vzrostla míra inhibice na 71 %, čímž se prokázalo, že tento nosič zajišťuje účinnější dopravu dsRNA do cílových buněk (Attasart et al., 2016).

### **3.2 Využití metody RNAi u *Trypanosoma* spp.**

Nejdůležitější patogenní zástupci rodu *Trypanosoma* náleží do dvou skupin lišících se způsobem přenosu. *T. brucei* (skupina Salivaria), která vyvolává spavou nemoc u lidí a onemocnění zvané nagana u dobytka, je přenášena slinami mouchy tse-tse. *T. cruzi* (skupina Stercoraria), která je původcem Chagasovy choroby, je šířena trusem ploštic z podčeledi Triatominae.

#### **3.2.1 RNAi u *Trypanosoma brucei***

Jak bylo zmíněno výše, funkční dráha RNAi byla u *Trypanosoma brucei* objevena již roku 1998<sup>1</sup> (Ngô et al., 1998). V pozdějších letech byly identifikovány i orthology proteinů Dicer a Argonaute, které jsou pro fungování RNAi nezbytné. Analýza genomu *T. brucei* odhalila přítomnost genu pro protein TbAGO1, který se prokazatelně účastní dráhy RNAi. Mimo to se podílí na formování dělicího vřeténka a mitotické segregaci chromozomů skrze svůj vliv na tvorbu heterochromatinu v oblasti centromery (Durand-Dubief and Bastin, 2003). Dále bylo prokázáno, že TbAGO1 udržuje integritu genomu na úrovni regulace počtu transkriptů vzniklých přepisem retroponů (Shi et al., 2004a, 2004b; Durand-Dubief et al., 2007). V genomu *T. brucei* se nachází také dva geny pro proteiny Dicer, jejichž funkce spočívá hlavně v tvorbě siRNA z retroponů a které se od sebe liší svou lokalizací v rámci buňky. Zatímco TbDCL1 operuje v cytoplazmě (Shi et al., 2006), TbDCL2 je lokalizován v jádře a je navíc zodpovědný za biogenezi tzv. CIR147 (chromosome internal repeats) siRNA odvozených od 147 pb dlouhých repetitivních sekvencí (Patrick et al., 2009).

---

<sup>1</sup> O RNAi u *Trypanosoma brucei* bylo sepsáno velké množství článků, ze kterých jsem pro potřeby této bakalářské práce vybrala pouze některé, ilustrující rozsah a diverzitu využití této metody.

Jako mediátory dsRNA řízené degradace mRNA slouží výše zmíněné molekuly siRNA (Elbashir et al., 2001a). Roku 2003 bylo zjištěno, že 10 až 20 % siRNA asociuje ve formě 70 kDa velké ribonukleoproteinové částice s ribozomy. Předpokládá se, že tato interakce usnadňuje rozpoznání cílové mRNA určené k degradaci (Djikeng et al., 2003). Sekvence genomu *T. brucei* odhalila, že většina siRNA je odvozena od mobilních genetických elementů (retropozonů) patřících do skupin ingi a SLACS (spliced leader-associated conserved sequence) (Djikeng et al., 2001). Později byla objevena další třída siRNA odvozených od 147 pb dlouhých repetitivních sekvencí lokalizovaných na chromozomech 4, 5 a 8. Tato třída byla nazvána CIR147 siRNA (Patrick et al., 2009). Na základě těchto poznatků se dá předpokládat, že *T. brucei* využívá dráhu RNAi hlavně k ochraně před mobilními genetickými elementy. Tento předpoklad je podpořen pokusem, ve kterém buňky *T. brucei* bez TbAGO1 vykazovaly vysokou míru genomových přestaveb právě v oblastech se SLACS (Patrick et al., 2008).

Metoda RNA interference je hojně využívána ve výzkumech zabývajících se identifikací genů nezbytných pro přežití jak krevní, tak procyklické formy *T. brucei*. Tyto experimenty dávají velkou naději na využití RNAi při vývoji nových chemoterapeutik proti spavé nemoci u lidí nebo naganě u dobytka, kterou tento parazit způsobuje. Aplikace dsRNA do buněk cílového organismu je spolehlivou metodou pro spuštění dráhy RNAi za účelem narušení genové exprese. Ukázalo se však, že v buňkách *T. brucei* není dsRNA stabilně udržována a navozený efekt mizí v průběhu prvního buněčného dělení. Proto byl vyvinut vysoce účinný tetracyklin-indukovatelný T7 expresní systém zajišťující *in vivo* expresi dsRNA v buňkách krevní i procyklické formy *T. brucei*. Tento systém zajišťuje vyšší stabilitu dsRNA a zvyšuje účinnost degradace komplementární mRNA (Shi et al., 2000; Wang et al., 2000; Morris et al., 2001).

Roku 2000 byla dráha RNA interference použita ke zkoumání procesu skladby proteinů při tvorbě paraflagelární tyče bičíku (Bastin et al., 2000). Pozdější experiment ukazuje, že umlčení exprese genu pro protein FLA1, který hraje klíčovou roli v připojení bičíku k tělu *T. brucei* vede jak u procyklických, tak u krevních forem k oddělení bičíku a k blokaci cytokineze (LaCount et al., 2002). Poruchy cytokineze u krevních forem parazita byly pozorovány i o čtyři roky později po umlčení několika různých genů pro proteiny bičíku (např. TAX-1, PFR2) (Broadhead et al., 2006).

Dráha RNAi byla využita i během pokusu, při kterém byla studována funkce mitochondriální topoizomerázy II. Po vnesení dsRNA do buněk *T. brucei* došlo nejen ke specifické degradaci komplementární mRNA a k následnému úmrtí buněk, ale také ke ztrátě kinetoplastové DNA (kDNA). Této ztrátě předcházely problémy s opětovným připojením replikovaných minikroužků do sítě tvořící kinetoplast a předpokládá se tedy, že topoizomeráza II hraje klíčovou roli právě v procesu replikace minikroužků (Wang and Englund, 2001). O tři roky později byl proveden podobný pokus s dalším typem topoizomerázy vyskytující se u *T. brucei*. Topoizomeráza IB se skládá ze dvou podjednotek



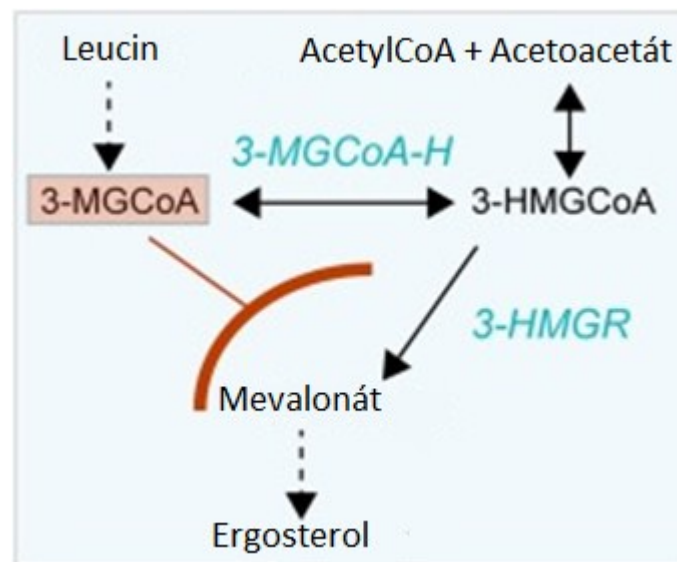
kódovaných dvěma rozdílnými geny. Ačkoliv RNAi operuje na úrovni degradace komplementární mRNA, po umlčení exprese genu pro jednu podjednotku došlo ke snížení hladiny proteinu pro obě podjednotky. Je tedy zřejmé, že jednotlivé podjednotky mohou existovat pouze ve formě dimeru (Bakshi and Shapiro, 2004).

V jiném experimentu vědci pomocí RNAi ověřili roli farnesyl pyrophosphate syntázy (TbFPPS) jakožto esenciálního enzymu *T. brucei*, který je nezbytný pro přežití procyklických forem parazita *in vitro* a *in vivo* (Montalvetti et al., 2003). Ve stejném roce pak byla RNAi využita při zkoumání buněčného cyklu u *T. brucei*. Ukázalo se, že absence mRNA pro mitotický cyklin CYC6 vede k pozastavení mitózy a inhibici růstu jak u procyklické, tak u krevní formy parazita. Navíc bylo zjištěno, že *T. brucei* postrádá schopnost regulace buněčného cyklu skrze klíčové kontrolní body přítomné u vyšších eukaryot (Hammarton et al., 2003). Metoda RNAi byla též využita k objasnění klíčové role sfingolipidů v procesu cytokineze a dělení kinetoplastu u procyklických forem *T. brucei* (Fridberg et al., 2008).

Velká část experimentů využívajících metodu RNA interference se zabývá výzkumem mitochondriálního metabolismu. V roce 2006 byla publikována studie zabývající se procesem transformace mitochondrie v důsledku přeměny krevní formy parazita na procyklickou. Ukázalo se, že umlčení exprese genů kódujících enzymy cystein desulfurázu (TbiscS) a metallochaperone (TbiscU) vyústila u procyklických stádií parazita v inhibici mitochondriální i cytoplazmatické akonitázy v důsledku zhoršené maturace FeS klastrů. Mitochondrie takto modifikovaných procyklických forem se navíc co do metabolismu podobaly organelám krevních stádií a vykazovaly poruchu v tvorbě ATP (Smíd et al., 2006). K inhibici mitochondriální a cytoplazmatické akonitázy došlo i po umlčení exprese genu pro mitochondriální protein frataxin. Inhibice tohoto proteinu dále vedla ke zvýšení koncentrace reaktivních forem kyslíku. Na základě těchto poznatků se usuzuje, že funkce trypanosomálního frataxinu spočívá v biogenezi FeS klastrů a v ochraně parazita před kyslíkovými radikály (Long et al., 2008). V dalším experimentu byla metoda RNAi využita k analýze mitochondriálního genomu u procyklických stádií *T. brucei* vedoucí k objevu 37 genů, které se přímo či nepřímo zapojují do řízení buněčného cyklu (Mbang-Benet et al., 2015).

Jones et al. (2014) využil metodu RNAi k identifikaci 42 protein kináz (PK) důležitých pro normální růst krevních forem *T. brucei*. Zhruba u poloviny těchto kináz byl dále prokázán jejich vliv na mitózu, cytokinezi, regulaci buněčného cyklu a replikaci kinetoplastu. V rámci této studie byly také poprvé identifikovány dvě proteinkinázy RDK1 a RDK2 („repressor of differentiation kinase“), které regulují proces přeměny krevní formy na procyklickou formu uvnitř přenašeče (mouchy tse-tse). O rok později byla metoda RNAi použita k objasnění funkce proteinu Tbj2 z chaperonové rodiny Hsp40. Ukázalo se, že tento protein hraje významnou roli v procesu proteosyntézy a je nepostradatelný z hlediska normálního růstu buněk *T. brucei* (Ludewig et al., 2015). Dráha RNAi byla využita také k objasnění

funkce MAP kinázy MAPK1 u procyklické formy *T. brucei*. Umlčení exprese genu pro MAPK1 vedlo k inhibici růstu a k mírným změnám ve fosfoproteomu, proteomu a transkriptomu. Ukázalo se, že změny ve fosfoproteomu se významně dotýkají proteinů podílejících se na úpravách mRNA a dá se tudíž předpokládat, že MAPK1 se účastní regulace proteinů zapojených do metabolismu mRNA (Batista et al., 2017). V nejnovější studii z června tohoto roku se vědci zabývali enzymem 3-methylglutaconyl-CoA hydratázou (3-MGCoA-H), který je exprimován v mitochondriální matrix u obou forem parazita. Úloha tohoto enzymu v katabolismu leucinu je zobrazena v níže uvedeném schématu. Umlčení exprese genu pro 3-MGCoA-H v kulturách s nadbytečným množstvím leucinu vedlo k inhibici růstu jak u procyklické, tak u krevní formy parazita. Předpokládá se, že v důsledku hromadění 3-MGCoA dochází k inhibici enzymu 3-HMGR a tím ke snížení hladiny mevalonátu, prekursoru syntézy steroidů (de Lima Stein et al., 2017).



Obrázek 3: Schéma katabolismu leucinu. Leucin je nejprve v sérii metabolických reakcí přeměněn na 3-methylglutaconyl-CoA a ten je následně hydratován 3-MGCoA-hydratázou za vzniku 3-hydroxy-methylglutaconyl-CoA. V další reakci katalyzované enzymem 3-hydroxymethylglutaril CoA reduktázou vzniká mevalonát, prekursor biosyntézy steroidů nezbytných pro růst trypanosomy (de Lima Stein et al., 2017).

### 3.2.2 RNAi u *Trypanosoma cruzi*, *T. congolense* a *T. evansi*

Poměrně brzy po objevu RNAi u *T. brucei* se ukázalo, že tato dráha je funkční i u některých dalších trypanosom. U *T. congolense*, způsobující onemocnění dobytka zvané nagana, byla dráha RNA interference poprvé prokázána v rámci pokusu o umlčení exprese genu pro protein velké ribozomální podjednotky (RPP0) s využitím expresního systému *T. brucei* (Inoue et al., 2002). O rok později byla metoda RNAi využita ke zkoumání funkce mitochondriálního heat shock proteinu 70 u procyklické

formy tohoto parazita (Bannai et al., 2003). Následně byl vyvinut vlastní expresní systém pro *T. congolense*, jakožto účinný nástroj k pochopení mechanismů patogeneze a k analýze potenciálních terapeutických cílů (Coustou et al., 2010). O dva roky později se stejnému týmu vědců podařilo identifikovat multigenní rodinu transsialidáz (TconTS) a s využitím metody RNAi prokázat korelaci mezi vypnutím exprese TconTS a narušením virulence v průběhu experimentální infekce myši (Coustou et al., 2012). V experimentu publikovaném v roce 2013 vyústila RNAi řízená delece genů pro dvě aminopeptidázy typu M1 k inhibici růstu u procyklické formy parazita (Pillay et al., 2013).

Funkční dráha RNAi byla prokázána i u *T. evansi*, parazita způsobujícího onemocnění domácích zvířat zvané surra. Witola et al. (2004) provedl experiment s umlčením genu pro adenosinový transportér 1 (TevAT1) opět s využitím expresního systému *T. brucei*. Vypnutí exprese genu pro TevAT1 vedlo k navození rezistence vůči určitému typu léčiv, jako je např. berenil nebo samorin

Ve stejném roce byla metoda RNAi aplikována k umlčení exprese genů pro beta tubulin, amastin, GP72 (flagellar adhesion protein) a ribozomální protein P0 u *T. cruzi* s použitím tetracyklin-inducibilního T7 expresního systému. Očekávaný fenotyp po působení dsRNA však nebyl pozorován u žádného ze čtyř testovaných genů (DaRocha et al., 2004). Ačkoliv u *T. cruzi* nebyla prokázána dráha RNA interference ani orthology proteinu Dicer (El-Sayed et al., 2005a), obsahuje její genom mobilní genetické elementy (Wickstead et al., 2003). Předpokládá se tedy, že tento druh trypanosomy využívá k ochraně před retropozóny nějaké alternativní strategie (El-Sayed et al., 2005b). V roce 2010 byl objeven ortholog proteinu Argonaute obsahující konzervovanou PIWI doménu, který je exprimován u všech stádií v průběhu životního cyklu *T. cruzi* (Garcia Silva et al., 2010). O rok později byl genom *T. cruzi* analyzován na přítomnost malých nekódujících RNA molekul. Ukázalo se však, že miRNA a siRNA sloužící jako mediátory dsRNA řízené degradace mRNA v genomu tohoto parazita chybí (Franzén et al., 2011).

### 3.3 Využití metody RNAi u *Leishmania* spp.

Po prvotním nadšení z úspěšných pokusů provedených na zástupcích rodu *Trypanosoma* se bohužel zjistilo, že dráha RNA interference není funkční u většiny zástupců rodu *Leishmania* (podrod *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L. mexicana*) (Ullu et al., 2004; Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Zhang and Matlashewski (2000) se neúspěšně pokusili modulovat expresi genu A2 pomocí dsRNA u *L. donovani*. O tři roky později byla dráha RNAi testována u *L. major* a *L. donovani*. Ukázalo se, že vnesení siRNA pro alfa tubulin do kultury *L. major* a *L. donovani* nemá žádný vliv na snížení exprese příslušného genu, ani na růst a morfologii buněk parazitů (Robinson and Beverley, 2003).

Výjimku tvoří *Leishmania braziliensis* (podrod *Viannia*), u které byly prokázány orthology proteinů Dicer a Argonaute (Peacock et al., 2007). Lye et al. (2010) pomocí RNAi umlčel expresi hned

několika genů. Nejsilnější fenotypový projev byl dosažen v případě umlčení genů pro proteiny paraflagelární tyče. Slibné výsledky přinesl také pokus o umlčení exprese genu kódujícího alfa tubulin, kdy po vnesení syntetické dsRNA do kultury *L. braziliensis* došlo ke snížení hladiny komplementární mRNA o 63 %. *L. braziliensis* patří, na rozdíl od výše zmíněných zástupců, do podrodu *Viannia* a předpokládá se, že ke ztrátě RNAi došlo právě v momentě oddělení těchto dvou evolučních linií. K potlačení dráhy RNAi u zástupců podrodu *Leishmania* mohlo dojít vlivem několika selekčních tlaků, mezi které patří působení virů, ztráta mobilních genetických elementů a fenotypová selekce (Lye et al., 2010). V dalším experimentu z roku 2016 byl studován vliv dsRNA viru LRV1 (Leishmania RNA virus 1) na virulenci *L. braziliensis*. U tohoto parazita došlo v průběhu evoluce k ustavení rovnováhy mezi replikací viru LRV1 a jeho degradací aktivitou RNA interference. Tento experiment prokazuje, že zvýšená míra exprese siRNA cílených proti viru LRV1 vede k jeho eliminaci a k následnému snížení patogenicity *L. braziliensis* (Brettmann et al., 2016).

## 4 CRISPR

### 4.1 Evoluční původ CRISPR/Cas systémů

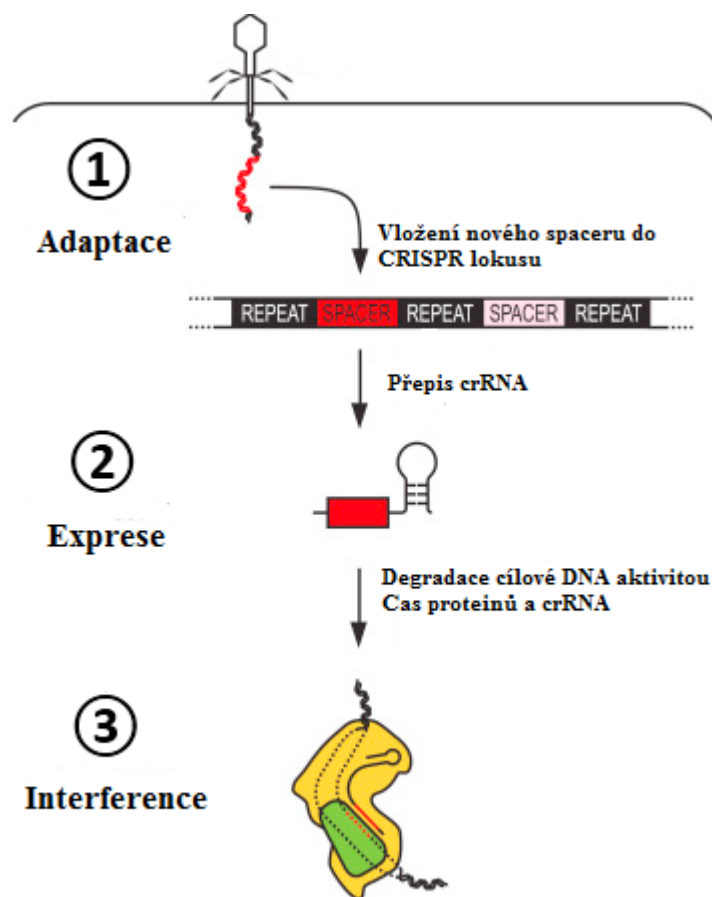
Stejně jako objev RNAi, tak i objev CRISPR/Cas systému jako nástroje k editaci genomů způsobil revoluci v oblasti genového inženýrství. Na rozdíl od RNAi má CRISPR/Cas původ v prokaryotickém imunitním systému schopném účinně rozpoznávat a ničit virové a plazmidové sekvence (Horvath and Barrangou, 2010). Princip imunitní odpovědi spočívá v integraci krátkého úseku virové sekvence do tzv. CRISPR lokusu po vstupu daného infekčního agens do buňky. Tento proces slouží k navození genetické paměti využitelné při reinfekci daným patogenem (Rath et al., 2015).

Označení **CRISPR** (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) odkazuje na repetitivní úseky DNA o délce 21 až 37 bp oddělené sekvenčně variabilními úseky virového nebo plazmidového původu zvanými „spacers“. Jednotlivé CRISPR lokusy jsou od sebe odděleny tzv. leader sekvencí, která navíc funguje jako promotor (Jansen et al., 2002). Od doby primárního objevu u *Escherichia coli* v roce 1987 (Ishino et al., 1987) byly tyto repetitivní úseky DNA zaznamenány pod různými jmény u řady dalších bakterií a archeí, např. TREPs u *Haloferax mediterranei* a *H. volcanii* (Mojica et al., 1995), DVRs u *Mycobacterium tuberculosis* (van Embden et al., 2000) nebo LCTR u *Sulfolobus solfataricus* (She et al., 2001). V roce 2002 pak vznikl akronym CRISPR pro pojmenování této nově objevené rodiny repetitivních DNA sekvencí (Jansen et al., 2002). Do roku 2017 byla přítomnost CRISPR lokusů prokázána u 45 % bakterií a 87 % archeí (Grissa et al., 2017, web 1).

Mezi důležité komponenty tohoto systému patří i geny **Cas** asociované s CRISPR lokusy, které kódují proteiny nesoucí funkční domény typické pro nukleázy, helikázy, polymerázy a polynukleotid-vázající proteiny (Haft et al., 2005). Funkční propojení Cas genů a CRISPR lokusů bylo prokázáno v několika experimentech. V jednom z těchto experimentů narušila inaktivace genu *Cas7* u buněk *Streptococcus thermophilus* schopnost integrace nového spaceru po expozici bakterie příslušným fágem. Předpokládá se tedy, že *Cas7* hraje důležitou roli v rozpoznání cizorodé nukleové kyseliny a/nebo v jejím začlenění do genomu (Barrangou et al., 2007). V dalším experimentu bylo zjištěno, že protein *Cas1* funguje jako endonukleáza štěpící cizorodou DNA na dvouvláknové fragmenty o velikosti cca 80 bp (Wiedenheft et al., 2009). CRISPR/Cas systém pravděpodobně patří mezi mobilní genetické elementy, které se šíří horizontálním genovým přenosem, což přispívá k vysoké míře výskytu tohoto systému u bakterií a archeí (Rath et al., 2015).

Existenci homologií mezi sekvencemi spacerů a cizorodou DNA pocházející z virů a plazmidů prokázaly v roce 2005 tři na sobě nezávislé výzkumné týmy: Bolotin et al. (2005); Mojica et al. (2005); Pourcel et al. (2005). Toto zjištění vědce přivedlo k myšlence označující CRISPR za adaptivní složku prokaryotického imunitního systému (Makarova et al., 2006). Imunitní odpověď založená na CRISPR/Cas systému probíhá ve třech krocích jejichž průběh je zaznamenán na níže uvedeném obrázku 4. Ve fázi adaptace dochází k začlenění nového úseku cizorodé DNA do CRISPR lokusu, a

tedy i k vytvoření genetické paměti. Tento proces probíhá pouze při primárním setkání s daným patogenem, vůči němuž je buňka imunitně naivní. V dalším kroku dochází ke spuštění exprese Cas genů a k přepisu DNA příslušného spaceru a repetice v tzv. pre-crRNA. Ta je následně upravena aktivitou Cas proteinů ve zralou crRNA. Poslední fáze imunitní odpovědi spočívá v rozpoznání cizorodé DNA, která je následně rozštěpena aktivitou ribonukleoproteinové částice zformované z molekul crRNA a Cas proteinů (Rath et al., 2015).



Obrázek 4: Klíčové kroky imunitní odpovědi založené na CRISPR/Cas systému: 1) Adaptace – vložení nového spaceru do CRISPR lokusu, 2) Exprese – přepis CRISPR lokusu a následná úprava CRISPR RNA, 3) Interference – štěpení cizorodé DNA aktivitou Cas proteinů a CRISPR RNA (Rath et al., 2015).

## 4.2 Klasifikace CRISPR/Cas systémů

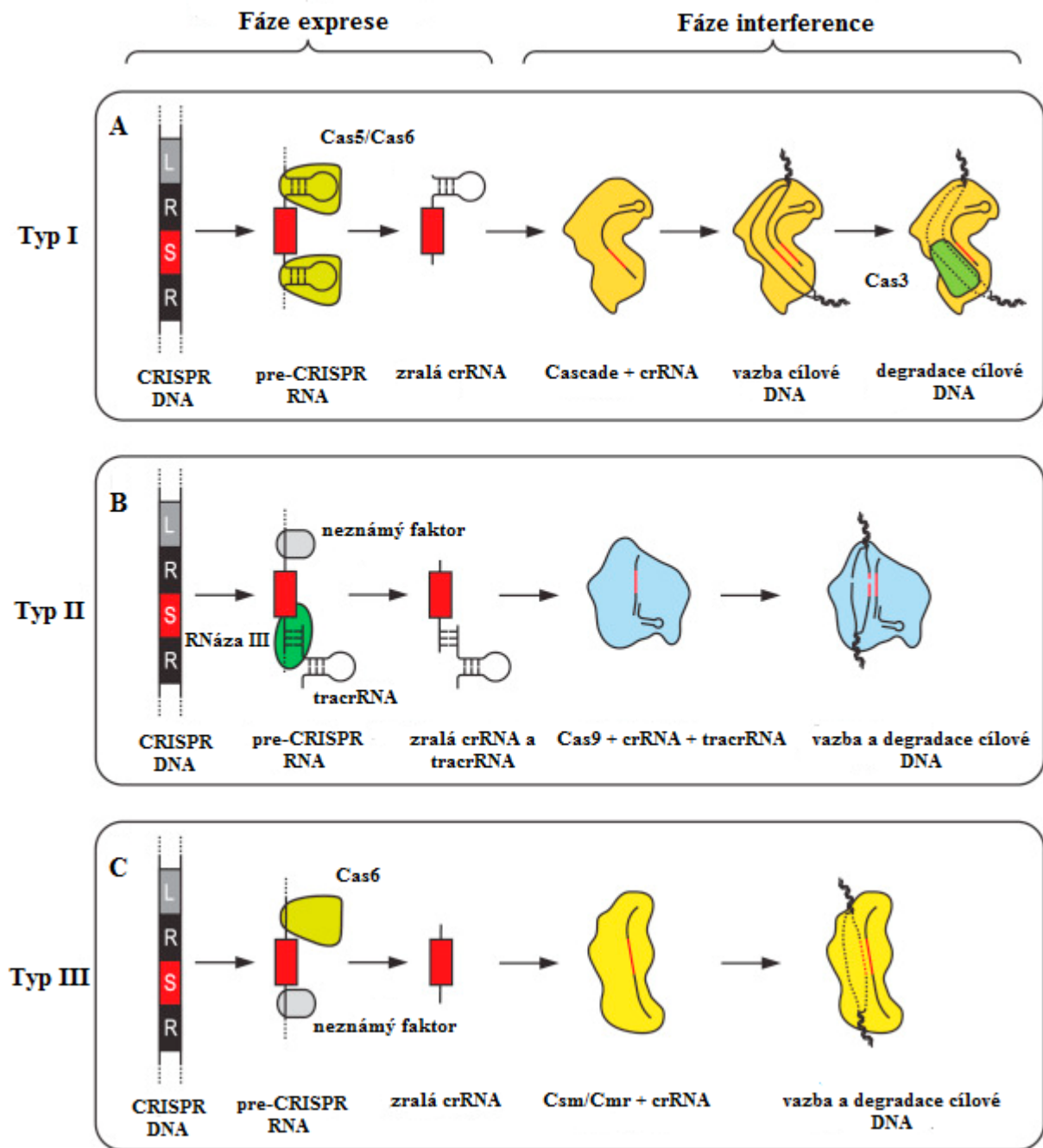
Na základě odlišných molekulárních mechanismů využívaných v procesu úpravy pre-crRNA a degradace cizorodé DNA byly definovány tři různé typy CRISPR/Cas systému (viz. obrázek 5), které se dále dělí na několik subtypů. Univerzálními komponentami napříč všemi třemi typy systémů jsou proteiny Cas1 a Cas2 hrající klíčovou roli ve fázi adaptace (Makarova et al., 2011).

První skupina CRISPR/Cas systémů sdružuje šest subtypů (A–F), které jsou definovány přítomností proteinu Cas3. Struktura tohoto proteinu obsahuje jak helikázovou, tak nukleázovou doménu a je tedy zřejmé, že protein Cas3 hraje klíčovou roli v procesu degradace cizorodé DNA (Sinkunas et al., 2011). Všechny subtypy této skupiny dále exprimují geny pro proteiny tzv. cascade-like komplexu, který je mimo jiné zapojen do procesu úpravy pre-crRNA skrze enzym z rodiny RAMP s RNA endonukleázovou aktivitou (Brouns et al., 2008). Proteiny cascade-like komplexu se dále účastní procesu rozpoznání cizorodé DNA a inserce nového spaceru (Rath et al., 2015).

Druhá skupina zahrnující tři subtypy (A–C) (Koonin and Makarova, 2013) vyžaduje pro svou aktivitu protein Cas9 figurující mimo jiné ve fázi adaptace (Heler et al., 2015; Wei et al., 2015) a molekuly trans-activating RNA (tracrRNA), které společně s RNázou III hrají klíčovou roli v procesu maturace crRNA (Deltcheva et al., 2011). Nejdůležitější funkce endonukleázy Cas9 pak spočívá v místně specifickém štěpení cílové DNA v poslední fázi imunitní odpovědi, které je řízeno duplexem tracrRNA:crRNA (Chylinski et al., 2013). Subtypy A a B navíc exprimují gen pro čtvrtý protein (*csn2* nebo *csn4*), který se účastní fáze adaptace (Rath et al., 2015). Zajímavé je, že tento systém se na rozdíl od systémů typu I a III nachází pouze v genomu bakterií (Makarova et al., 2011).

Druhým aspektem odlišujícím tyto tři systémy je substrátová specifita. Zatímco výše zmíněné systémy slouží k obraně proti cizorodé DNA, třetí systém rozpoznává jako substrát také RNA. Klíčovou komponentu tohoto systému, který se dále dělí na dva subtypy (A-B), zastupuje protein Cas10, jehož funkce nebyla doposud objasněna (Rath et al., 2015). Je však známo, že proteiny Cas asociované s tímto typem systému tvoří komplex s nukleázovou aktivitou zvaný CSM (subtyp A), respektive CMR (subtyp B) v závislosti na specifitě vůči DNA nebo RNA (Rouillon et al., 2013; Spilman et al., 2013; Staals et al., 2013).

V posledních letech byl navržen čtvrtý systém, který exprimuje několik genů cascade komplexu, avšak neobsahuje repetitivní DNA sekvence z rodiny CRISPR ani proteiny Cas1 a Cas2 (Koonin and Krupovic, 2015). Nukleázová aktivita komplexu je vzhledem k absenci crRNA nejspíš řízena skrze interakce mezi proteiny cascade komplexu a cizorodou DNA a předpokládá se, že tento systém je k ochraně před určitým typem DNA sekvencí přednastaven (Rath et al., 2015).



Obrázek 5: Proces úpravy pre-crRNA a fáze interference: A) Typ I – Pre-crRNA je upravena aktivitou proteinů Cas5 a Cas6. V procesu degradace cílové DNA hraje klíčovou roli protein Cas3 společně s cascade komplexem; B) Typ II – Pro úpravu pre-crRNA je vyžadována aktivita tracrRNA a RNázy III. Za degradaci cílové DNA je pak zodpovědná endonukleáza Cas9; C) Typ III – Pre-crRNA je opět upravena aktivitou proteinu Cas6 ve spolupráci s neznámým doplňkovým faktorem. Cas proteiny vytváří Csm/Cmr komplex s nukleázovou aktivitou v závislosti na specifitě vůči DNA/RNA (Rath et al., 2015).



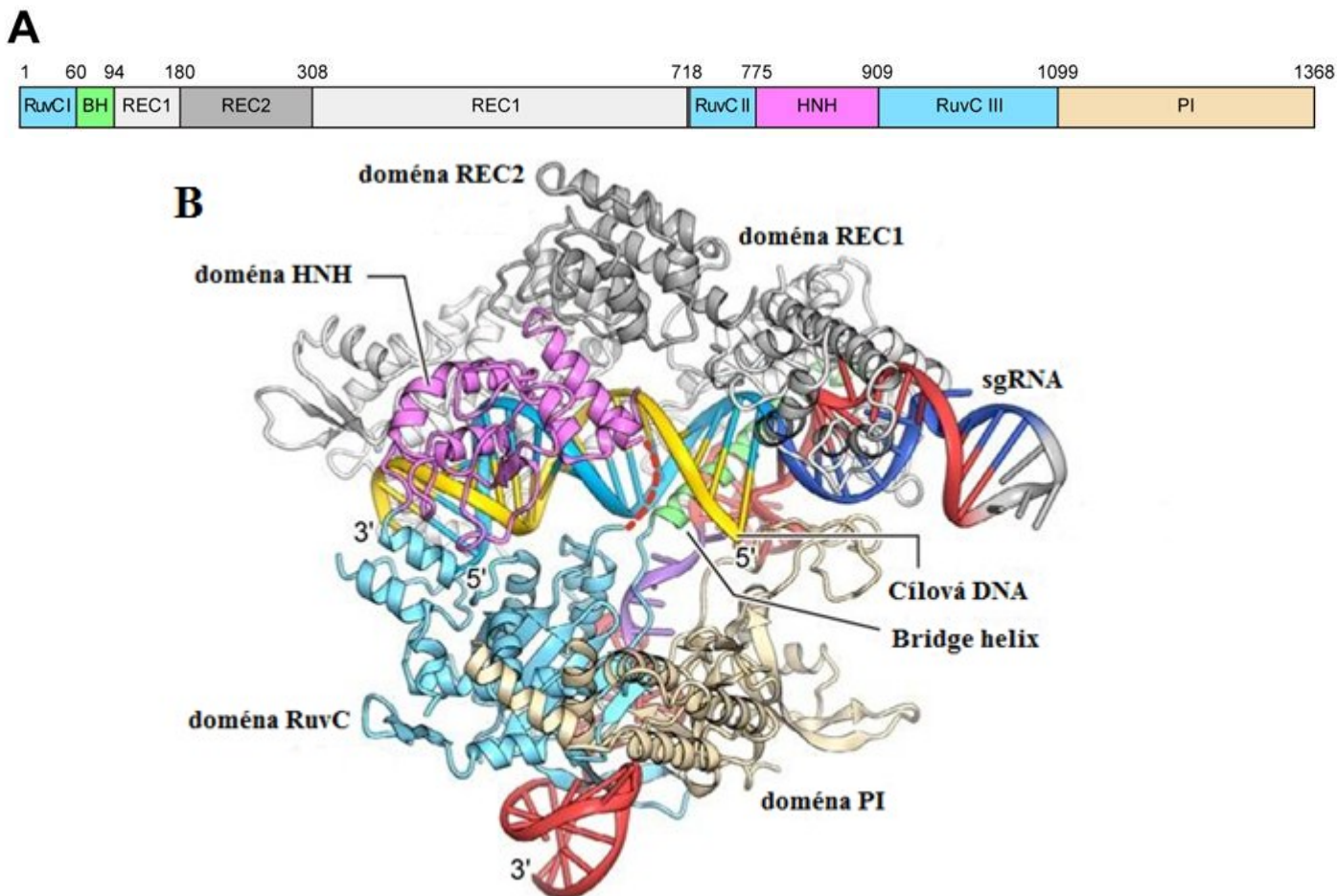
### 4.3 CRISPR/Cas systém typu II jako nástroj genového inženýrství

V rámci genového inženýrství se k editaci genomů nejčastěji využívá CRISPR/Cas systém typu II pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*, který v procesu místně specifického štěpení DNA vyžaduje pouze jediný protein, a to endonukleázu Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014). Využitelnost tohoto systému byla poprvé prokázána v roce 2011, kdy transplantace CRISPR lokusu typu II z bakterie *Streptococcus thermophilus* navodila schopnost místně specifického štěpení DNA v bakterii *Escherichia coli* (Sapranauskas et al., 2011). O rok později bylo experimentálně prokázáno, že ribonukleoproteinový komplex složený z endonukleázy Cas9 a crRNA izolovaný z bakterie *S. thermophilus* indukuje *in vitro* tvorbu dvouvláknových zlomů jak v syntetické, tak v plazmidové DNA nesoucí nukleotidovou sekvenci komplementární ke crRNA (Gasiunas et al., 2012). Pozdější experiment však poukazuje na nepostradatelnost přídatných molekul tracrRNA v procesu RNA řízeného štěpení DNA zprostředkovaného endonukleázou Cas9 *in vitro* i *in vivo*. Tento pokus navíc prokazuje vliv proteinu Cas9 na tvorbu duplexu tracrRNA:crRNA (Karvelis et al., 2013).

Pro účely genového inženýrství byla vyvinuta chimérická molekula zvaná single guide RNA (sgRNA) zformovaná z obou nezbytných složek, tj. crRNA a tracrRNA (Jinek et al., 2012). Molekula crRNA nese informaci o 20 nukleotidů velké guide RNA sekvenci, která je komplementární k úseku cílové DNA zvanému protospacer (Hsu et al., 2013). Endonukleáza Cas9 rozpoznává toto štěpné místo skrze 5'-NGG-3' sekvenci zvanou PAM (protospacer-adjacent motif), která je lokalizována bezprostředně za protospacerem (Heler et al., 2015). Analýza lidského genomu odhalila skutečnost, že na každý úsek DNA o délce 8 bp připadá 1 NGG sekvence, kde N zastupuje libovolnou bázi a G označuje guanin. Vysoká četnost štěpných míst dělá z proteinu Cas9 univerzální molekulární nůžky (Cong et al., 2013).

#### 4.3.1 Protein Cas9

Struktura proteinu Cas9 obsahuje šest domén (REC I, REC II, Bridge Helix, PAM Interacting, HNH a RuvC), jejichž vzájemná poloha je zobrazena na níže uvedeném obrázku 6 (Jinek et al., 2014). Zatímco doména REC I zprostředkovává kontakt se sgRNA (Nishimasu et al., 2014), PAM interacting doména je zodpovědná za vazbu k cílové DNA (Anders et al., 2014; Sternberg et al., 2014). Bridge helix pak iniciuje štěpící aktivitu proteinu skrze domény s nukleázovou aktivitou RuvC a HNH (Nishimasu et al., 2014). Doména RuvC se skládá ze třech subdomén počínaje RuvC I na N-konci. Subdomény II a III pak ohraničují doménu HNH, která se nachází zhruba v polovině lineární struktury proteinu (Hsu et al., 2014). Role domény REC II nebyla doposud objasněna.

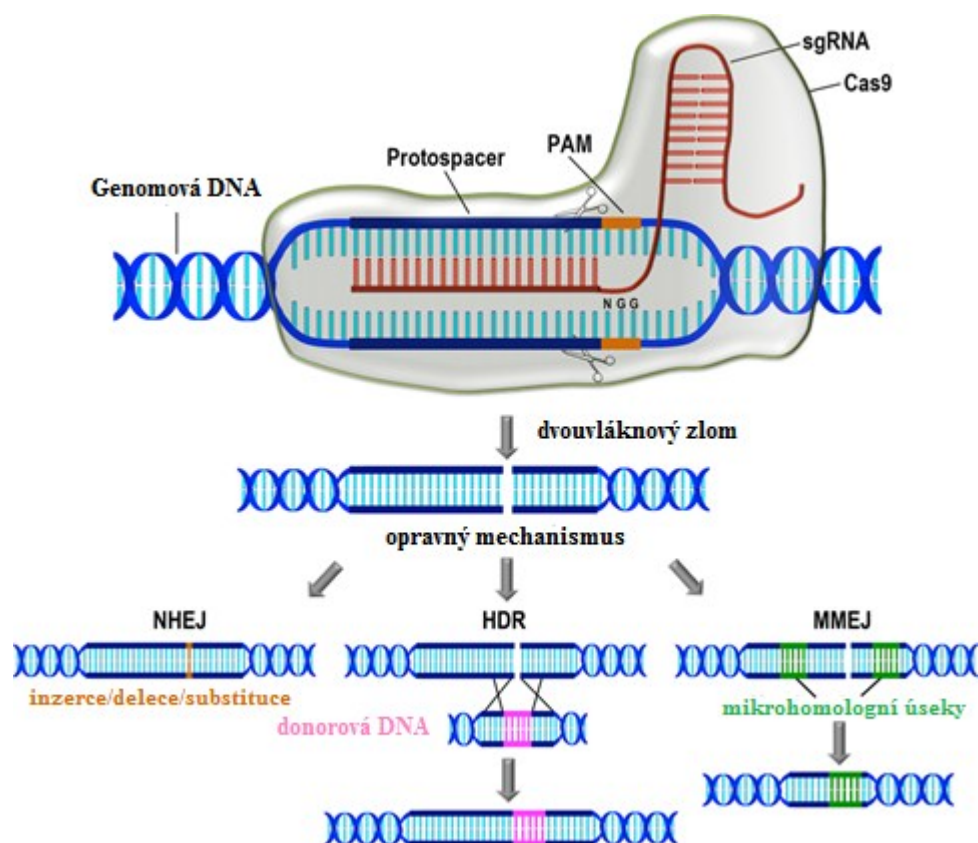


Obrázek 6: Struktura proteinu Cas9: A) Organizace domén v rámci schematické struktury proteinu SpCas9; B) Krystalická struktura Cas9-sgRNA-DNA komplexu (Nishimasu et al., 2014).

V posledních letech byly pomocí genového inženýrství vyvinuty dva vysoce specifické typy proteinu Cas9, tzv. eSpCas9 („enhanced specificity“ SpCas9) (Slaymaker et al., 2016) a SpCas9-HF1 (high-fidelity SpCas9) (Kleinstiver et al., 2016) zajišťující minimální chybovost v procesu štěpení DNA oproti původnímu typu proteinu SpCas9 izolovanému z bakterie *S. pyogenes*, který toleruje až 4 chyby vzniklé v průběhu Watson-Crickovského párování bází mezi gRNA sekvencí a sekvencí protospaceru (Hsu et al., 2013).

#### 4.3.2 Mechanismy opravy dvouvláknových zlomů

Dvouvláknové zlomy (DSB) vznikají nejen působením endonukleáz, ale i fyzikálními nebo chemickými vlivy a narušují genomovou stabilitu napadených buněk. Z tohoto důvodu se u organismů v průběhu evoluce vyvinulo několik opravných mechanismů (viz. obrázek 7) sloužících k udržení integrity genomu. Mezi dva nejrozšířenější opravné mechanismy, které byly rozsáhle studovány, patří homologní rekombinace (HDR) a tzv. non-homologous end-joining pathway (NHEJ) (Chapman et al., 2012). Později byla objevena alternativní dráha zvaná microhomology-mediated end-joining pathway (MMEJ) přítomná např. u *Plasmodium falciparum* (Kirkman et al., 2014).



Obrázek 7: Schéma CRISPR/Cas systému typu II a mechanismů oprav dvouvláknových zlomů: Místně specifickému štěpení DNA aktivitou endonukleázy Cas9 předchází rozpoznání úseku cílové DNA pomocí sgRNA mechanismem Watson-Crickovského párování bází. Vzniklé dvouvláknové zlomy (DSB) pak mohou být opraveny třemi mechanismy. V případě dráhy **NHEJ** dochází k přímé ligaci konců DSB. Tento způsob je velmi náchylný k chybám a vede k malým inzercím, delecím nebo substitucím v oblasti zlomu. Dráha **HDR** vyžaduje přítomnost donorové molekuly DNA obsahující úseky DNA homologní k sekvencím ležícím bezprostředně před a za místem štěpení. Tato molekula slouží jako templát pro opravu DNA homologní rekombinací. Oprava pomocí dráhy **MMEJ** spočívá ve spojení konců v oblasti tzv. mikrohomologních úseků, kterému předchází rozsáhlá delece bází mezi těmito úseky (Lander et al., 2016a).

## 5 Využití CRISPR/Cas systému II ke genetickým manipulacím u parazitických protist

Vzhledem k tomu, že metoda CRISPR je v porovnání s metodou RNA interference výrazně mladší, počet studií využívající CRISPR/Cas systém ke genetickým manipulacím parazitických protist je řádově nižší. Stručný přehled publikovaných prací, které budou u vybraných skupin detailněji zpracovány v následující kapitole, nabízí tabulka 2.

*Tabulka 2: Přehled parazitických protist, jejichž geny byly úspěšně editovány pomocí CRISPR/Cas systému typu II.*

Organismus	Využití	Mechanismus opravy DSB
<i>Plasmodium falciparum</i> *	genový knockout; inserce bodových mutací; genový knockin	HDR, MMEJ
<i>Plasmodium yoelli</i> *	genový knockout; inserce bodových mutací; C-koncové značení proteinu	HDR
<i>Cryptosporidium parvum</i>	genový knockout a knockin	HDR
<i>Toxoplasma gondii</i>	nahrazení kompletního genového tandemu; genový knockout a knockin; inserce bodových mutací; C-koncové značení proteinu	NHEJ, HDR
<i>Leishmania donovani</i> *	genový knockout; C-koncové značení proteinu; inserce bodových mutací; indukce chromozomových translokací, knockout kompletní genové rodiny	HDR, MMEJ
<i>Leishmania major</i> *	genový knockout; knockout kompletního genového tandemu, C-koncové značení proteinu	HDR
<i>Leishmania mexicana</i> *	genový knockout	HDR
<i>Trypanosoma cruzi</i> *	genový knockout; knockout kompletní genové rodiny; výměna exogenního genu, C-koncové značení proteinu	HDR, MMEJ
<i>Trypanosoma brucei</i> *	genový knockout	HDR

\* více informací o využití metody CRISPR u těchto skupin bude uvedeno v dalších podkapitolách

### 5.1 Využití metody CRISPR u *Plasmodium* spp.

První zpráva o využití metody CRISPR u *Plasmodium falciparum* byla publikována v roce 2014. V tomto experimentu vědci cílili na dva geny kódující zelený fluorescenční protein se zvýšenou mírou exprese (egfp) a tzv. knob-associated histidine-rich protein (kharp). K transfekci buněk krevní formy *P. falciparum* byl použit epizomální vektor zajišťující expresi proteinu Cas9. Molekula sgRNA a donorová DNA obsahující kazetu nesoucí rezistenci vůči antifolátovému léčivu označovanému WR

byly umístěny do druhého expresního vektoru. Během třech týdnů po transfekci došlo k vyselektování jedinců, u kterých úspěšně proběhl proces náhrady lokusu *egfp*, respektive *kharp*, kazetou nesoucí rezistenci vůči WR cestou homologní rekombinace. V druhé části experimentu vědci využili CRISPR k inzerci bodové mutace do genu *kharp* bez nutnosti integrace selekčního markeru (Ghorbal et al., 2014). V dalším experimentu byla metoda CRISPR využita k deleci genu *eba-175*, který kóduje protein nezbytný pro vnik *P. falciparum* do červené krvinky a výše zmíněného genu *kharp*. K vnesení endonukleázy Cas9 a sgRNA do buněk krevní formy parazita byl použit plazmid pCas9-sgRNA-T. Donorová DNA pak byla vnesena skrze plazmid pT7 RNAP-HR společně s RNA polymerázou T7 zajišťující expresi sgRNA. S použitím tohoto systému byla dosažena efektivita v rozmezí 50 až 100 % (Wagner et al., 2014).

Využitelnost CRISPR/Cas systému typu II k editaci genů byla prokázána i u *Plasmodium yoelli* způsobujícího onemocnění u hlodavců. S použitím jednovektorové strategie v procesu delece genů kódujících serinové proteázy krevních stádií Pysera1 a Pysera2 bylo dosaženo 100% efektivity. Stejná efektivita bylo dosaženo i v případě delece genu *PyPDH/E1 $\alpha$*  nezbytného pro vývoj parazita v játrech. V případě značení membránového proteinu Py03652 na C-konci pomocí zeleného fluorescenčního proteinu GFP klesla efektivita procesu na rozmezí 22–45 %. Nízké efektivity (25 %) bylo dosaženo i v případě inzercie bodové mutace do kódující oblasti genu pro protein PyHsp40 exprimovaný v odpovědi na tepelný stres (Zhang et al., 2014). V roce 2016 byla pomocí metody CRISPR prokázána přímá souvislost mezi inzercí bodové mutace do kódující oblasti genu pro membránový transportér PfMDR-1 a vzniklou rezistencí vůči piperazinovému léčivu cílenému proti asexuálním krevním stádiím a zralým gametocytům (Ng et al., 2016). Podobný experiment byl proveden i s lokusem *pfcarl*, který kóduje protein lokalizovaný v Golgiho aparátu sexuálních i asexuálních krevních stádií. Použití CRISPR/Cas systému k vnesení bodových mutací do tohoto lokusu vedlo k rozvoji rezistence vůči imidazolpiperazinovým léčivům a několika dalším strukturně nepříbuzným sloučeninám (LaMonte et al., 2016). Ve stejném roce vědci vyvinuli tzv. suicide-rescue systém, jehož výhoda spočívá v možnosti vnášení větších donorových DNA sekvencí při knockinech genů. Tento systém se skládá ze suicide vektoru, který nese selekční marker, endonukleázu Cas9 a sgRNA a jehož funkce spočívá v tvorbě dvouvláknových zlomů v cílové DNA a rescue vektoru nesoucího donorovou DNA bez obsahu selekčního markeru, který zodpovídá za indukci opravy DSB cestou homologní rekombinace. Vlivem selekčního tlaku antibiotik tedy přežijí pouze buňky, které obdržely oba vektory. V tomto experimentu byl suicide-rescue systém využit k deleci genu *Pfset2* exprimovaného u krevních stádií *P. falciparum* a k inzerci genu *gfp-ruc* vzniklého fúzí zeleného fluorescenčního proteinu s renilla luciferázou do lokusu *Pf47* (Lu et al., 2016).

Metoda CRISPR byla dále využita k vytvoření geneticky modifikované linie *P. falciparum* stabilně exprimující rapamycinem indukovatelnou DiCre rekombinázu, která efektivně štěpí DNA sekvence ohraničené tzv. lox-P místy a je tak využitelná k funkční analýze genů esenciálních pro vývoj krevních

stádií tohoto parazita (Knuepfer et al., 2017). V další studii zabývající se hlodavčím plasmodiem *P. yoelli* vědci vyvinuli recyklovatelný vektor využitelný k opakované editaci genomu. V první části experimentu byl vektor úspěšně použit v procesu značení povrchového proteinu ookinetu PyP28 na C-konci červeným fluorescenčním proteinem mCherry. Z takto geneticky modifikovaných parazitů byl vektor odstraněn negativní selekcí pomocí antibiotik a znovu použit k delecí genů *Pyctrp* a *Pycdpk3*, která vedla ke snížení pohyblivosti ookinetu *in vitro* a k zablokování vývoje oocysty ve střevě komára (Zhang et al., 2017a). Metoda CRISPR byla také použita k objasnění souvislosti mezi vnášením bodových mutací do kódující oblasti genu pro sodíkový kanál PfATP4 a vznikem rezistence vůči léčivu SJ733 s účinnou látkou dihydroisoquinolonem. Tento experiment navíc navrhuje novou metodu k vnášení jednotlivých komponent CRISPR/Cas systému do buněk *P. falciparum* bez použití plazmidů (Crawford et al., 2017). V poslední studii z července tohoto roku byl CRISPR/Cas systém použit k objasnění role konzervovaného intronu *var2csa* jakožto regulačního elementu v procesu přepínání mezi jednotlivými variantami var genů (Bryant et al., 2017).

## 5.2 Využití metody CRISPR u *Trypanosoma* spp.

První studie potvrzující úspěšné použití metody CRISPR k editaci genomu *Trypanosoma cruzi* byla rovněž publikována v roce 2014. Vytvoření mutantní linie epimastigotů stabilně exprimující endonukleázu Cas9 přineslo zajímavé výsledky, protože takto modifikovaní epimastigoti vykazovaly signifikantní inhibici růstu způsobenou toxicitou proteinu Cas9. Následná sgRNA řízené poškození genu kódujícího histidine amonia lyázu (HAL) vedla k 60% snížení aktivity tohoto enzymu. V případě poškození genu kódujícího transportér mastných kyselin (FATP) došlo k 37% poklesu míry absorpce mastných kyselin. Další část tohoto experimentu byla zaměřena na využití CRISPR/Cas systému k nahrazení genu kódujícího zelený fluorescenční protein (GFP) genem pro červený fluorescenční protein (TdTomato) cestou homologní rekombinace. Metoda CRISPR byla využita i k poškození genové rodiny  $\beta$ -galactofuranosyl glycosyltransferáz ( $\beta$ -GalGT) sdružující 65 členů se sekvenční homologií dosahující 93 %. Ukázalo se, že 63 % genů vykazovalo delecí alespoň v jednom ze třech míst, na něž bylo cíleno molekulami sgRNA. Tento experiment dále prokázal využití mechanismu MMEJ v procesu opravy dvouvláknových zlomů v případě absence donorové DNA (Peng et al., 2014). O pár měsíců později byla publikována studie uvádějící tři různé strategie použité k delecí genů kódujících proteiny bičíku u *T. cruzi*. S použitím jednoho nebo dvou vektorů zajišťujících expresi Cas9 a sgRNA v buňkách epimastigotů pod kontrolou ribozomálního promotoru nebo jednoho vektoru nesoucího sgRNA, Cas9 a donorovou DNA indukující opravu DSB cestou homologní rekombinace vědci poškodili geny *gp72*, *PFR1* a *PFR2* kódující proteiny bičíku. Následná fenotypová analýza odhalila klíčovou roli těchto proteinů v procesu uchycení bičíku k tělu buněk epimastigotů a potvrdila nepostradatelnost proteinů PFR1 a PFR2 při tvorbě paraflagelární tyče bičíku. V případě použití jednoho vektoru s obsahem sgRNA, Cas9 a donorové DNA bylo dosaženo 100% efektivity (Lander et

al., 2015). V roce 2016 byla publikována studie využívající metodu CRISPR ke značení proteinů protilátkami na C-konci. V rámci tohoto experimentu byla potvrzena předpokládaná subcelulární lokalizace mitochondriálního vápníkového uniporteru a ukázalo se, že inositol 1,4,5-trisfosfátový receptor (TcIP3R) je lokalizován v acidokalcizomech (Lander et al., 2016b). Metoda CRISPR byla dále použita k objasnění funkce dvou podjednotek mitochondriálního vápníkového uniporteru. Ukázalo se, že delece genů pro podjednotky TcMCU a TcMCUb v buňkách epimastigotů vedla ke snížení vtoku vápenatých iontů do mitochondrie bez ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu. Zatímco epimastigoti s knockoutovaným genem pro TcMCU nevykazovali poruchu schopnosti replikace, infekce hostitelských buněk nebo schopnost diferenciaci v trypomastigoty, delece genu pro TcMCUb vedla k inhibici růstu, poruchám mitochondriálního respiračního řetězce a metacyklogeneze a k neschopnosti infikovat hostitelské buňky (Chiurillo et al., 2017).

V nejnovější studii z roku 2017 byla vyvinuta nová metoda k vnášení sgRNA do buněčných linií *T. brucei* stabilně exprimujících endonukleázu Cas9 pomocí PCR-generovaných DNA templátů, které se transkribují *in vivo* aktivitou T7 polymerázy. Tato strategie byla úspěšně použita k deleci genu kódujícího glykofosfatidylinositol-specifickou fosfolipázu C zodpovědnou za uvolnění GPI-kotvených povrchových glykoproteinů (VSG) z mrtvých buněk krevní formy *T. brucei* (Beneke et al., 2017).

### **5.3 Využití metody CRISPR u *Leishmania* spp.**

V roce 2015 byla metoda CRISPR rovněž poprvé úspěšně použita k deleci kompletního genového tandemu obsahujícího tři kopie genu *PFR2* u *Leishmania major*. V tomto experimentu vědci použili dva vektory k vnesení endonukleázy Cas9 a molekuly sgRNA exprimované pod kontrolou U6snRNA promotoru společně s donorovou DNA. Následná analýza fenotypu odhalila absenci proteinu PFR2 u takto geneticky modifikovaných leishmanií. Ukázalo se však, že delece tohoto lokusu neproběhla se 100% účinností (Sollelis et al., 2015). Ve stejném roce byla publikována studie využívající metodu CRISPR k deleci a C-koncovému značení genu kódujícího miltefosinový transportér (LdMT) u druhu *Leishmania donovani*. V rámci této studie byla odhalena nová bodová mutace v transportéru vedoucí k rezistenci vůči miltefosinu, jedinému dostupnému léčivu proti leishmaniím podávanému perorálně. V tomto experimentu vědci použili dvouvektorovou strategii zahrnující vektor nesoucí endonukleázu Cas9 a druhý vektor s obsahem sgRNA, která se exprimuje pod kontrolou ribozomálního promotoru. Do druhého vektoru byla navíc vnesena sekvence pro ribozym viru hepatitidy delta zabraňující polyadenylaci molekuly sgRNA. Ukázalo se, že přítomnost ribozymu zvýšila efektivitu editace genomu o 6 %. V tomto experimentu byla navíc testována nová strategie zahrnující vektor s obsahem dvou molekul sgRNA. S použitím této strategie využívající dráhu MMEJ k opravě dvouvláknových zlomů vzrostla účinnost delece genu pro miltefosinový transportér čtyřikrát. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo v případě indukce opravy DSB cestou homologní rekombinace poskytnutím donorové DNA

s obsahem tří stop kodonů ohraničené homologními úseky o délce 25 nt, které odpovídají sekvencím ležícím na obou stranách zlomu. (Zhang and Matlashewski, 2015). Vysoká účinnost editačního procesu při použití tohoto typu donorové DNA byla potvrzena i v další studii publikované v roce 2017. V rámci této studie byla testována nová strategie spočívající v konstrukci expresního vektoru nesoucího tři molekuly sgRNA, který byl použit k současnému poškození genu pro miltefosinový transportér a 11 genů patřících do multigenové rodiny *A2* u *L. donovani*. Ukázalo se, že použití této strategie vede k vyšší účinnosti genového knockoutu. V další části tohoto experimentu byl vyvinut vektor zajišťující současnou expresi endonukleázy Cas9 a molekuly sgRNA, který je využitelný k editaci genomů všech dosud testovaných druhů leishmanií, konkrétně *L. donovani*, *L. mexicana* a *L. major*. Metoda CRISPR byla dále využita k inzerci bodové mutace do obou alel genu *RAD51* kódujícího DNA rekombinázu, která hraje klíčovou roli v procesu opravy DSB cestou homologní rekombinace. Pozorovaná smrt mutantů poukázala na nezbytnost tohoto genu pro přežití *L. donovani*. V poslední části experimentu vědci použili CRISPR/Cas systém k indukci všech čtyř typů chromozomových translokací v genomu leishmanií. V rámci této studie byla také prokázána klíčová role mechanismu MMEJ v procesu opravy DSB u zástupců rodu *Leishmania* (Zhang et al., 2017b). Nejnovější strategie využívající PCR-generované DNA templáty k vnášení sgRNA do buněk stabilně exprimujících endonukleázu Cas9 byla využita i u *L. mexicana* a *L. major*. Delece genu *PF16* kódujícího protein bičíku v buňkách promastigotů *L. major* a *L. mexicana* vedla ke ztrátě pohyblivosti bičíku již v prvním týdnu po transfekci. Se stejnou úspěšností byl deletován i gen *LPG1* v buňkách promastigotů *L. mexicana*, který kóduje galactofuranosyl transferázu zodpovědnou za biosyntézu molekul LPG. V poslední části experimentu byla tato metoda úspěšně použita k C-koncovému značení proteinu PF16 fluorescenčním proteinem NeonGreen v buňkách promastigotů *L. major* (Beneke et al., 2017).



## 6 Závěr

Metoda RNA interference je hojně využívána ve výzkumech zabývajících se charakterizací metabolických drah a funkční analýzou genů nezbytných pro přežití a vývoj příslušných patogenů v obratlovcích hostitelích i hmyzích přenašečích. Poznatky získané z těchto studií vedou k identifikaci potenciálních terapeutických cílů a k vývoji nových chemoterapeutik využitelných v boji proti příslušným patogenům. Problém s využitím tohoto nástroje však spočívá v absenci dráhy RNAi u řady parazitických protist, například u leishmanií.

Předpokládá se, že ke ztrátě RNAi u Trypanosomatid došlo v průběhu evoluce minimálně dvakrát. Zatímco první ztráta postihla linii vedoucí k *Trypanosoma cruzi*, ke druhé ztrátě došlo v momentě oddělení *Leishmania braziliensis* (podrod *Viannia*) od ostatních zástupců rodu *Leishmania*. Oddělení těchto dvou evolučních linií je spojeno s výraznými rozdíly v životním cyklu a virulenci, které by mohly odrážet změny genové exprese zprostředkované dráhou RNAi. Otázka funkce RNAi u zástupců rodu *Plasmodium* zůstává i nadále otevřená. Ačkoliv dsRNA řízená degradace mRNA byla u tohoto parazita prokázána v několika experimentech, geny pro proteiny Dicer a Argonaute, ani molekuly miRNA nebyly v genomu plasmodia nalezeny. Do popředí se nyní dostává myšlenka alternativní dráhy RNAi podpořená objevem nových druhů nekódujících molekul RNA v genomu *P. falciparum*, které by mohly sloužit jako její spouštěče.

Novinku na poli genového inženýrství představuje metoda CRISPR, která svou jednoduchostí, a především všestranností překonala dříve používané technologie jako jsou TALEN (transcription aktivátor-like effectors), ZFN (zinc finger nuclease) a výše zmíněná RNA interference. Hlavní výhoda tohoto dvousložkového systému (Cas9-sgRNA) jakožto nástroje genového inženýrství spočívá v možnosti jejího použití u organismů, u kterých nefunguje dráha RNAi, jelikož využití metody CRISPR není podmíněno přítomností jednotlivých komponent v genomu cílových organismů. Na rozdíl od RNAi není metoda CRISPR omezena pouze na funkční analýzu genů, ale může být použita také ke genomovému screeningu, regulaci genové exprese nebo k inzerci exogenních DNA sekvencí při genovém knockinu a značení proteinů na C-konci. Metoda CRISPR slibuje zrychlení průběhu studií zaměřených na funkční genomiku u protozoálních patogenů, čímž se zvyšuje šance na vývoj optimálních chemoterapeutik a vakcín k překonání současné úmrtnosti a míry morbidity, která je u chorob působených parazitickými protisty stále velmi vysoká.

## 7 Přehled literatury

- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., and Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* *513*, 569–573.
- Attasart, P., Boonma, S., Sunintaboon, P., Tanwilai, D., Pothikasikorn, J., and Noonpakdee, W.T. (2016). Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation *in vitro* by double-stranded RNA nanoparticle against malaria topoisomerase II. *Exp. Parasitol.* *164*, 84–90.
- Bakshi, R.P., and Shapiro, T.A. (2004). RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. *Mol. Biochem. Parasitol.* *136*, 249–255.
- Bannai, H., Sakurai, T., Inoue, N., Sugimoto, C., and Igarashi, I. (2003). Cloning and expression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *10*, 926–933.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* *315*, 1709–1712.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* *116*, 281–297.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L., and Gull, K. (2000). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 18)*, 3321–3328.
- Batista, M., Kugeratski, F.G., de Paula Lima, C.V., Probst, C.M., Kessler, R.L., de Godoy, L.M., Krieger, M.A., and Marchini, F.K. (2017). The MAP kinase MAPK1 is essential to *Trypanosoma brucei* proliferation and regulates proteins involved in mRNA metabolism. *J. Proteomics* *154*, 118–127.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Mair, G.R., Janse, C.J., Vlachou, D., Waters, A.P., Cowman, A.F., Crabb, B.S., and de Koning-Ward, T.F. (2009). Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* *37*, 3788–3798.
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., and Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R. Soc. Open Sci.* *4*.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Struct. Lond. Engl.* *1993 9*, 1225–1236.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 2551–2561.
- Brettmann, E.A., Shaik, J.S., Zangger, H., Lye, L.-F., Kuhlmann, F.M., Akopyants, N.S., Oswald, D.M., Owens, K.L., Hickerson, S.M., Ronet, C., Fasel, N. and Beverley, S.M. (2016). Tilting the balance between RNA interference and replication eradicates *Leishmania* RNA virus 1 and mitigates the inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 11998–12005.

- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., Portman, N., Shaw, M.K., Ginger, M.L., Gaskell, S.J., McKean, P.G. and Gull, K. (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* *440*, 224–227.
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* *321*, 960–964.
- Bryant, J.M., Regnault, C., Scheidig-Benatar, C., Baumgarten, S., Guizetti, J., and Scherf, A. (2017). CRISPR/Cas9 genome editing reveals that the intron is not essential for *var2csa* gene activation or silencing in *Plasmodium falciparum*. *mBio* *8*, e00729-17.
- Bunnik, E.M., Batugedara, G., Saraf, A., Prudhomme, J., Florens, L., and Le Roch, K.G. (2016). The mRNA-bound proteome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol.* *17*, 147.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* *50*, 81–99.
- Cerutti, L., Mian, N., and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 481–482.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* *47*, 497–510.
- Chiurillo, M.A., Lander, N., Bertolini, M.S., Storey, M., Vercesi, A.E., and Docampo, R. (2017). Different roles of mitochondrial calcium uniporter complex subunits in growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *mBio* *8*, e00574-17.
- Chylinski, K., Le Rhun, A., and Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol.* *10*, 726–737.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* *399*, 166–169.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* *339*, 819–823.
- Coustou, V., Guegan, F., Plazolles, N., and Baltz, T. (2010). Complete in vitro life cycle of *Trypanosoma congolense*: development of genetic tools. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *4*, e618.
- Coustou, V., Plazolles, N., Guegan, F., and Baltz, T. (2012). Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. *Cell. Microbiol.* *14*, 431–445.
- Crawford, E.D., Quan, J., Horst, J.A., Ebert, D., Wu, W., and DeRisi, J.L. (2017). Plasmid-free CRISPR/Cas9 genome editing in *Plasmodium falciparum* confirms mutations conferring resistance to the dihydroisoquinolone clinical candidate SJ733. *PLoS ONE* *12*.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* *101*, 543–553.

- DaRocha, W.D., Otsu, K., Teixeira, S.M.R., and Donelson, J.E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *133*, 175–186.
- Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Kumar, A., Hossain, M.J., Bhatnagar, R.K., Chauhan, V.S., and Malhotra, P. (2005). A role of falcipain-2, principal cysteine proteases of *Plasmodium falciparum* in merozoite egression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *336*, 1062–1068.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* *471*, 602–607.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* *7*, 1522–1530.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S., and Ullu, E. (2003). An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA N. Y. N* *9*, 802–808.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096.
- Durand-Dubief, M., and Bastin, P. (2003). TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol.* *1*, 2.
- Durand-Dubief, M., Absalon, S., Menzer, L., Ngwabyt, S., Ersfeld, K., and Bastin, P. (2007). The Argonaute protein TbAGO1 contributes to large and mini-chromosome segregation and is required for control of RIME retroposons and RHS pseudogene-associated transcripts. *Mol. Biochem. Parasitol.* *156*, 144–153.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188–200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* *20*, 6877–6888.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Chedin, E. and Peacock, C. (2005a). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* *309*, 404–409.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C. and Branche, C. (2005b). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* *309*, 409–415.
- van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B.A., and Schouls, L.M. (2000). Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* *182*, 2393–2401.

- Franzén, O., Arner, E., Ferella, M., Nilsson, D., Respuela, P., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Åslund, L., Andersson, B., and Daub, C.O. (2011). The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1283.
- Fridberg, A., Olson, C.L., Nakayasu, E.S., Tyler, K.M., Almeida, I.C., and Engman, D.M. (2008). Sphingolipid synthesis is necessary for kinetoplast segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 121, 522–535.
- Garcia Silva, M.R., Tosar, J.P., Frugier, M., Pantano, S., Bonilla, B., Esteban, L., Serra, E., Rovira, C., Robello, C., and Cayota, A. (2010). Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene* 466, 26–35.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2579-2586.
- Ghorbal, M., Gorman, M., Macpherson, C.R., Martins, R.M., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.-J. (2014). Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Biotechnol.* 32, 819–821.
- Gissot, M., Briquet, S., Refour, P., Boschet, C., and Vaquero, C. (2005). *PfMyb1*, a *Plasmodium falciparum* transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *J. Mol. Biol.* 346, 29–42.
- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., and Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* 1, e60.
- Hammarton, T.C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., and Mottram, J.C. (2003). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J. Biol. Chem.* 278, 22877–22886.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.
- Heler, R., Samai, P., Modell, J.W., Weiner, C., Goldberg, G.W., Bikard, D., and Marraffini, L.A. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature* 519, 199–202.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167–170.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini L.A., Bao, G. and Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262–1278.
- Inoue, N., Otsu, K., Ferraro, D.M., and Donelson, J.E. (2002). Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 309–313.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433.

- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gaastra, W., and Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* *43*, 1565–1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816–821.
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, S., Nogales, E. and Doudna, J.A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* *343*, 1247997.
- Jones, N.G., Thomas, E.B., Brown, E., Dickens, N.J., Hammarton, T.C., and Mottram, J.C. (2014). Regulators of *Trypanosoma brucei* cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen. *PLOS Pathog.* *10*, e1003886.
- Karvelis, T., Gasiunas, G., Miksys, A., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2013). crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol.* *10*, 841–851.
- Kim, K., Lee, Y.S., and Carthew, R.W. (2007). Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* *13*, 22–29.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
- Kirkman, L.A., Lawrence, E.A., and Deitch, K.W. (2014). Malaria parasites utilize both homologous recombination and alternative end joining pathways to maintain genome integrity. *Nucleic Acids Res.* *42*, 370–379.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* *529*, 490–495.
- Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., and Holder, A.A. (2017). Generating conditional gene knockouts in *Plasmodium* – a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* *7*.
- Koonin, E.V., and Krupovic, M. (2015). Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 184–192.
- Koonin, E.V., and Makarova, K.S. (2013). CRISPR-Cas. *RNA Biol.* *10*, 679–686.
- LaCount, D.J., Barrett, B., and Donelson, J.E. (2002). *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *277*, 17580–17588.
- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., and Leung, S.W.S. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e252.
- LaMonte, G., Lim, M.Y.-X., Wree, M., Reimer, C., Nachon, M., Corey, V., Gedeck, P., Plouffe, D., Du, A., Figueroa, N., Yeung, B., Bifani, P. and Winzeler, P.A. (2016). Mutations in the *Plasmodium falciparum* cyclic amine resistance locus (PfCARL) confer multidrug resistance. *mBio* *7*, e00696-16.
- Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S., and Docampo, R. (2015). CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *mBio* *6*, e01012-15.

- Lander, N., Chiurillo, M.A., and Docampo, R. (2016a). Genome editing by CRISPR/Cas9: a game change in the genetic manipulation of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* *63*, 679–690.
- Lander, N., Chiurillo, M.A., Storey, M., Vercesi, A.E., and Docampo, R. (2016b). CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of *Trypanosoma cruzi* genes reveals the acidocalcisome localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* *291*, 25505–25515.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim and S., Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- de Lima Stein, M.L., Icimoto, M.Y., de Castro Levatti, E.V., Oliveira, V., Straus, A.H., and Schenkman, S. (2017). Characterization and role of the 3-methylglutaconyl coenzyme A hydratase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *214*, 36–46.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437–1441.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the drosophila RNAi pathway. *Science* *301*, 1921–1925.
- Long, S., Jirků, M., Mach, J., Ginger, M.L., Sutak, R., Richardson, D., Tachezy, J., and Lukes, J. (2008). Ancestral roles of eukaryotic frataxin: mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* *69*, 94–109.
- Lu, J., Tong, Y., Pan, J., Yang, Y., Liu, Q., Tan, X., Zhao, S., Qin, L., and Chen, X. (2016). A redesigned CRISPR/Cas9 system for marker-free genome editing in *Plasmodium falciparum*. *Parasit. Vectors* *9*.
- Ludewig, M.H., Boshoff, A., Horn, D., and Blatch, G.L. (2015). *Trypanosoma brucei* J protein 2 is a stress inducible and essential Hsp40. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *60*, 93–98.
- Lye, L.-F., Owens, K., Shi, H., Murta, S.M.F., Vieira, A.C., Turco, S.J., Tschudi, C., Ullu, E., and Beverley, S.M. (2010). Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLOS Pathog.* *6*, e1001161.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195–198.
- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* *1*, 7.
- Malhotra, P., Dasaradhi, P.V.N., Kumar, A., Mohammed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R.K., and Chauhan, V.S. (2002). Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* *45*, 1245–1254.

- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., and Nellen, W. (2002). RNAi in *Dictyostelium*: The role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell* *13*, 445–453.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* *110*, 563–574.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* *123*, 607–620.
- Mbang-Benet, D.-E., Sterkers, Y., Crobu, L., Sarrazin, A., Bastien, P., and Pagès, M. (2015). RNA interference screen reveals a high proportion of mitochondrial proteins essential for correct cell cycle progress in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* *16*, 297.
- McRobert, L., and McConkey, G.A. (2002). RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *119*, 273–278.
- Mohammed, A., Dasaradhi, P.V.N., Bhatnagar, R.K., Chauhan, V.S., and Malhotra, P. (2003). *In vivo* gene silencing in *Plasmodium berghei* – a mouse malaria model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *309*, 506–511.
- Mojica, F.J., Ferrer, C., Juez, G., and Rodríguez-Valera, F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* *17*, 85–93.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* *60*, 174–182.
- Montalvetti, A., Fernandez, A., Sanders, J.M., Ghosh, S., Van Brussel, E., Oldfield, E., and Docampo, R. (2003). Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. *In vitro* RNA interference and *in vivo* inhibition studies. *J. Biol. Chem.* *278*, 17075–17083.
- Morris, J.C., Wang, Z., Drew, M.E., Paul, K.S., and Englund, P.T. (2001). Inhibition of bloodstream form *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using the pZJM dual T7 vector. *Mol. Biochem. Parasitol.* *117*, 111–113.
- Mueller, A.-K., Hammerschmidt-Kamper, C., and Kaiser, A. (2014). RNAi in *Plasmodium*. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 278–283.
- Ng, C.L., Siciliano, G., Lee, M.C.S., de Almeida, M.J., Corey, V.C., Bopp, S.E., Bertuccini, L., Wittlin, S., Kasdin, R.G., Le Bihan, A., Clozel, M., Winzeler, E.A., Alano, P. and Fidock, E.A. (2016). CRISPR-Cas9-modified *pfmdr1* protects *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and gametocytes against a class of piperazine-containing compounds but potentiates artemisinin-based combination therapy partner drugs. *Mol. Microbiol.* *101*, 381–393.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14687–14692.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., and Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* *156*, 935–949.
- Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP Requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* *107*, 309–321.



- Patrick, K.L., Luz, P.M., Ruan, J., Shi, H., Ullu, E., and Tschudi, C. (2008). Genomic rearrangements and transcriptional analysis of the spliced leader-associated retrotransposon in RNA interference-deficient *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* *67*, 435–447.
- Patrick, K.L., Shi, H., Kolev, N.G., Ersfeld, K., Tschudi, C., and Ullu, E. (2009). Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 17933–17938.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F. and Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* *39*, 839–847.
- Peng, D., Kurup, S.P., Yao, P.Y., Minning, T.A., and Tarleton, R.L. (2014). CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio* *6*.
- Pillay, D., Boulangé, A.F.V., Coustou, V., Baltz, T., and Coetzer, T.H.T. (2013). Recombinant expression and biochemical characterisation of two alanyl aminopeptidases of *Trypanosoma congolense*. *Exp. Parasitol.* *135*, 675–684.
- Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 653–663.
- Raabe, C.A., Sanchez, C.P., Randau, G., Robeck, T., Skryabin, B.V., Chinni, S.V., Kube, M., Reinhardt, R., Ng, G.H., Manickam, R., Kuryshev, V.Y., Lanzer, M., Brosius, J., Tang, T.H. and Rozhdestvensky, T.S. (2010). A global view of the nonprotein-coding transcriptome in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* *38*, 608–617.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* *123*, 621–629.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., and Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie* *117*, 119–128.
- Robinson, K.A., and Beverley, S.M. (2003). Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *128*, 217–228.
- Rouillon, C., Zhou, M., Zhang, J., Politis, A., Beilsten-Edmands, V., Cannone, G., Graham, S., Robinson, C.V., Spagnolo, L., and White, M.F. (2013). Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. *Mol. Cell* *52*, 124–134.
- S. Makarova, K., Haft, D., Barrangou, R., J. J. Brouns, S., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., J. M. Mojica, F., I. Wolf, Y., Yakunin, A.F., van der Oost, J. and Koonin, E.V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 467–477.
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *39*, 9275–9282.

- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537–548.
- Schwentke, A., Krepstakies, M., Mueller, A.-K., Hammerschmidt-Kamper, C., Motaal, B.A., Bernhard, T., Hauber, J., and Kaiser, A. (2012). *In vitro* and *in vivo* silencing of plasmodial *dhs* and *elf-5a* genes in a putative, non-canonical RNAi-related pathway. *BMC Microbiol.* 12, 107.
- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C.-Y., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon P.M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. and Van der Oost, J., (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7835–7840.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., and Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA* 6, 1069–1076.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, C., and Ullu, E. (2004a). Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol. Cell. Biol.* 24, 420–427.
- Shi, H., Chamond, N., Tschudi, C., and Ullu, E. (2004b). Selection and characterization of RNA interference-deficient trypanosomes impaired in target mRNA degradation. *Eukaryot. Cell* 3, 1445–1453.
- Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2006). An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 12, 2063–2072.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H.A., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465–476.
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.* 30, 1335–1342.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84–88.
- Smíd, O., Horáková, E., Vilímová, V., Hrdý, I., Cammack, R., Horváth, A., Lukeš, J., and Tachezy, J. (2006). Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 281, 28679–28686.
- Sollesis, L., Ghorbal, M., MacPherson, C.R., Martins, R.M., Kuk, N., Crobu, L., Bastien, P., Scherf, A., Lopez-Rubio, J.-J., and Sterkers, Y. (2015). First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell. Microbiol.* 17, 1405–1412.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026–1032.
- Spilman, M., Cocozaki, A., Hale, C., Shao, Y., Ramia, N., Terns, R., Terns, M., Li, H., and Stagg, S. (2013). Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. *Mol. Cell* 52, 146–152.

- Sriwilajjaroen, N., Boonma, S., Attasart, P., Pothikasikorn, J., Panyim, S., and Noonpakdee, W. (2009). Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation in vitro by double-stranded RNA directed against malaria histone deacetylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 144–147.
- Staals, R.H.J., Agari, Y., Maki-Yonekura, S., Zhu, Y., Taylor, D.W., van Duijn, E., Barendregt, A., Vlot, M., Koehorst, J.J., Sakamoto, K., Masuda, A., Dohmae, N., Schaap, P.J., Doudna, J.A., Heck, A.J.R., Yonekura, K., van der Oost, J. and Shinkai, A. (2013). Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Mol. Cell* 52, 135–145.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377–1380.
- Tuteja, R., and Pradhan, A. (2010). PflIF4E and PflIF4A colocalize and their double-stranded RNA inhibits *Plasmodium falciparum* proliferation. *Commun. Integr. Biol.* 3, 611–613.
- Ullu, E., Tschudi, C., and Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* 6, 509–519.
- Wagner, J.C., Platt, R.J., Goldfless, S.J., Zhang, F., and Nilis, J.C. (2014). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Methods* 11, 915–918.
- Wang, Z., and Englund, P.T. (2001). RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 4674–4683.
- Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., and Englund, P.T. (2000). Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* 275, 40174–40179.
- Wei, Y., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2015). Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. *Genes Dev.* 29, 356–361.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., and Gull, K. (2003). Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 360–375.
- Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S.M., Ma, W., and Doudna, J.A. (2009). Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 904–912.
- Witola, W.H., Inoue, N., Ohashi, K., and Onuma, M. (2004). RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. *Exp. Parasitol.* 107, 47–57.
- Xue, X., Zhang, Q., Huang, Y., Feng, L., and Pan, W. (2008). No miRNA were found in *Plasmodium* and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection. *Malar. J.* 7, 47.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.
- Zhang, W.-W., and Matlashewski, G. (2000). Analysis of antisense and double stranded RNA downregulation of A2 protein expression in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107, 315–319.

Zhang, W.-W., and Matlashewski, G. (2015). CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *mBio* 6.

Zhang, C., Xiao, B., Jiang, Y., Zhao, Y., Li, Z., Gao, H., Ling, Y., Wei, J., Li, S., Lu, M., Su, X.Z., Cui, H. and Yuan, J. (2014). Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *mBio* 5.

Zhang, C., Gao, H., Yang, Z., Jiang, Y., Li, Z., Wang, X., Xiao, B., Su, X., Cui, H., and Yuan, J. (2017a). CRISPR/Cas9 mediated sequential editing of genes critical for ookinete motility in *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 212, 1–8.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

Zhang, W.-W., Lypaczewski, P., and Matlashewski, G. (2017b). 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* 2, e00340-16.

**Web 1:** Grissa, I., Drevet, Ch. and Couvin, D. (2017). CRISPRs web server home page. [online] CRISPRs web server. Available at: <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/> [Accessed 13 Aug. 2017].