

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie



Diplomová práce

Umlčování genů u *Giardia intestinalis*

Jan Pyrih

Vedoucí diplomové práce:

Praha, 2009

Prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem zadanou Diplomovou prací vypracoval sám a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje.

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu práce Honzovi Tachezemu za jeho trpělivé vedení, Ondrovi Šmídovi za naučení mnoha experimentálních postupů a členům laboratoře za příjemnou pracovní atmosféru. Chtěl bych poděkovat i přátelům, rodině a mé přítelkyni za podporu.

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled	8
2.1	Studium parazitických protistů	8
2.2	Úplné a částečné umlčování genů	8
2.2.1	Inducibilní regulace exprese	9
2.3	Úplné umlčování genů	9
2.4	Částečné umlčování genu	11
2.4.1	RNA interference (RNAi).....	11
2.4.2	Regulace genové exprese pomocí antisense oligonukleotidů.....	13
2.4.2.1	Morpholinové oligonukleotidy	15
2.4.3	Tlumení exprese pomocí ribozymů	17
2.4.4	Antisense RNA techniky	18
2.5	Techniky umlčování genů u <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	19
2.5.1	Transfekční systémy	19
2.5.2	Inducibilní systémy.....	20
2.5.3	Úplná inaktivace genů	20
2.5.4	RNA interference.....	21
2.5.4.1	RNA interference u <i>Trypanosoma congolense</i>	22
2.5.5	Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul.....	23
2.6	Techniky umlčování genů u <i>Leishmania spp.</i> a <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
2.6.1	Transfekce a inducibilní systémy	23
2.6.2	Úplná inaktivace genů	24
2.6.3	Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul.....	24
2.6.4	RNA interference.....	24
2.6.5	Inhibice genů pomocí antisense DNA oligonukleotidů.....	25
2.7	Techniky umlčování genů u <i>Plasmodium falciparum</i>	25
2.7.1	Transfekce a inducibilní systémy	26
2.7.2	Úplná inhibice genů.....	26
2.7.3	Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul.....	28
2.7.4	RNA interference.....	29
2.7.5	Inhibice pomocí S-DNA antisense oligonukleotidů	30
2.7.6	Inhibice pomocí ribozymů.....	30
2.8	Techniky umlčování genů u <i>Toxoplasma gondii</i>	30
2.8.1	Transfekce a inducibilní systémy	31
2.8.2	Úplné umlčení genů.....	31
2.8.3	RNA interference.....	31
2.8.4	Ribozymy a inhibice genů pomocí produkce antisense RNA molekul	32
2.9	Techniky umlčování genů u <i>Giardia intestinalis</i>	33
2.9.1	Transfekční techniky	33
2.9.2	Inducibilní systémy.....	34
2.9.3	Úplná inhibice genů.....	34
2.9.4	RNA interference.....	35
2.9.5	Inhibice genů pomocí ribozymů a produkce antisense RNA molekul	40
2.10	Techniky umlčování genů u <i>Entamoeba histolytica</i>	44
2.10.1	Transfekční a inducibilní systémy.....	44
2.10.2	Úplná inhibice genů	44

2.10.3	Antisense RNA techniky	44
2.10.4	Inhibice pomocí PNA antisense oligonukleotidů	45
2.10.5	RNA interference	46
2.10.6	Unikátní inhibice transkripce	46
2.11	Techniky umlčování genů u <i>Trichomonas vaginalis</i>	48
2.11.1	Transfekce a inducibilní systémy	48
2.11.2	Úplná inhibice genů	48
2.11.3	Antisense RNA a RNA interference	49
3	Cíle práce	52
4	Materiál a metody	53
4.1	Použité organismy	53
4.1.1	<i>Giardia intestinalis</i>	53
4.1.2	<i>Escherichia coli</i>	53
4.2	Použitá média.....	53
4.3	Pufry pro proteinovou elektroforézu (SDS-PAGE) a imunobloting	54
4.4	Použité plazmidy	55
4.4.1	Expresní plazmid pINDG	55
4.4.2	Expresní plazmid pTG3039.....	57
4.5	Amplifikace genů.....	58
4.5.1	Použité primery.....	58
4.5.2	PCR.....	62
4.5.3	“Touchdown“ program pro komplementární spárování nukleotidů pro tvorbu vektoru pTG3039nula.....	63
4.5.4	Schéma mutační reakce pro tvorbu ribozymů	63
4.6	Izolace a klonování DNA fragmentů	65
4.7	Analýza RNA	66
4.7.1	Izolace RNA z buněk <i>G. intestinalis</i>	66
4.7.2	Příprava cDNA <i>G. intestinalis</i>	67
4.7.3	Real Time PCR (RT-PCR)	67
4.8	Analýza proteinů	68
4.8.1	Podmínky polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE).....	68
4.8.2	Imunobloting (Western blot)	69
4.8.3	Detekce proteinů na nitrocelulózkové membráně	70
4.9	Pokusy s morpholinovými oligonukleotidy (MO)	70
4.9.1	Přehled použitých morpholinových a DNA oligonukleotidů	70
4.9.2	Pokusy s doručením morpholinových oligonukleotidů pomocí reagentie Endo-porter..	71
4.9.3	Elektroporace morpholinových oligonukleotidů	71
4.9.4	Fluorescenční mikroskopie.....	72
4.10	Transfekce buněk <i>G. intestinalis</i>	72
4.10.1	Klonování transfekovaných giardií	73
4.11	Imunolokalizace HA-značeného GiIscU v buňkách <i>G. intestinalis</i>	73
5	Výsledky	74
5.1	Testování plazmidů pINDG a pTG3039.....	74
5.1.1	Testování plazmidu pINDG pro umlčování genu kódujícího GiIscU	74

5.2	Testování plazmidu pTG3039 pro umlčování genů kódujících GiIscU a GiGrx5	75
5.2.1	Konstrukce plazmidů pro produkci konkrétních antisense RNA molekul	75
5.2.2	Expres antisense RNA molekul v liniích s pTG3039 plazmidy a vliv na expresi <i>giiscu</i> a <i>gigrx5</i>	78
5.3	Příprava a testování plazmidu pINDGtub s inducibilním alfa-tubulinovým promotorem	82
5.3.1	Konstrukce plazmidu pINDGtub	82
5.3.2	Ověření inducibilní exprese genů z plazmidu pINDGtub	83
5.3.3	Testování vlivu délky indukce antisense RNA molekul z plazmidu pINDGtub na expresi GiIscU v buňkách giardií	84
5.3.4	Analýza exprese GiIscU u klonálních linií giardií exprimujících antisense RNA z plazmidu pINDGtub	86
5.4	Indukce tvorby dsRNA v buňkách giardií	88
5.5	Testování morpholinových oligonukleotidů pro inhibici genů u <i>G. intestinalis</i>	91
5.5.1	Doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pomocí Endo-porteru	91
5.5.2	Doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pomocí elektroporace	92
5.5.3	Pokus o inhibici genů kódujících GiIscS a GiGrx5 pomocí elektroporace morpholinových oligonukleotidů	94
6	Diskuze	98
6.1	Inhibice genů pomocí antisense RNA molekul u <i>G. intestinalis</i>	98
6.1.1	Expres antisense RNA molekul z plazmidu pTG3039	98
6.1.2	Expres antisense RNA molekul pro <i>giiscu</i> z plazmidu pINDG	99
6.1.3	Zkonstruování plazmidu pINDGtub se silným inducibilním promotorem pro inhibici genů pomocí produkce antisense RNA	99
6.1.4	Možné důvody nezdařené inhibice genů pro GiIscU a GiGrx5 pomocí exprese antisense RNA molekul	100
6.2	<i>Giardia intestinalis</i> a inhibice pomocí ribozymů	102
6.3	<i>Giardia intestinalis</i> a RNA interference	102
6.4	Užití morpholinových oligonukleotidů	103
7	Závěr	105
8	Použitá literatura	107

1 Úvod

Giardia intestinalis je anaerobní bičíkovec, který je původcem průjmového onemocnění člověka. Giardie je považována za jednoho z raně se větvících zástupců eukaryotické říše, a proto je z pohledu evoluční biologie velmi důležitým modelovým organismem. Genom giardie již byl osekvenován a na základě dat byla předpovězena funkce některých proteinů. Jedna z možností, jak potvrdit tyto predikce, je užití technik reverzní genetiky (snížení exprese některého genu a pozorování změny fenotypu).

“Umlčení“ genů bylo u giardie dosaženo pomocí z plazmidu exprimovaných antisense RNA molekul, které jsou komplementární k inhibovaným mRNA vláknům. Alternativně se inhibice genů dociluje expresí antisense RNA molekul taktéž komplementárních k inhibovaným mRNA vláknům, které mají ve své sekvenci navíc obsažen ribozym s endonukleázovou aktivitou. Tyto RNA molekuly s ribozymem mají zvláštní okrajové oblasti, které umožňují jejich amplifikaci v cytoplasmě buněk pomocí dsRNA viru giardie. Metoda homologní rekombinace či snížení exprese pomocí RNA interference se u giardie nevyužívá. Zatím není znám mechanismus, kterým u buněk giardie dochází k inhibici pomocí exprese antisense RNA. Ve všech případech došlo k úbytku inhibované mRNA. Nebyl ale pozorován vznik štěpů, který by nasvědčoval tomu, že je inhibovaná mRNA v buňce nějakým způsobem degradována.

U *G. intestinalis* byly nalezeny mitosomy, což jsou organely, které se buď vyvinuly z mitochondrie, nebo které s ní měly společného předka. Objev mitosomů u *G. intestinalis* zásadně podpořil názor, že v sobě předek všech eukaryotních organismů někdy obsahoval mitochondrii (nebo jejího předka). Funkce mitosomů u giardie je dodnes neznámá, pravděpodobně se ale podílejí na syntéze [Fe-S] center. Snížení exprese některého z genů, který kóduje mitosomální protein, by mohlo pomoci potvrdit či vyvrátit tuto hypotézu.

Hlavním cílem diplomové práce bylo vyzkoušet techniky reverzní genetiky u *G. intestinalis*. K “umlčení“ exprese byly vybrány právě geny kódující proteiny v mitosomech giardií. Práce literárně shrnuje techniky používané pro umlčování genů u *G. intestinalis* i u dalších parazitických protistů.

2 Literární přehled

Diplomová práce tematicky navazuje na mou bakalářskou práci, literární přehled byl zčásti převzat a rozšířen.

2.1 Studium parazitických protistů

Parazitičtí protisté jsou jednobuněčné eukaryotní organismy žijící na úkor svých hostitelů. Někteří patří mezi významné lidské patogeny a řada z nich slouží jako modelové organismy. Setkáváme se u nich s velkým množstvím jedinečných znaků. Např. u *Trypanosoma brucei* se vyskytují unikátní buněčné struktury (kinetoplast, glykosomy), většina jejich genů podstupuje trans-splicing a v kinetoplastu je pak u některých genů mRNA upravována v procesu RNA editingu.

V rámci studia této skupiny organismů již bylo započato více než 30 genomových projektů (Coppel and Black, 2005). Znalost sekvence DNA těchto organismů velmi usnadňuje zjišťování funkce jejich genů. V tomto ohledu je však výzkum teprve v počátcích. Kupříkladu u prvoka *Plasmodium falciparum* byla popsána funkce jen asi u 100 genů. Sekvence genomu jich ale predikuje kolem 5200, přičemž 60% z nich nemá nalezeny homology u jiných organismů (Coppel and Black, 2005).

Jednou ze strategií, jak odhalit funkci genu, je jeho umlčování (inaktivace tvorby jeho produktů) a pozorování změny fenotypu.

2.2 Úplné a částečné umlčování genů

Úplné umlčování genu (úplná inaktivace genu, “knockout“) je eliminace či porušení genu přímo v jaderné DNA, které úplně zabrání tvorbě produktů tohoto genu (Muller, 1999). Částečné umlčování genu (částečná inaktivace genu, “knockdown“) je zásah proti odpovídající RNA, tvorbě produktů genu se tedy zabrání pouze částečně (Scherer and Rossi, 2003). Částečná účinnost těchto technik souvisí s pravděpodobností interakce umlčované RNA molekuly s molekulami, které slouží k inhibici.

Úplná inaktivace genu nemůže být využita při studiu esenciálních genů. Pokud je cílený gen pro organismus nepostradatelný, není možné vyselektovat kulturu, která by jej

neměla. Úplná inhibice také není vhodná pro jiné než haploidní organismy, neboť delece více kopií genu v genomu je velmi pracná.

Při částečném umlčování genu je nepostradatelnost genu pro organismus menší problémem. V případě esenciálních genů může být ale i částečné snížení jejich exprese pro buňku letální. Proto se používají různé systémy, které inhibici genu indukují, popřípadě snižují její účinek.

2.2.1 Inducibilní regulace exprese

Důležitým nástrojem technik částečného umlčování genů je inducibilní regulace exprese. Reguluje se exprese antisense RNA molekul, ribozymů či tvorba dsRNA. Koncentrací chemických látek (induktorů) řídíme iniciaci transkripce.

U parazitických protistů se nejčastěji používá tetracyklinem řízený represor/operátorový systém. V tomto systému se využívá bakteriálních represorů, což jsou proteiny, které se vážou na specifické oblasti DNA nazývané "operátory". Tyto operátory se při konstrukci vektoru umístí do oblasti promotoru, aby navázaný represor bránil transkripci. Přidáním induktorů jsme schopni zabránit vazbě těchto represorů na DNA. Změnou koncentrace přidané látky, která inaktivuje tyto represory, jsme tedy schopni ovlivnit míru iniciace transkripce. Na podobném principu funguje i trans-aktivátorem řízená transkripce, která se využívá např. u *Toxoplasma gondii*. V tomto systému je exprese rovněž řízena tetracyklinem (Meissner *et al.*, 2007).

Indukce exprese lze také dosáhnout užitím stádiově specifických promotorů. Tento systém se používá např. u prvoka *Giardia intestinalis*, který začne při encystaci silně exprimovat geny s přidaným promotorem pro protein cwp1 [cyst wall protein 1] (Hehl *et al.*, 2000).

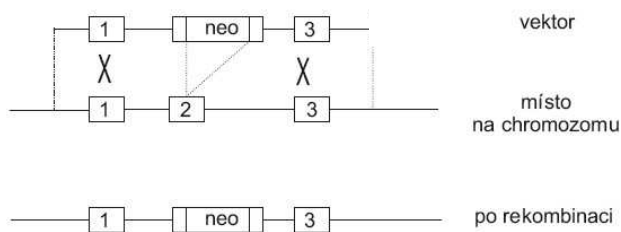
2.3 Úplné umlčování genů

Metody eliminace genu jsou založeny na přirozených buněčných dějích zvaných "homologní rekombinace" a "homologní integrace" (Carvalho and Menard, 2005). Exogenní DNA se za pomoci buněčných enzymů přímo včlení do DNA buňky. K tomuto zabudování dojde na specifickém místě v genomu, kde je genomová DNA homologní s exogenní. Za

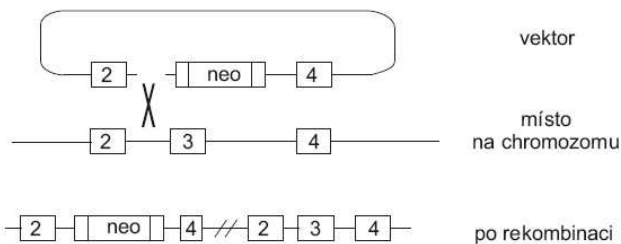
účelem eliminace genu se vnášená DNA navrhuje tak, aby odstranila nebo alespoň poškodila cílený gen.

Při homologní integraci dojde k “jednoduchému crossing overu“ [single crossover] a homologní úsek se do DNA pouze včlení bez eliminace původní DNA. Při homologní rekombinaci dojde ke “dvojitému crossing overu“ [double crossover] a reciproké výměně homologních úseků (obr. 1). Vnášená DNA obsahuje gen pro rezistenci k některému antibiotiku. Buňky jsou po transfekci selektovány pro eliminaci buněk, kde ke „crossing overu“ nedošlo.

A : Vektor výměnného typu



B : Vektor inserčního typu



Obr. 1

Schéma procesu porušení genu pomocí výměnných a inserčních vektorů.

- A) Vektor výměnného typu; část 2 na cílené DNA molekule je nahrazena selekčním genem pro neomycinovou rezistenci (neo) procesem homologní rekombinace. Výměnný vektor je linearizovaný.
- B) Vektor inserčního typu: vektor je linearizován uvnitř oblasti homologie, mezi částí DNA značenou čísly 2 a 3. V části, která na linearizované DNA molekule odpovídá úseku 3, je gen pro neomycinovou rezistenci.

Vysvětlivky: Specifické části DNA jsou značeny čísly 1-4, tenká čára znázorňuje DNA plazmidu či genomovou DNA . Převzato a upraveno (Muller, 1999).

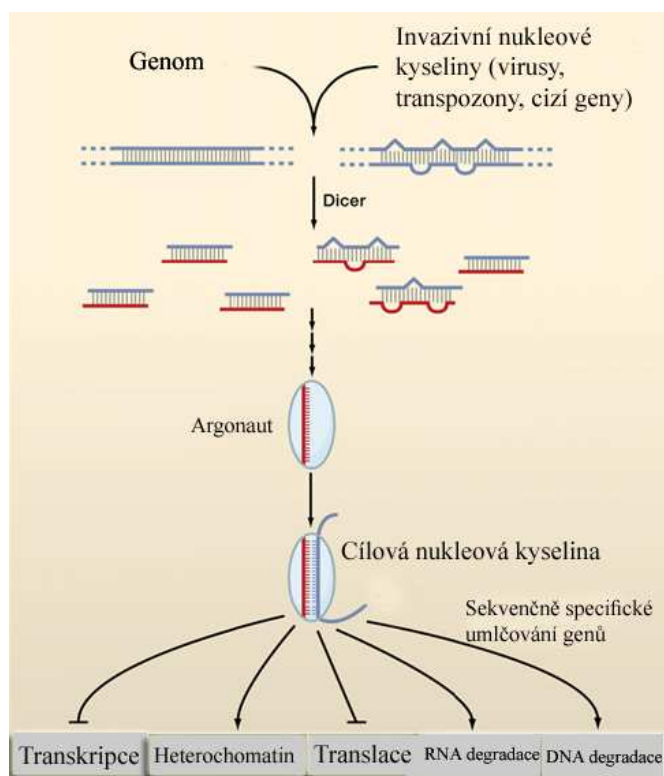
2.4 Částečné umlčování genu

K neúplnému umlčování genů se používají antisense RNA molekuly, dsRNA, ribozymy s antisense RNA rameny a antisense oligonukleotidy. Ty v buňce interagují s komplementární mRNA molekulou (Scherer and Rossi, 2003). To může mít za následek degradaci cílené RNA (na RNáze H závislé antisense oligonukleotidy, dsRNA, ribozymy), nebo pouze blokaci interakcí RNA s jinými molekulami (na RNáze H nezávislé antisense oligonukleotidy, antisense RNA molekuly). Efektory v degradačních drahách mohou být RNáza H, RISC komplex v případě RNA interference nebo samotné ribozymy. Blokační typ antisense molekul znemožňuje sestřih [splicing], transport z jádra nebo translaci (Scherer and Rossi, 2003).

2.4.1 RNA interference (RNAi)

RNA interference (RNAi) je mechanismus objevený v roce 1998 u hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Ústředním prvkem je dvouvláknová RNA [dsRNA, double strain RNA], která na základě Watson-Crickova párování slouží k rozpoznání cílené nukleové kyseliny. Jde o soubor buněčných drah, které mají různé funkce (obr. 2). Rozpoznaná nukleová kyselina je v případě RNA degradována, může ale být pouze tlumena její exprese. V případě DNA může být ovlivněna její kondenzovanost a tím i exprese genů ležících v daném úseku. Mezi RNA interferenční mechanismy patří i DNA eliminace (DNA degradační dráha), která probíhá u zástupců kmene *Ciliata* při syntéze makronukleu (Baulcombe, 2005).

RNAi se vyskytuje ve všech hlavních eukaryotických liniích (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). U jednotlivých skupin se však liší zastoupením jednotlivých komponent a jejich uplatněním (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Meister and Tuschl, 2004). Tato odlišnost, a dokonce i rozdíl v přítomnosti či nepřítomnosti RNAi, může nastat i u velmi příbuzných druhů jako je např. *T. brucei* a *Leishmania donovani* (Teixeira and daRocha, 2003).

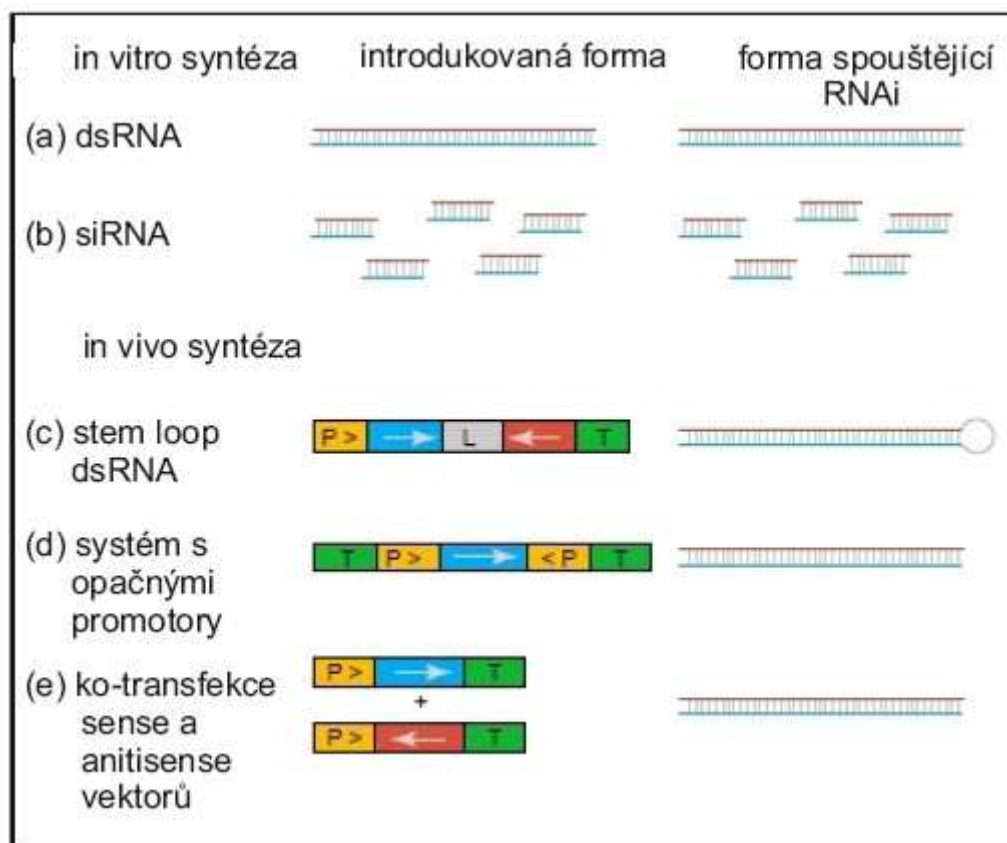


Obr. 2

Zjednodušené schéma shrnující známé RNA interferenční dráhy.

Dvouvláknová RNA (rozličného původu) je zpracována enzymem dicer na krátké (20-30 nt) dvouvláknové fragmenty. Jedno z těchto vláken přisedne na protein argonaut (ten je součástí RISC komplexu) a umožňuje rozpoznání cílové nukleové kyseliny skrze Watson-Crickova párování. Když je cíl rozpoznán, jeho exprese je modulována jedním z několika možných mechanismů (Carthew and Sontheimer, 2009).

Pro umlčování genů se využívá především interferenčních drah, které degradují mRNA. Tlumením transkripce prostřednictvím kondenzace DNA mohou být totiž ovlivněny i další geny v okolních lokusech na genomové DNA (Sugiyama *et al.*, 2005). Při umlčování genů se užívají dsRNA molekuly, které fungují jako prostředník ke štěpení cílové mRNA. Molekuly dsRNA se syntetizují *in vitro* a poté jsou vpraveny do buněk, nebo se tvoří v buňce transkripcí z vložených plazmidů (Scherer and Rossi, 2003) (obr. 3).



Obr. 3

Zdroje dsRNA pro umlčování genů prostřednictvím RNAi.

Molekuly dsRNA mohou v organismu vzniknout transkripcí vložených konstruktů, nebo mohou být vytvořeny *in vitro*, a teprve pak dopraveny do buňky.

Vysvětlivky: P, promotor (šipka ukazuje směr transkripce); T, terminátor; L, sekvence smyčky; modré a červené oblasti odpovídají sekvenci umlčovaného genu, odlišná barva znázorňuje sense a antisense orientaci. Převzato a upraveno (Cottrell and Doering, 2003).

2.4.2 Regulace genové exprese pomocí antisense oligonukleotidů

Antisense oligonukleotidy jsou krátké modifikované jedno-vláknové molekuly DNA. Jsou složeny z analogů jednotlivých nukleotidů. Obvykle mají délku jen 13-25 nukleotidů. Jsou komplementární k cílené RNA molekule a inaktivují ji degradačními nebo stericky blokuujícími mechanismy (Dias and Stein, 2002). Tyto antisense oligonukleotidy dělíme na nabitě (záporně) a na nenabitě. Nejčastěji používané oligonukleotidy jsou uvedeny na obr. 4.

Záporně nabitě syntetické oligonukleotidy jsou po navázání na komplementární vlákno RNA rozeznávány buněčným enzymem “RNázaH“. RNázaH je jaderný enzym nacházející se u většiny eukaryotních buněk, který slouží jako protivirová ochrana a štěpí RNA v duplexech RNA-DNA (Achenbach *et al.*, 2003). Po degradaci RNA se oligonukleotidy recyklují.

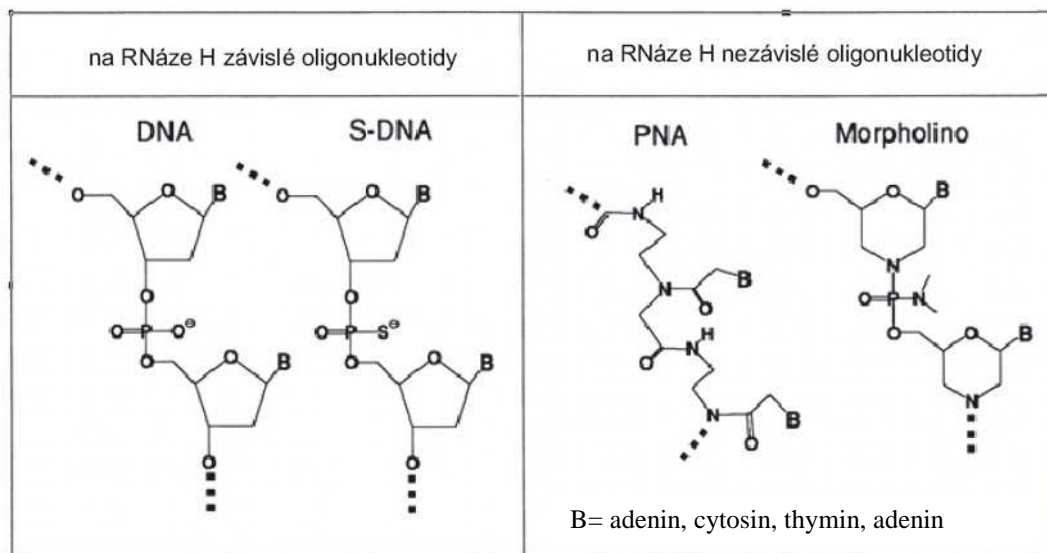
Mezi velmi často používané záporně nabitě oligonukleotidy patří S-DNA. V jejich struktuře tvoří síra (S) náhradu za jeden kyslík u fosfátů. S-DNA oligonukleotidy byly použity např. pro inhibici růstu *Plasmodium falciparum* (Noonpakdee *et al.*, 2003).

Užití nemodifikovaných DNA oligonukleotidů je jedna z alternativ. Inhibice DNA oligonukleotidy byla použita např. u prvoka *Leishmania donovani* (Dasgupta *et al.*, 2002). Buňkou jsou ale DNA oligonukleotidy rychle degradovány a tato degradace může mít na buňku cytotoxické účinky (Dias and Stein, 2002).

Druhá skupina oligonukleotidů nemá záporný náboj a je na RNázeH nezávislá. Nenabitě oligomery jsou hůře rozpustné ve fyziologickém prostředí, ale jsou stabilnější vůči enzymatické degradaci (Karkare and Bhatnagar, 2006). Mechanismem jejich účinku je sterické blokování RNA.

Nejčastěji jsou používány PNA oligonukleotidy [PNA, peptide nucleic acids], morpholinové oligonukleotidy, LNA oligonukleotidy [LNA, locked nucleic acids] a 2'-O-metyl oligonukleotidy (Dias and Stein, 2002; Karkare and Bhatnagar, 2006; Summerton, 1999).

Buňka si syntetické antisense oligonukleotidy nedokáže sama vytvářet. Musíme je do buněk dopravit, a proto je jejich účinek pouze dočasný.



Obr. 4

Vybrané na RNázeH závislé a na RNázeH nezávislé oligonukleotidy.

Převzato a upraveno (Summerton, 1999).

2.4.2.1 Morpholinové oligonukleotidy

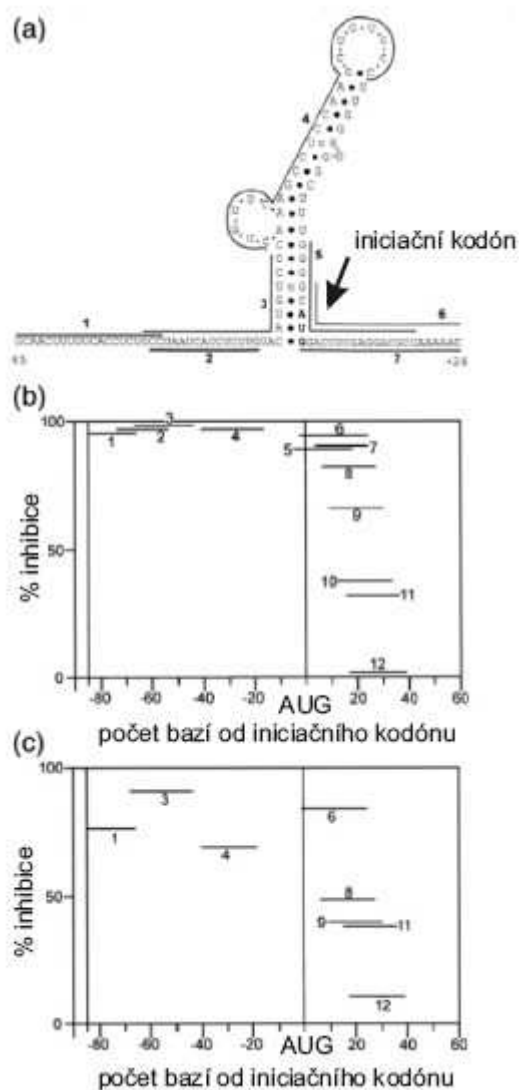
Morpholinové oligonukleotidy (MO) patří do skupiny stericky blokujících oligonukleotidů. Mají klasické báze (adenin, thymin, cytosin a guanin). Tyto báze se však namísto ribózy či deoxyribózy váží k morpholinovým kruhům a namísto fosfátů jsou propojeny fosfordiamidátovými skupinami. Díky takto upravené struktuře jsou MO za fyziologických podmínek bez náboje.

MO nezpůsobují degradaci cílené RNA. Místo toho se na ni pevně vážou a vytěsňují z této vazby ostatní molekuly. Na RNA molekuly se MO váží silnější vazbou než samotná RNA. To jim dává schopnost rozvolňovat případné sekundární struktury cílených RNA molekul (Summerton, 1999). Summerton (1999) demonstroval tuto schopnost na systému inhibice translace luciferázy v HeLa buňkách (obr. 5). Z tohoto pokusu je také patrné, že efektivita blokace MO je silně závislá na pozici navrženého oligonukleotidu vzhledem k místu iniciace translace.

MO se využívají při výzkumu procesování miRNA (Flynt *et al.*, 2007), mRNA “splicing” (Draper *et al.*, 2001) a především jako blokační činidlo translace.

MO již byly vpraveny do vajíčka ježovky, dánia, drápatky, kuřete i octomilky (Ecker and Larson, 2001). Jsou ale využitelné i při studiu buněčných kultur (Morcos, 2001; Summerton, 1999).

V případě zygot se MO do buněk dopravují pomocí mikroinjekce či elektroporace (Kos *et al.*, 2003; Nasevicius and Ekker, 2000). Pro dopravu MO do buněčných kultur se používá především elektroporace (Matter and Konig, 2005) nebo látka Endo-porter (Summerton, 2005). Tato látka vytvoří póry v endozomech a vypustí nespecificky endocytované MO do cytosolu buňky. Třetí alternativou je spárování MO s DNA oligonukleotidy (za účelem získání náboje). Tyto duplexy se poté doručují do buněk zabalené v kationických lipidech (Morcos, 2001).



Obr. 5

Blokace translace mRNA v závislosti na pozici MO. Molekula mRNA tvoří v oblasti iniciačního kodónu vlásenku, kterou jsou MO schopné rozvolnit.

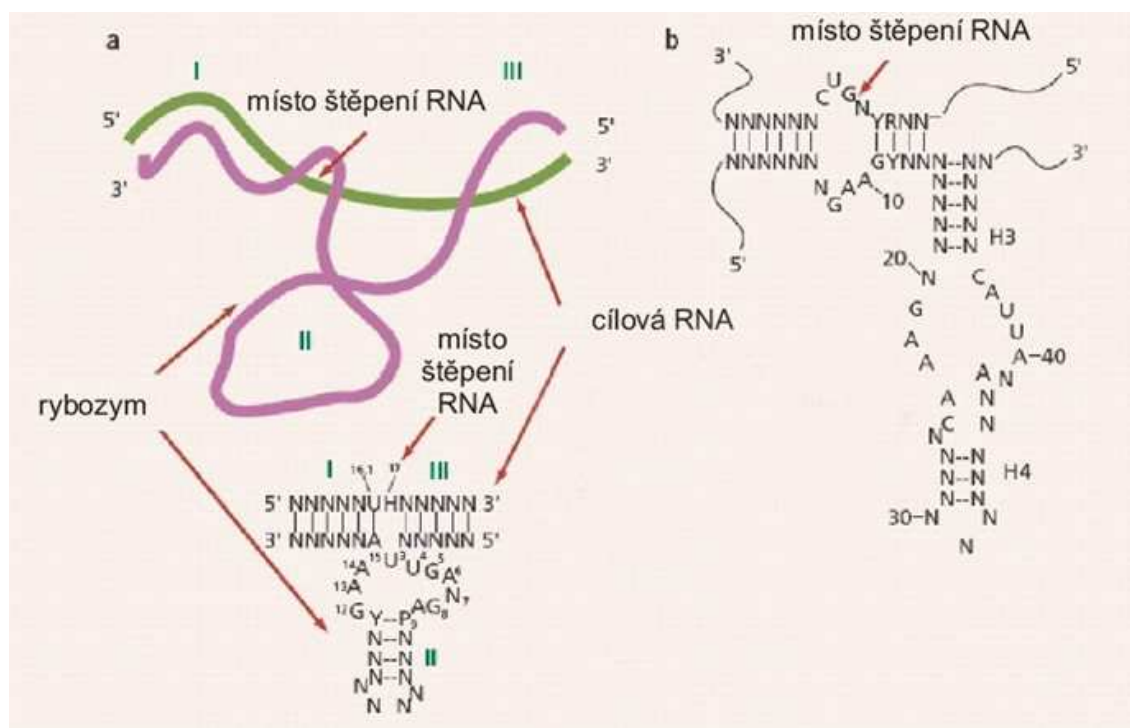
- mRNA se znázorněným zacílením prvních 7 oligonukleotidů (silné čáry).
- Inhibice translace pomocí MO v *in vitro* translačním systému. Na ose x je počet nukleotidových bází od iniciačního kodónu. Na ose y je naměřená inhibice exprese v %. Čísly 1-12 jsou znázorněny jednotlivé oligonukleotidy.
- Inhibice translace v kultuře HeLa buněk exprimujících mRNA pro luciferázu.

Převzato a upraveno (Summerton, 1999).

2.4.3 Tlumení exprese pomocí ribozymů

Ribozymy jsou RNA molekuly s enzymatickou aktivitou. Pro částečné umlčování genů se využívají ribozymy s RNA endonukleázovou aktivitou. Rozeznáváme 2 typy, oba jsou odvozeny od malých rostlinných RNA molekul (Scherer and Rossi, 2003). Prvním je “hammerhead“ ribozym a druhým “hairpin“ ribozym (Haseloff and Gerlach, 1992). Schematické nákresy obou těchto ribozymů včetně znázornění místa štěpení cílové mRNA jsou na obrázku 6. Tyto ribozymy mají katalytické jádro a 2 antisense ramena, která slouží k specifickému zacílení na vlákno inhibované mRNA (Scherer and Rossi, 2003).

U *Giardia intestinalis* byly při inhibici ADHE (alkoholdehydrogenáza E) použity 2 ribozymy lišící se délkou antisense komplementárních ramen k cílové mRNA. Výrazně vyšší inhibice bylo dosaženo užitím delších komplementárních úseků (Dan and Wang, 2000).



Obr. 6

Obecné schéma “hammerhead“ a “hairpin“ ribozymu.

a) “Hammerhead“ ribozym vážící vlákno cílené RNA.

b) “Hairpin“ ribozym vážící RNA.

Vysvětlivky: N je adenin, cytosin, guanin nebo uracil; H je adenin, cytosin nebo uracil; šipka znamená místo štěpení; Y, pirimidiny; R, puriny. Převzato a upraveno (Scherer and Rossi, 2003) .

2.4.4 Antisense RNA techniky

Tato technika umlčování genů spočívá v produkci dlouhé antisense RNA, která je komplementární k cílené mRNA. Obecně se tato metoda považuje za méně spolehlivou (Militello *et al.*, 2008).

Mechanismus snižování exprese pomocí antisense RNA není objasněn (Carvalho and Menard, 2005; Gardiner *et al.*, 2000). Většina prací dokumentuje úspěšnou inhibici snížením hladiny mRNA cílového genu. Není však známo, jak k tomuto úbytku cílové mRNA dochází. Nikdy nebyly nalezeny krátké dsRNA, které by indikovaly, že se inhibice cílové mRNA účastní RNA interference. Kupodivu nebyly nalezeny ani žádné jiné degradační RNA produkty.

Jde patrně o metodu nezávislou na RNA interferenci. Toto je dokumentováno faktem, že tato metoda nefunguje u *T. brucei* (Drozd et al., 2002), kde je běžně používána inhibice pomocí RNA interference, a funguje např. u *L. donovani* (Pandey *et al.*, 2004), kde se RNA interferenční dráha pravděpodobně nevyskytuje.

Antisense RNA molekuly se vyskytují nejen u geneticky upravených buněk. Byly také nalezeny např. u bakterií, rostlin, myší nebo lidí (Militello *et al.*, 2008). Z parazitických protistů např. u *P. falciparum* (Gunasekera *et al.*, 2004) nebo *G. intestinalis* (Elmendorf *et al.*, 2001a). U *G. intestinalis* tvoří antisense RNA molekuly, které jsou polyadenylované, dokonce okolo 20 % transkriptomu.

Funkce antisense RNA molekul je prostudována velmi málo. U bakterií mohou ovlivňovat transkripci, stabilitu RNA a translaci komplementárních mRNA (Gottesman, 2005). U eukaryotních organismů mohou ovlivňovat genový imprinting (Wutz *et al.*, 1997), splicing (Uchida *et al.*, 2004), editing (Chu and Dolnick, 2002) nebo represi translace (Wightman *et al.*, 1993).

Široké spektrum účinků může být příčinou nespolehlivosti této techniky při umlčování genů. Produkce antisense RNA se k umlčování genů používá u všech v této práci uváděných parazitických protistů vyjma *T. brucei*. První inhibice byly u většiny těchto organismů publikovány cca před osmi-deseti lety. U žádného z nich však tato technika nenašla masové využití.

2.5 Techniky umlčování genů u *Trypanosoma brucei brucei*

Trypanosoma brucei brucei (nadále *T. brucei*) patří do čeledi *Trypanosomatidae*. Je jedním z původců onemocnění dobytka zvané “nagana“. Jedná se výhradně o extracelulárního parazita. Vektorové formy osidlují střevní epitel bodalky a krevní formy se nacházejí v krvi savců. Při přechodu mezi vektorem a savčím hostitelem dochází ke změně hlavních povrchových glykoproteinů (EP-/GPEET-procykliny, povrchové glykoproteiny v přenašeči; VSG, povrchové glykoproteiny v savcích), dochází k velmi výrazné změně energetického metabolismu a v důsledku toho i k velmi výrazné strukturní a funkční transformaci mitochondrie.

2.5.1 Transfekční systémy

Pro *T. brucei* je typická polycistronická transkripce. Po přepisu se vlákno RNA štěpí na mRNA kódující jednotlivé proteiny. Při vyštěpování těchto mRNA z dlouhého vlákna dojde k přidání 5’ “cap“ struktury a 3’ “polyA“ sekvence na konce každé mRNA. Signálem pro přidání jsou SL místa [splice leader additional sites] na obou stranách genu. Tento proces se nazývá “trans-splicing“.

Regulace exprese se u většiny genů odehrává na post-transkripční úrovni (Teixeira and daRocha, 2003). Pro regulaci exprese jsou velmi důležité především 3’ UTR oblasti transkriptů [UTR, untranslated region, nepřekládané oblasti na mRNA] (Clayton, 1999). Pro efektivní transkripci u *Trypanosoma cruzi* a *Leishmania enrietti* promotorová sekvence dokonce vůbec nemusí být přítomna (Laban and Wirth, 1989; Teixeira *et al.*, 1995).

Pro expresi genů byly vyvinuty různé vektory. Tyto vektory musí obsahovat SL místa (pro trans-splicing a polyadenylaci) na obou stranách vloženého genu. Pro zajištění efektivního trans-splicingu jsou používány různé sekvence odvozené od řady genů (Clayton, 1999). Je ale relativně málo známých promotorů. Používá se omezené množství promotorů přepisovaných polymerázou I: EP procyklinové, VSG promotory a promotory pro ribozomální RNA (Clayton, 1999; Teixeira and daRocha, 2003).

K doručení rekombinantní DNA do trypanosom se používá elektroporace. Dosažena byla transientní (přechodná) transfekce (Eid and Sollner-Webb, 1987) i stabilní transfekce (ten Asbroek *et al.*, 1993). Transfekce pomocí integrace lineární DNA do genomové DNA je

vysoce účinná. Naproti tomu transfekce cirkulárním plazmidem vede k vyselektování rezistentních klonů jen zřídka (Clayton, 1999).

2.5.2 Inducibilní systémy

Stádiově specifická exprese

Přidáním 3' UTR oblastí EP1 a EP2 genů (geny pro povrchové proteiny ve vektorových stádiích) k vkládanému genu se dá zajistit silná exprese tohoto genu u vektorových forem a velmi slabá u krevních forem (Hotz *et al.*, 1997).

Tet-represor/operátorové inducibilní systémy

U *T. brucei* byly zavedeny dva tet-represor/operátorové inducibilní systémy. V prvním se reguluje transkripce pomocí EP-procyklinového promotoru (Wirtz and Clayton, 1995) a ve druhém řídí transkripci promotor pro T7 polymerázu (Wirtz *et al.*, 1998). Oba systémy se používají u transgenních linií trypanosom, které stabilně vytvářejí T7 polymerázu a tetracyklinový represor.

Každý systém má své individuální výhody. T7 promotor je nezávislý na stádiu parazita a zajišťuje efektivnější transkripci, ale i za absence tetracyklinu je stále mírně transkripčně aktivní. EP promotor je slabší, ale zato u něj nedochází k nežádoucí neindukované transkripci. Je aktivní jen u procyklických forem (Motyka and Englund, 2004). Vektory odvozené od obou těchto systémů se používají např. pro indukci tvorby dsRNA (Motyka and Englund, 2004).

2.5.3 Úplná inaktivace genů

U *T. brucei* se většina genů vyskytuje ve dvou kopiích (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005). Pro inaktivaci obou kopií genu se používá dvoustupňová delece s použitím odlišných selekčních markerů (Estevez *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 2000). Alternativně lze eliminace obou genů dosáhnout delecí pouze jednoho z nich a následným zvyšováním koncentrace selekčního činidla. Tato technika se nazývá selekce pro ztrátu heterozygótnosti (Clayton, 1999; Liu *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 1998). Děj je možno vysvětlit druhou homologní rekombinací nebo nehodou při chromosomové segregaci. Využití této

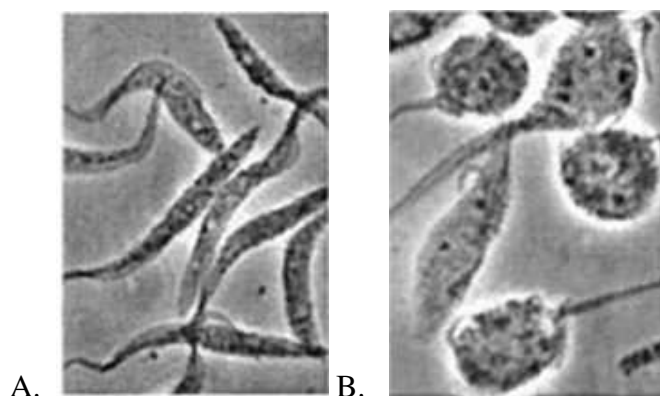
v principu jednoduché metody je ale v praxi pracné a nespolehlivé (Clayton, 1999). Může však být užitečné v případě, když se cílený gen vyskytuje ve více kopiích na jeden haploidní genom (Liu *et al.*, 2006).

I přes poměrně rozvinutou schopnost *T. brucei* efektivně rekombinovat je “knockout“ vzhledem k diploiditě těchto organismů obtížný a nevyužívá se příliš často.

2.5.4 RNA interference

RNAi byla u *T. brucei* popsána již v roce 1998 (Ngo *et al.*, 1998). Ke snížení hladiny cílové mRNA byla využita jak elektroporace dsRNA, tak systém umožňující tvorbu dsRNA v buňce. Při inhibici genu pro alfa-tubulin byl pozorován “fat cells“ fenotyp jako důsledek inhibice jeho tvorby (obr. 7). Přirozená úloha RNAi u *T. brucei* není objasněna. Je pravděpodobné, že mezi její buněčné funkce patří tlumení transkriptů retrotranspozonů (Shi *et al.*, 2004), obdobně jako u dalších organismů (Kalmykova *et al.*, 2005).

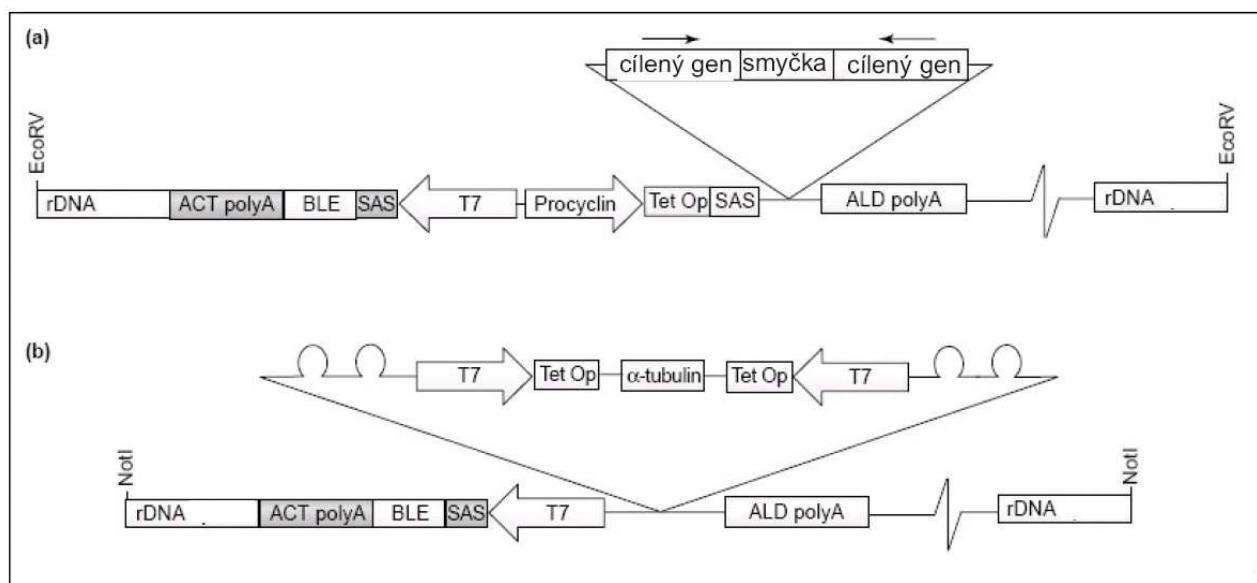
V dnešní době se umlčování genů u *T. brucei* na bázi RNAi dociluje především použitím dvou inducibilních vektorů (Motyka and Englund, 2004) (obr. 8). První typ produkuje vlásečkovou dsRNA, druhý vytváří pomocí opačných promotorů sense a antisense vlákno vloženého genu. Vektory produkující vlásečkovou dsRNA mají většinou lepší inhibiční vlastnosti (Durand-Dubief *et al.*, 2003). Stupeň rozvinutí RNA interferenčních technik u *T. brucei* se dá demonstrovat projektem na umlčení 210 genů na chromozomu I (Subramaniam *et al.*, 2006). U 30 % genů byl pozorován vliv exprese dsRNA na fenotyp.



Obr. 7

Expres dsRNA pro alfa-tubulin způsobí u buněk trypanosom zakulacení, tzv. “fat cells“ fenotyp.

A. Buňky netransfekované dsRNA, B. Buňky transfekované dsRNA. Převzato (Ngo *et al.*, 1998).



Obr. 8

Vektory pro RNAi u *T. brucei*.

A) Vláškový vektor. Šipky ukazují orientaci DNA sekvencí.

B) pZJM vektor. Je znázorněna situace, kdy bude cíleným genem alfa-tubulin.

Vektory jsou znázorněny ve své linerizované formě po rozštěpení v oblasti rDNA sekvence.

Vysvětlivky: Procyclin, EP promotor; Tet Op, tetracyklinový operátor; Ω-Ω, dvojitý T7 terminátor; T7, promotor pro T7 polymerázu; rDNA, ribozomální DNA; ACT polyA, 3' SL přídatné místo odvozené od aktinu; BLE, gen pro phleomycinovou resistenci; SAS, 5' SL přídatné místo; ALD polyA [aldolase poly(A)], 3' SL přídatná sekvence odvozená od aldolázy. Převzato a upraveno (Motyka and Englund, 2004).

2.5.4.1 RNA interference u *Trypanosoma congolense*

RNA interferenční dráha se vyskytuje také u *Trypanosoma congolense*, původce onemocnění skotu. U *T. congolense* byly nalezeny homology proteinu dicer a argonaut (Shi *et al.*, 2006). Funkčnost této dráhy byla demonstrována zavedením tetracyklinem regulovaného systému pro expresi dsRNA (Inoue *et al.*, 2002).

Inoue a kol. (2002) popisuje inhibici pomocí transientně a stabilně vloženého plazmidu. Inhibovány byly geny pro alfa-tubulin a ribozomální protein P0. Degradace mRNA či snížení exprese proteinu nebylo ukázáno. Sledován byl pouze fenotyp "fat cells" a inhibice růstu buněk. Další práce využívající RNA interferenci u *T. congolense* byla publikována rok poté, opět byl pozorován pouze růstový fenotyp (Bannai *et al.*, 2003).

2.5.5 Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul

Antisense RNA techniky u *T. brucei* nefungují (Bastin *et al.*, 1998; Drozd *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2000). Funkčnost RNAi tedy implikuje vysvětlení, že se antisense RNA molekuly v buňce nepotkají se sense vlákny (kdyby ano, pravděpodobně by vznikla dsRNA a došlo by k inhibici pomocí RNAi). Drozd a kol. (2002) ukázal, že pravděpodobnost setkání sense a antisense vláken, a tedy tvorby dsRNA, v buňce *T. brucei* je závislá na prostorové vzdálenosti míst jejich transkripce. Inhibice byla zaznamenána pouze při kontrasekci sense a antisense plazmidů. Při transfekci pouze jednoho z plazmidů inhibice nenastala. Autoři předkládají vysvětlení: Při kotransfekci dochází k rekombinaci plazmidů navzájem a k včlenění sense i antisense konstruktů do stejného místa v genomové DNA.

2.6 Techniky umlčování genů u *Leishmania spp.* a *Trypanosoma cruzi*

Leishmania spp. a *T. cruzi* jsou dalšími zástupci čeledi *Trypanosomatidae*. Přenašeči leishmanií jsou komáři rodu *Phlebotomus* nebo *Lutzomya*, v jejichž střevech žijí extracelulární promastigotní stádia. V savčím hostiteli se pak nacházejí amastigotní vnitrobuněčná stádia, která napadají makrofágy. U lidí mohou některé druhy způsobovat vážná viscerální a kožní onemocnění.

T. cruzi je přenášena plošticemi z čeledi *Reduviidae* a hostiteli jsou někteří savci včetně člověka. V ploštici žijí epimastigoti, v savci pak vnitrobuněční amastigoti. U člověka *T. cruzi* způsobuje Chagasovu chorobu.

2.6.1 Transfekce a inducibilní systémy

U leishmanií a *T. cruzi* se pro transfekci využívá jak integračních, tak episomálních vektorů (Clayton, 1999). Jediným využívaným promotorem je promotor pro rRNA (Clayton, 1999; Teixeira and daRocha, 2003). U *Leishmania donovani* (Yan *et al.*, 2001) a u *T. cruzi* (Wen *et al.*, 2001) byl zaveden i tet-represor/operátorový inducibilní systém.

2.6.2 Úplná inaktivace genů

Jde o diploidní organismy, metody genové eliminace u leishmanií a *T. cruzi* jsou obdobné jako u *T. brucei* (Clayton, 1999). Využívá se dvoustupňové selekce (Clayton, 1999) i selekce na ztrátu heterozygótnosti (Gueiros-Filho and Beverley, 1996; Liu *et al.*, 2006). Pro využití této techniky u leishmanií a *T. cruzi* platí stejné zobecnění jako v případě trypanosomy: “Knockout“ je pracný a málo využívaný.

2.6.3 Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul

Pomocí antisense RNA technik byly umlčeny geny u *L. donovani* (Pandey *et al.*, 2004; Somanna *et al.*, 2002; Zhang and Matlashewski, 1997; Zhang and Matlashewski, 2000), *L. major* (Liang *et al.*, 2003) a u *L. amazonensis* (Chen *et al.*, 2000). Antisense RNA techniky nejsou u této skupiny protistů rozšířeny a publikace z poslední doby o jejich užití chybí. V několika zmíněných pracích byl při antisense inhibici pozorován úbytek sense mRNA. Nikdy však nebyl pozorován vznik krátkých dsRNA oligonukleotidů charakteristických pro RNA interferenci (Chen *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2004).

2.6.4 RNA interference

Leishmania braziliensis je jediným zástupcem leishmanií, u něhož byly nalezeny orthology diceru a argonautu (Peacock *et al.*, 2007). Další zástupci leishmanií a *T. cruzi* jsou považováni za organismy, u kterých se RNA interference nevyskytuje (Ullu *et al.*, 2004). Zajímavostí je, že u *L. major* a *L. infantum* byla na odpovídajícím místě genomu jako u *L. brasiliensis* nalezena degenerovaná sekvence proteinu argonaut (Peacock *et al.*, 2007).

Neúspěch při snaze o docílení inhibice genů pomocí dsRNA byl publikován u *L. major* (Beverley, 2003; Robinson and Beverley, 2003), *L. infantum* (Peacock *et al.*, 2007), *L. donovani* (Robinson and Beverley, 2003; Zhang and Matlashewski, 2000) a *T. cruzi* (daRocha *et al.*, 2004).

Zhang a Matlashewski (2000) provedli u *L. donovani* sérii pokusů s vnášením plazmidů produkujících antisense RNA vlákna, sense RNA vlákna a vlásenky tvořící RNA. Redukce hladiny mRNA byla pozorována pouze v případě plazmidů exprimujících antisense

RNA (Zhang and Matlashewski, 2000). RNA interference nebyla u tohoto prvoka pozorována ani při elektroporaci krátkých siRNA [small interfering RNA, tyto molekuly slouží k degradaci RNA molekul prostřednictvím RNA interference] (Robinson and Beverley, 2003).

Da Rocha a kol. (2004) podrobně testovali výskyt RNA interference u *T. cruzi*. Pomocí tří různých vektorů se snažili dosáhnout inhibice u genů kódujících beta-tubulin, GP72 (adhezivní protein bičíku), ribozomální protein P0, amastin a exogenně přidaný gen pro GFP [green fluorescent protein]. Po stabilní i transientní transfekci plazmidů do *T. cruzi* ale nebyl pozorován žádný vliv fenotyp ani u jednoho z pěti genů. Přitom plazmid produkující dsRNA pro beta-tubulin náležející *T. cruzi* ukázal očekávaný “fat cell“ fenotyp u *T. brucei* (daRocha *et al.*, 2004).

U *L. brasiliensis*, jak bylo výše zmíněno, známe orthology proteinů dicer a argonaut. Zatím nebyly publikovány žádné práce popisující inhibici genů, ale umlčování genů pomocí RNA interference u tohoto organismu pravděpodobně funguje (osobní komunikace s Prof. J. Lukešem; Institut parazitologie v Českých Budějovicích).

2.6.5 Inhibice genů pomocí antisense DNA oligonukleotidů

Pro léčbu leishmaniózy způsobované *L. donovani* byly otestovány antisense DNA oligonukleotidy. Pokusy byly prováděny na tkáňových kulturách infikovaných makrofágů. Do média byly přidány DNA oligonukleotidy v různých koncentracích a obalené různými kationickými lipidy (Chakraborty *et al.*, 1999; Dasgupta *et al.*, 2002). Nejúspěšnější kombinace dosáhla 89% inhibice růstu leishmanií proti kontrole, v tomto případě byl inhibován gen pro beta-tubulin u parazita (Dasgupta *et al.*, 2002).

2.7 Techniky umlčování genů u *Plasmodium falciparum*

P. falciparum patří do skupiny *Apicomplexa*. Tento parazit je původce nejpatogennější lidské formy malárie. Přenašečem jsou komáři rodu *Anopheles*. Sporozoiti plasmodií jsou inokulováni do krevního oběhu se slinami komára. Poté se mění v meronty a dochází k jejich

namnožování, nejdříve v jaterních buňkách a posléze v červených krvinkách. Z některých merontů vznikají gamonti, které nasaje komár. V komárovi potom proběhne pohlavní cyklus.

2.7.1 Transfekce a inducibilní systémy

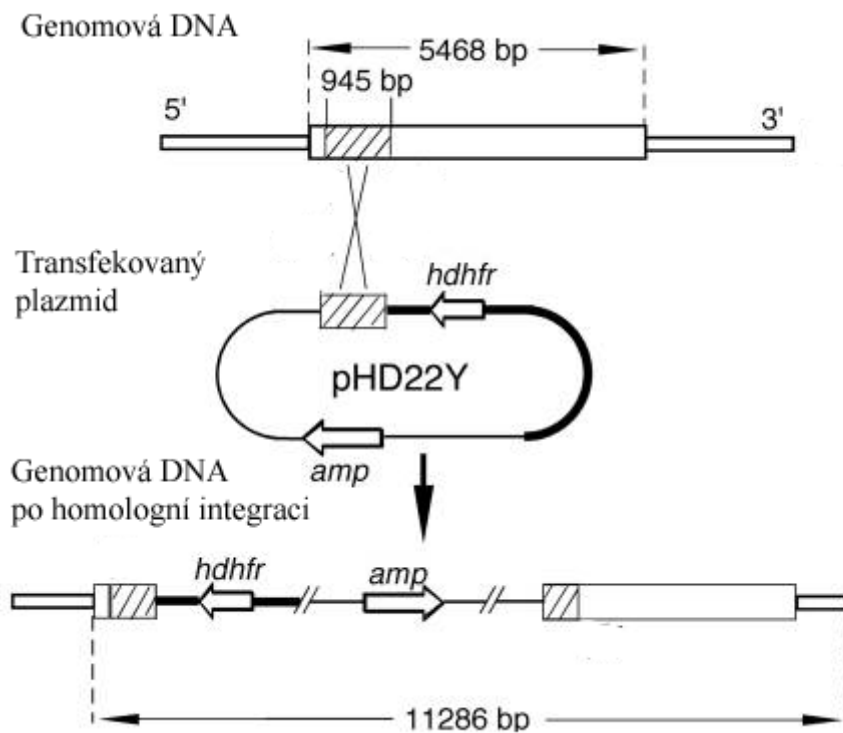
V roce 1995 byla popsána transientní transfekce elektroporací cirkulární DNA do infikovaných erytrocytů (Wu *et al.*, 1995) a další rok byla zavedena i stabilní transfekce pomocí integračních vektorů (Wu *et al.*, 1996).

U *P. falciparum* byl zaveden trans-aktivátorový systém regulované transkripce (Meissner *et al.*, 2005) (viz kapitola 2.2.1). Tento systém je odvozený od systému u *T. gondii* (Meissner *et al.*, 2002).

2.7.2 Úplná inhibice genů

P. falciparum má v jistých stádiích vývoje haploidní genom, a proto je homologní rekombinace často využívanou technikou (Carvalho and Menard, 2005). V buňce *P. falciparum* je lineární DNA rychle degradována, pro transfekci se tedy užívá cirkulárních plazmidů. Ty se do genomové DNA včleňují především procesem homologní integrace (Carvalho and Menard, 2005). Na obrázku 9 je znázorněno schéma delece genu pro PfMRP [Multidrug Resistance-associated Protein] u *P. falciparum* (Raj *et al.*, 2009). Carvalho a Menard (2005) uvádějí 30 prací, které použily těchto technik při studiu úlohy genů v různých stádiích cyklu parazita (obr. 10).

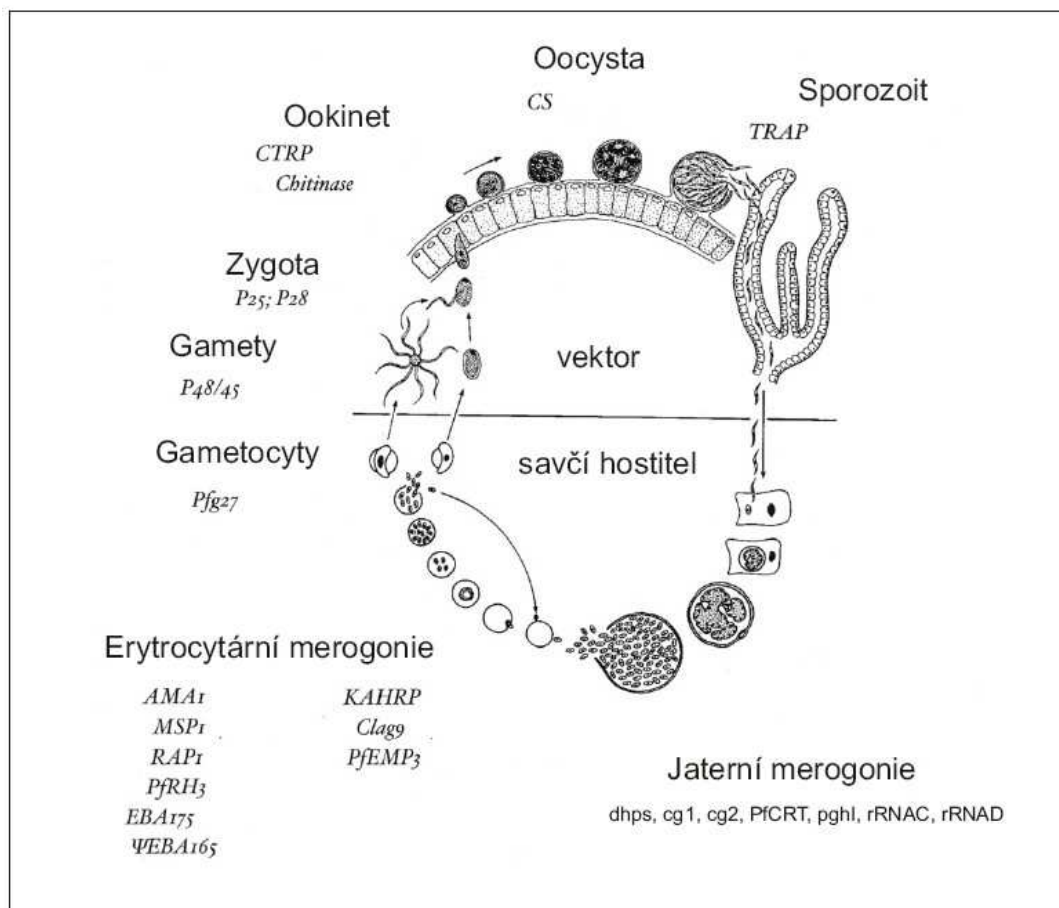
Homologní rekombinace se pro “knockout“ využívá i u dalších druhů, *P. berghei* (van Dijk *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995) a *P. yoelii* (Mikolajczak *et al.*, 2008).



Obr. 9

Úplná inhibice genu PfMRP [*Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance-associated Protein] v buňkách *P. falciparum* pomocí plazmidu pHD22Y.

Vysvětlivky: dhfr, gen kódující selekční marker pro plasmodium - lidskou dihydrofolátreduktázu; amp, gen pro ampicilinovou rezistenci u bakterií. Místo integrace plazmidu do chromozomu je znázorněno šrafovane. Na schématu je vyznačena délka DNA v párech bází. Převzato a upraveno (Raj et al., 2009).



Obr. 10

Přehled genů inaktivovaných metodou homologní rekombinace u *P. falciparum*.

Obrázek znázorňuje, které geny byly zkoumány a v jakých stádiích cyklu parazita. Převzato a upraveno (Carvalho and Menard, 2005).

2.7.3 Umlčování genů pomocí produkce antisense RNA molekul

Redukce mRNA díky produkci antisense RNA molekul byla u *P. falciparum* popsána v několika pracích (Crooke *et al.*, 2006; Gardiner *et al.*, 2000).

Crooke a kolektiv (2006) inhibovali mRNA genu pro glukózu-6-fosfátdehydrogenázu-6-fosfátglukonolaktonázu, aby zmapovali vliv její absence na expresi antioxidantních genů. Tlumení bylo dosaženo pomocí stabilní transfekce plazmidů produkujících antisense RNA anebo elektroporací siRNA oligonukleotidů. V případě antisense RNA došlo k největší redukci cílové mRNA (kolem 50%) v čase 48 hodin po transfekci.

Technika inhibice genů pomocí produkce antisense RNA u *P. falciparum* zřejmě nefunguje spolehlivě. Nedávno publikovaná studie prezentuje neschopnost antisense RNA molekul inhibovat expresi luciferázy (Baum *et al.*, 2009).

2.7.4 RNA interference

U *P. falciparum* nebyl nalezen dicer ani argonaut (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Ullu *et al.*, 2004). V několika studiích však bylo ukázáno, že po elektroporaci dsRNA oligonukleotidů přímo do infikovaných krvinek došlo k výraznému snížení hladiny mRNA cílového proteinu (Crooke *et al.*, 2006; Gissot *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; McRobert and McConkey, 2002; Tuteja *et al.*, 2008). Inhibice byla pozorována i při pouhém přidání siRNA oligonukleotidů do média (Dasaradhi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2002; Malhotra *et al.*, 2002; Sunil *et al.*, 2008). Další práce ukazují inhibici pomocí přidání dlouhé dsRNA (Gissot *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2002; McRobert and McConkey, 2002; Sriwilaijaroen *et al.*, 2009). RNAi inhibice pomocí siRNA byla v jedné studii úspěšně provedena i u *P. berghei*, hlodavčí malárie (Mohammed *et al.*, 2003). Při tomto pokusu byly siRNA injekčně vpraveny přímo do krve myši.

Vznik krátkých dsRNA oligonukleotidů byl pozorován v jediné práci u *P. falciparum* a v jediné práci u *P. berghei* (Malhotra *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2003). Obě práce pocházejí ze stejné laboratoře.

U *P. falciparum* byly publikovány i neúspěšné pokusy o inhibici pomocí RNA interference (Baum *et al.*, 2009; Blackman, 2003). V buňkách *P. falciparum* se navíc nepovedlo nalézt endogenní siRNA (Rathjen *et al.*, 2006). Proto je existence RNA interference u *P. falciparum* i přes poměrně velké množství prací stále kontroverzní téma (Militello *et al.*, 2008). Baum a kol. (2009) experimentálně podpořili názor o nefukčnosti RNA interference u *P. falciparum*. Pomocí siRNA se neúspěšně pokusili inhibovat u *P. falciparum* 3 geny, inhibice nebyla dosažena ani v systémech produkce dlouhé dsRNA. Výzkumný tým se zde také neúspěšně pokusil umlčet gen u *P. berghei* pomocí siRNA analogickým postupem jako Mohammed a kol. v roce 2003.

2.7.5 Inhibice pomocí S-DNA antisense oligonukleotidů

U *P. falciparum* byla testována schopnost antisense S-DNA oligonukleotidů inhibovat růst. V prvním pokusu byly S-DNA oligonukleotidy volně přidány do média k infikovaným červeným krvinkám (Noonpakdee *et al.*, 2003). Pro zlepšení dopravy do buněk byly v další studii S-DNA oligonukleotidy zfúzovány s chitosanovými partikulami (Foger *et al.*, 2006). Tento systém ukázal až 87% inhibici růstu v porovnání s 68% inhibicí v případě volných S-DNA. Inhibována byla mRNA genu pro topoisomerasu II.

2.7.6 Inhibice pomocí ribozymů

Systém pro inhibici genů pomocí ribozymů se u *P. falciparum* sestává z uměle nasyntetizovaných “hammerhead“ ribozymů, které se přidají volně do média k buňkám. Mají krátká antisense ramena, obvykle 40 nukleotidů komplementární s cílenou RNA. Mají také pozměněnou strukturu, která je činí odolnějšími vůči degradaci. Některé báze jsou spojené fosforo-thiolátovou vazbou a některé báze jsou 2' O-metylované (Ahmed and Sharma, 2008; Vinayak and Sharma, 2007).

Vinayak a Sharma (2007) ukázali, že ribozym může *in vivo* inhibovat růst o 90 % ve srovnání s kulturou buněk, kde ribozym do média přidán nebyl. Inhibice růstu byla závislá na koncentraci přidaného ribozymu. Systém je ale značně nespecifický. V porovnání s růstem kultury, ke které byl přidán nesmyslný ribozym, bylo dosaženo pouze 30% inhibice. V obou studiích bylo nicméně ukázáno snížení RNA oproti kontrolnímu genu.

2.8 Techniky umlčování genů u *Toxoplasma gondii*

Tento parazit patří do skupiny *Apicomplexa*. Jeho definitivním hostitelem jsou kočkovité šelmy a mezi možnými mezihosteli je velká škála teplokrevných obratlovců včetně člověka. Pro člověka jsou infekční tkáňové cysty v mase jiných mezihostitelů i kontaminativně přenosné oocysty z výkalů koček. U dospělých osob je nákaza asymptomatická, avšak u osob se sníženou imunitou (nákazy virem HIV) mohou infekce

toxoplasmou způsobit i smrt. U těhotných matek způsobuje toxoplasma v případě transplacentárního přenosu potraty či neurologické defekty u novorozenců.

Haploidní sporozoiti a bradyzoiti se po vstupu do hostitele přeměňují na velmi rychle se množící tachyzoity. Tachyzoiti se poté nechají roznést do různých tkání, kde se někteří přemění na bradyzoity – klidová stádia. Když se dostanou bradyzoiti do definitivního hostitele, kočky, dojde k sexuálnímu rozmnožování a vzniku diploidní zygoty. Ta se následně přemění v oocystu obsahující sporocysty se sporozoity.

2.8.1 Transfekce a inducibilní systémy

Používají se stabilní episomální i integrační transfekční vektory (Kim *et al.*, 1993; Soldati and Boothroyd, 1993). Integrační vektory jsou linearizované.

U *T. gondii* byl zaveden inducibilní tet-represor/operátorový systém (Meissner *et al.*, 2001). Jeho využití je ale omezené, neboť při řízení exprese esenciálních genů rychle ztrácí indukční schopnost (Meissner *et al.*, 2007). Druhý používaný inducibilní systém je založen na transkripci řízené trans-aktivátorem (Meissner *et al.*, 2002) (viz kapitola 2.2.1).

2.8.2 Úplné umlčení genů

T. gondii je v jistých částech vývoje haploidní organismus stejně jako *Plasmodium*. Eliminace jeho genů procesem homologní rekombinace se provádí užitím linearizovaných plazmidů (Kim *et al.*, 1993; Soldati *et al.*, 1995; Donald and Roos, 1998).

Úplné umlčování genů se ale u *T. gondii* příliš nevyužívá pro velmi časté nehomologní rekombinace. Jistý pokrok by do této záležitosti mohla vnést práce Foxe a kolektivu (2009), v které je popisována vysoce efektivní a specifická homologní rekombinace u jedné linie *T. gondii*, kde byla deletována dráha pro “nonhomologous end-joining DNA repair“, která nehomologní rekombinaci umožňovala (Fox *et al.*, 2009).

2.8.3 RNA interference

U *T. gondii* byl charakterizován argonaut, zatímco dicer nalezen nebyl (Al Riyahi *et al.*, 2006; Ullu *et al.*, 2004). V několika studiích však byla ukázána inhibice genů pomocí

elektroporace siRNA oligonukleotidů do trofozoitů (Al-Anouti *et al.*, 2004; Ananvoranich *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008). Inhibice byla popsána i pomocí exprese dlouhé dsRNA (Al-Anouti *et al.*, 2003; Al-Anouti *et al.*, 2004; Al-Anouti and Ananvoranich, 2002; Yu *et al.*, 2009) či pomocí přidání dlouhé dsRNA k buňkám (Al-Anouti *et al.*, 2003). Ananvoranich a kolektiv (2006) provedli úspěšnou inhibici u 14 genů účastnících se glykolytické dráhy (Ananvoranich *et al.*, 2006).

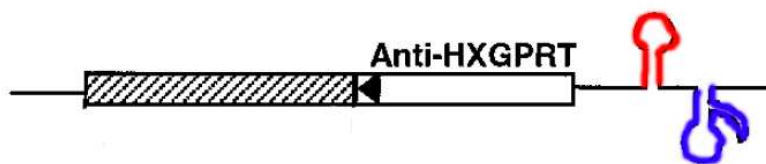
RNA interferenční technika se však v posledních letech u *T. gondii* příliš nevyužívá a zatím nebyla ukázána tvorba krátkých siRNA. Nad funkcí RNA interference u *T. gondii* nepanuje mezi vědci konsenzus. V řadě pokusů nebyl ukázán úbytek mRNA a navíc bylo inhibováno pouze malé množství genů (Militello *et al.*, 2008).

Většina výše zmíněných prací se zabývala inhibicí hypoxantin-xantinguanin-fosforibosyltransferázy (HXGPRT) a uracilfosforibosyltransferázy (UPRT) a inhibice byla většinou potvrzena pouze na růstovém fenotypu. Argonaut patří mezi málo dalších genů, které byly pomocí RNA interference inhibovány. Paraziti s jeho sníženou hladinou vykazovali sníženou schopnost prostřednictvím RNA interference umlčovat již zmíněné dva geny HXGPRT and UPRT (Al Riyahi *et al.*, 2006).

2.8.4 Ribozymy a inhibice genů pomocí produkce antisense RNA molekul

K tlumení exprese genů se u *T. gondii* používají rovněž “hammerhead“ ribozymy (Al-Anouti and Ananvoranich, 2002; Nakaar *et al.*, 1999; Nakaar *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2004). Strategie inhibice vychází z antisense RNA molekuly obsahující ribozym. Ta je produkována ze stabilně integrovaného plazmidu (obr. 11). Nakaar a kol. (2003) ukázal specifickou redukci hladiny proteinu ROP2 [secretory rhoptry protein 2] až na 15% původní množstevní hladiny. Sekvenčně podobné proteiny ROP 3 a ROP 4 inhibovány nebyly.

Al-Anouti a kol. (2002) porovnal účinnost (z plazmidu exprimovaných) dsRNA, antisense RNA molekul a ribozymů s antisense rameny pro inhibici genu pro UPRT. Pomocí negativní selekce (přidání FDUR, 5-fluoro-2'-deoxyuridin) byla testována inhibiční schopnost konstruktů. UPRT je totiž pro buňky v přítomnosti FDUR toxická. Po selekci vyrostly pouze transfektanti s konstrukty produkujícími dsRNA nebo ribozym. Neschopnost inhibice UPRT pomocí produkce antisense RNA byla demonstrována neschopností vyselektovat transfektanty (Al-Anouti and Ananvoranich, 2002).



Obr. 11

Část konstruktů pro inhibici hypoxantin-xantinguaninfosforibosyltransferázy (HXGPRT).

Černě šrafovaná oblast znázorňuje promotor pro nucleosidtrifosfáthydrolázu. Ve 3' UTR oblasti antisense transkriptu je navržen ribozym (modře) a vlásenka odvozená od histonu, která funguje jako možný stabilizační prvek RNA (červeně). Převzato a upraveno (Nakaar et al., 1999).

Inhibice pomocí produkce antisense RNA se u toxoplasmy nevyužívá. Prozatím nebyla publikována žádná studie, která by popisovala úspěšnou inhibici a navíc byla publikována práce, kde produkce antisense RNA k inhibici cíleného genu nevedla (Al-Anouti and Ananvoranich, 2002).

2.9 Techniky umlčování genů u *Giardia intestinalis*

G. intestinalis je dvoujaderný bičíkovec s nápadným adhezivním diskem pro přichycení k enterocytům střeva. V jeho cyklu se střídá stádium infekční cisty a vegetativního trofozoita. U lidí způsobuje vodnaté průjmy.

2.9.1 Transfekční techniky

K doručení rekombinantní DNA do giardií se používá stabilní nebo přechodná transfekce (Yee and Nash, 1995). Pro stabilní transfekce se používá selekce geneticinem (Sun et al., 1998) a puromycinem (Singer et al., 1998).

Využívá se cirkulárních episomálních a lineárních integrativních plazmidů u kmenu WB. U kmenu GS vede k integraci do vlastní DNA jak transfekce lineárních, tak i cirkulárních plazmidů (Singer et al., 1998).

Za účelem umlčování genů byla u *G. intestinalis* zavedena transfekční metoda založená na infekci trofozoitů dsRNA virem (GLV, giardiavirus) (Yu *et al.*, 1995). Jeho genom kóduje gen pro virovou RNA dependentní RNA polymerázu a gen pro kapsidový protein. Virová polymeráza specificky přepisuje jedno-vláknové virové RNA molekuly na dvouvláknové RNA, které se balí do virových kapsidových proteinů a opouští buňku.

Při transfekci se do trofozoitů *G. intestinalis* elektroporačně vpraví molekuly dsRNA. Na obou koncích těchto transfekovaných dsRNA molekul jsou sekvence odvozené od sekvence giardiaviru. Mezi tyto úseky je pak vložena exogenní RNA. Virová sekvence na obou koncích RNA zajišťuje dosyntetizování druhého vlákna a balení do virových partikulí. Infekce virem tuto RNA namnožuje a umožňuje její horizontální šíření mezi trofozoity v kultuře.

Do sekvence dsRNA byl později přidán ještě gen pro rezistenci k neomycinu (Yu *et al.*, 1996) či puromycinu (Dan and Wang, 2000). Selekcí jsou zvýhodňováni trofozoiti, ve kterých dochází k namnožování této dsRNA. Funkčnost exprese proteinů z dsRNA molekul byla demonstrována expresí luciferázy v dsRNA transfekovaných buňkách (Yu *et al.*, 1995).

2.9.2 Inducibilní systémy

U *G. intestinalis* byly zavedeny 2 inducibilní systémy. První je založen na tet-represor/operátorovém systému (Sun and Tai, 2000). V tomto systému se používá dvou operátorových sekvencí vložených mezi *ran* promotor [Ras-like nuclear protein gene minimal promoter] a gen, jehož exprese má být řízena. Tento konstrukt navíc obsahuje geny kódující neomycinfosfotransferázu a tetracyklinový represor.

Druhý systém je založen na encystačně specifických promotorech (Hehl *et al.*, 2000). V tomto systému se používají promotory pro *cwp1* gen (cyst wall protein 1). Tyto promotory zajišťují velmi silnou transkripci. Systém má však omezené využití, protože k této transkripci dochází pouze při encystaci (vis-Hayman and Nash, 2002).

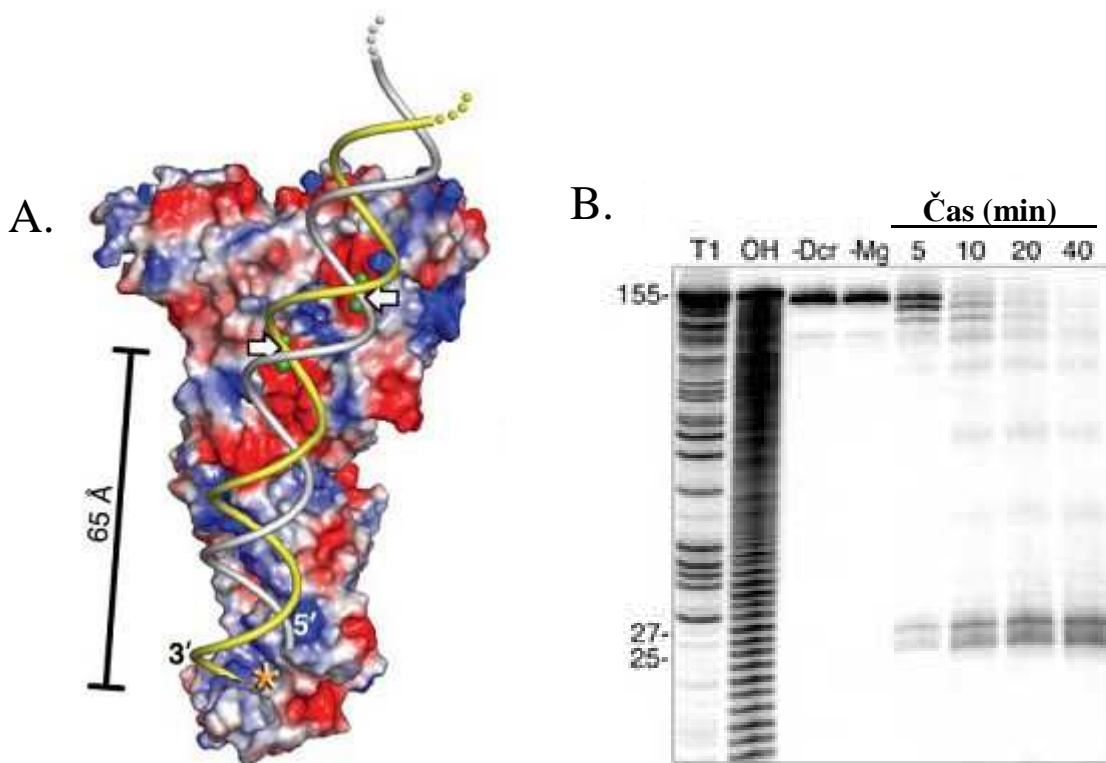
2.9.3 Úplná inhibice genů

“Knockout“ se u giardie nevyužívá z důvodu její ploidie (Meissner *et al.*, 2007; vis-Hayman and Nash, 2002). Původní představa o ploidii giardie byla 4N u trofozoitů (Adam,

2001). V aktuálním článku však bylo dokázáno, že se obě jádra liší v počtu chromozomů a představa o tetraploidii tedy není úplně přesná (Tumova *et al.*, 2007). I tak má giardie patrně většinu genů ve čtyřech kopiích a techniky homologní rekombinace jsou proto nevyužitelné.

2.9.4 RNA interference

Analýza genomu *G. intestinalis* identifikovala dicer (přístupové číslo: XP 001705536) a argonaut (XP 001707926) (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Macrae *et al.*, 2006; Ullu *et al.*, 2004). Giardiový dicer je jediný dicer, jehož tří-dimensionální struktura byla analyzována pomocí rentgenové krystalografie (Macrae *et al.*, 2006). Bylo také ukázáno, že dokáže štěpit dsRNA v *in vitro* systému (obr. 12) a umí nahradit funkci diceru v buňkách *Schizosaccharomyces pombe* (Macrae *et al.*, 2006).



Obr. 12

Štěpení dsRNA pomocí giardiového diceru.

A. Model štěpení dsRNA pomocí giardiového diceru.

Červená a modrá barva reprezentují kyselý a bazický povrchový náboj proteinu. Predikované katalytické Mg^{2+} ionty jsou znázorněny jako zelené kuličky. Bílé šipky ukazují na místa štěpení dsRNA. Hvězdička označuje PAZ doménu (vazba 3' přesahu dsRNA). Měřítko udává velikost proteinu.

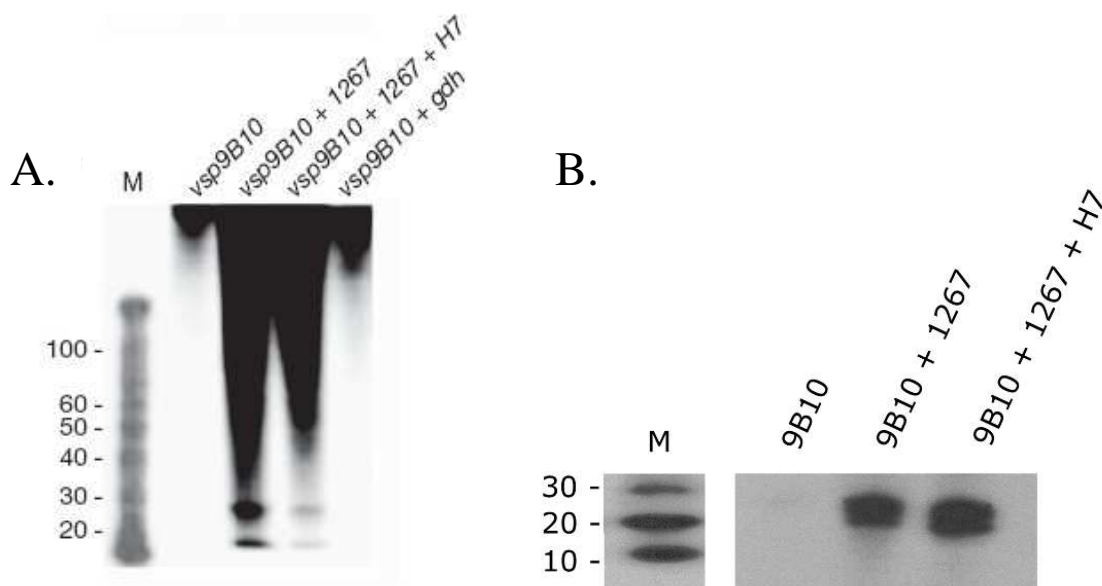
B. *In vitro* štěpení dsRNA pomocí giardiového diceru.

Vysvětlivky: T1, dsRNA je štěpena RNázou T1; OH, alkalická hydrolýza; -Dcr, RNA bez diceru; -Mg, nebyly přidány Mg^{2+} kationty. Na obrázku je znázorněn čas štěpení v minutách a také velikosti RNA molekul v párech bází. Převzato (Macrae et al., 2006).

Inhibice giardiového diceru byla publikována ve dvou studiích, jednou pomocí antisense RNA technik (Prucca *et al.*, 2008) a jednou pomocí dsRNA virového systému produkce antisense RNA obsahující ribozym (Saraiya and Wang, 2008). V obou případech se inhibice projevila snížením růstové rychlosti kultury. Byl také popsán vliv na expresi VSP genů [VSP, variable surface protein]. Autorské týmy těchto článků se ale rozcházejí v interpretaci těchto výsledků a na vysvětlení předkládají odlišné mechanismy regulace jejich exprese.

Prucca a kol. (2008) uvádí regulaci VSP genů pomocí dsRNA, která vzniká až v cytoplazmě reverzní transkripcí sense vláken pomocí RNA dependentní RNA polymerázy. Po štěpení dicerem slouží potom vzniklé siRNA k degradaci cíleného mRNA transkriptu pro VSP.

Prucca a kol. (2008) zjistili, že se v buňce vyskytuje řada sense transkriptů různých VSP genů (je známo, že na povrchu buňky se vyskytuje vždy pouze jeden VSP protein). Antisense RNA molekuly odpovídající VSP genům byly nalezeny také. Bylo však ukázáno, že nevznikají v jádře. Autoři vysvětlují jejich vznik reverzní transkripcí pomocí RNA dependentní RNA polymerázy. Takto vzniklá dsRNA patrně slouží k RNA interferenční degradaci VSP transkriptů. Autoři navíc ukazují, že je-li v buňce přítomna více jak jedna mRNA odpovídající VSP genům, dochází k její degradaci. Tento jev je nezávislý na konkrétním VSP genu, který aktuálně buňka exprimuje (obr. 13). V této práci nebyl vysvětlen mechanismus, jakým jeden exprimovaný gen uniká této degradaci.



Obr. 13

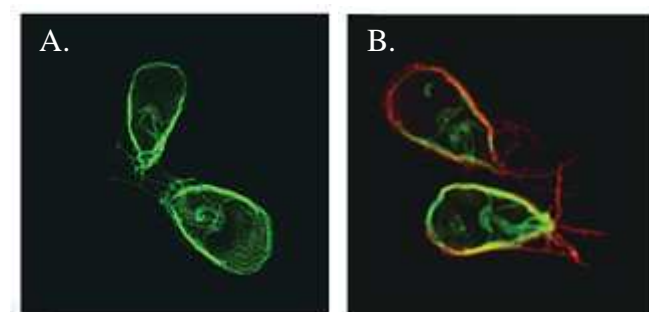
Vznik malých RNA po inkubaci radioaktivně značených VSP transkriptů s extraktem buněk *G. intestinalis*.

A. Klon exprimující VSP9B10.

B. Klon exprimující VSP1267.

Konkrétní přidávané mRNA jsou uvedeny na obrázcích. M značí hmotnostní standardy. Velikosti RNA molekul jsou uvedeny v párech bází. Převzato a upraveno (Prucca et al., 2008).

V přítomnosti diceru se na povrchu buněk vyskytuje jen jeden typ VSP. Prucca a kol. (2008) ukazují, že v linii se sníženou expresí diceru dochází k expresi více VSP na povrchu jedné buňky (obr.14).



Obr . 14

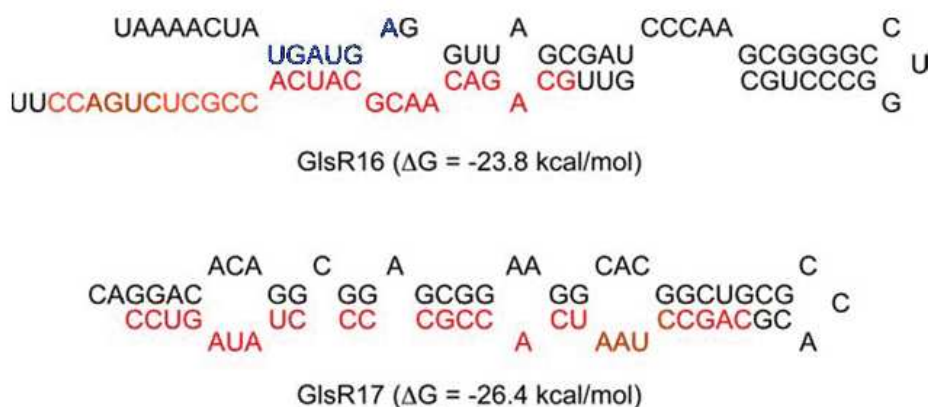
V buňkách se sníženou expresí diceru dochází k expresi více VSP proteinů.

Expresse VSP proteinů u kontrolních buněk (A) a v linii se sníženou expresí diceru (B).

Zeleně je značený VSP9B10, červeně je značený VSP1267. Převzato a upraveno (Prucca et al., 2008).

Saraiya a kol. (2008) naproti tomu uvádějí, že je exprese VSP genů regulována miRNA molekulami (mikro RNA, tyto molekuly slouží u savců k represi translace pomocí RNA interference), které vznikají v jádru. Tyto miRNA slouží k represi translace VSP genů pomocí RNA interferenční dráhy. VSP transkripty se při této inhibici nedegradují, což odpovídá inhibici genů pomocí miRNA u savců (Kiriakidou *et al.*, 2007).

Saraiya a Wang (2008) provedli naklonování malých RNA z *G. intestinalis*. Identifikovány byly dvě 26 nukleotidů dlouhé miRNA (nazvané miR2 a miR3), které pravděpodobně vznikají ze dvou SnoRNA molekul [SnoRNA, Small nucleolar RNA] nazvaných GlsR16 a GlsR17 (obr. 15). V buňkách se sníženou expresí diceru byl ukázán úbytek těchto miRNA, což napovídá představě, že se dicer podílí na vzniku miRNA z uvedených dvou snoRNA molekul. Možná místa zacílení pro miR2 a miR3 byla nalezena v 3' UTR oblasti u 22 VSP genů.



Obr. 15

Předpovězená sekundární struktura dvou sno-RNA molekul GlsR16 a GlsR17.

Červená písmena znázorňují miR2 a miR3. Převzato a upraveno (Saraiya and Wang, 2008).

Pro test hypotézy, že tyto miRNA ovlivňují expresi VSP genů, bylo šest těchto 3' UTR oblastí vneseno za gen kódující luciferázu. Pomocí elektroporace miRNA do buněk byla ověřena schopnost miRNA tlumit její expresi. Při této inhibici nedocházelo k degradaci cílené mRNA. Celá teorie byla navíc podpořena pomocí linie se sníženou expresí giardiového argonautu. Tato linie nebyla schopna pomocí miRNA tlumit expresi luciferázy.

Zmíněný článek připodobňuje RNA interferenci u *G. intestinalis* k dráze, kterou známe u savců. V těchto organismech často není RNA pomocí RNAi degradována a pouze se v buňce "ukryje" do tzv. "P-bodies" (Liu *et al.*, 2005). Ovlivňování větší skupiny genů, vznik

miRNA z vlásenky a také to, že homologie je právě ve 3' UTR oblasti mRNA, přesně odpovídá situaci u savců. U giardiového argonautu byla navíc ukázána schopnost vázat se na m⁷G čepičku mRNA molekul, což je opět evidentní podobnost s dráhou u savců (Kiriakidou *et al.*, 2007).

Bioinformatické analýzy giardiového argonautu predikovaly přítomnost Piwi domény (zodpovědná za vazbu na 5' přesahu siRNA), avšak nebyly jednotné v názoru na výskyt PAZ domény (zodpovědná za vazbu na 3' přesahu siRNA) (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Ullu *et al.*, 2004). Později bylo experimentálně prokázáno, že argonaut skutečně malé RNA váže a to nezávisle na jejich sekvenci, což odpovídá ostatním známým argonautům (Saraiya and Wang, 2008). Inhibice proteinu zpomaluje růst buněk (Saraiya and Wang, 2008) a silnější inhibice je patrně pro buňky letální (Prucca *et al.*, 2008).

V buňce *G. intestinalis* byly nalezeny malé RNA molekuly (Ullu *et al.*, 2005). Některé malé RNA jsou homologní k telomerickým retropozonomům a je možné, že slouží k umlčování jejich exprese skrze kondenzaci heterochromatinu (diskutováno v publikaci Ullu a kol., 2005). Podobná situace je známa např. u *T. brucei* nebo u octomilky *Drosophila melanogaster* (Kalmykova *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2004).

Giardiový dicer umí nahradit funkci diceru u *S. pombe* (Macrae *et al.*, 2006), což je organismus, kde RNA interference ovlivňuje především kondenzovanost chromatinu (Sugiyama *et al.*, 2005). Jak již zmíněný výskyt malých RNA homologních k retropozonomům, tak i funkční nahrazení dicer proteinu u *S. pombe* nasvědčují možnému ovlivnění kondenzace genomové DNA u *G. intestinalis* pomocí RNAi (viz kapitola 2.4.1).

O úloze RNAi při regulaci genů na post-transkripční úrovni u *G. intestinalis* můžeme pouze spekulovat. Výsledky experimentů v laboratoři Prof. Wanga ukazují na úlohu argonautu při regulaci translace VSP genů pomocí miRNA vlásenek, což by připodobňovalo situaci u giardie systému, který známe u savců (Saraiya and Wang, 2008). Experimenty provedené v laboratoři Prof. Lujana zase ukazují spíše na podobnost této dráhy s dsRNA degradační dráhou, kterou známe např. u *T. brucei* (Prucca *et al.*, 2008).

Touz a kol. (2004) publikovala inhibici genu pomocí tetracyklinem indukované exprese dsRNA ze dvou opačně orientovaných promotorů. Zdařila se inhibice adaptorproteinkomplexu 1. Produkce siRNA v této publikaci nebyla ukázána i při experimentální snaze toho docílit (C. Touz – osobní komunikace). Od té doby podobný systém pro inhibici použit u *G. intestinalis* nebyl.

2.9.5 Inhibice genů pomocí ribozymů a produkce antisense RNA molekul

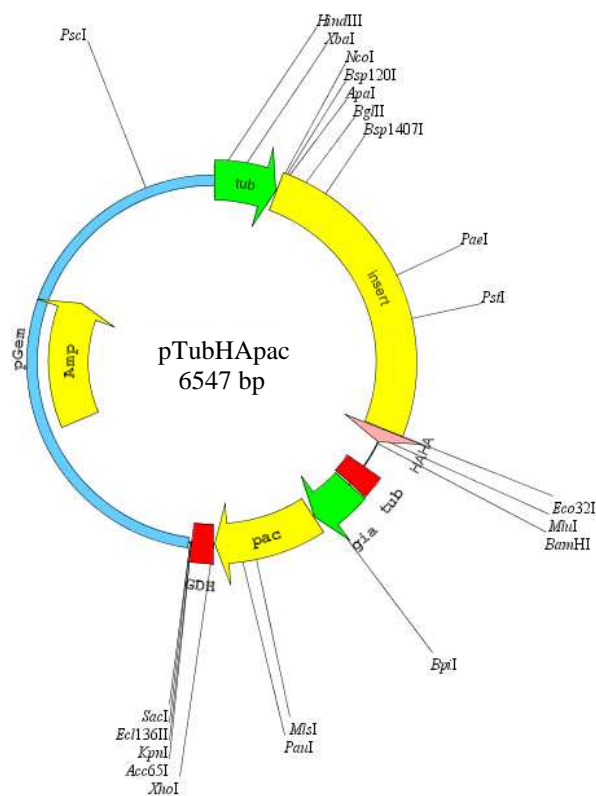
Nejčastěji používanou technikou pro umlčení genů v giardii je produkce antisense RNA, druhou nejčastější technikou je pak užití antisense RNA obsahující “hammerhead“ ribozym, která se amplifikuje v cytoplazmě pomocí dsRNA viru. Technika produkce antisense RNA byla u *G. intestinalis* použita již několikrát.

Tabulka shrnující publikace, kde bylo docíleno umlčení genu pomocí exprese antisense RNA molekul:

Plazmid	Promotor *	Cílový gen	Snížení mRNA	Snížení exprese proteinu	Publikace
pTubHAPac	alfa-tubulin	dicer	20%	?	(Prucca <i>et al.</i> , 2008)
		RdRp (RNA dependentní RNA polymeráza)	20%	?	
		VSP9B10	?	?	
pTubHAPac	alfa-tubulin	9 potencionálních SNARE proteinů	průměr 40%	?	(Elias <i>et al.</i> , 2008)
pTG3039	ornitin-karbamoyl-transferáza	GiPp2A (proteinfosfatáza 2A)	50%	70%	(Lauwaet <i>et al.</i> , 2007)
pINDG	inducibilní <i>ran</i>	GiPat (palmytoyltransferáza)	0%	?	(Touz <i>et al.</i> , 2005)
dsRNAua	inducibilní <i>ran</i>	adaptorprotein 1	20%	0%	(Touz <i>et al.</i> , 2004)
pTubHAPac	alfa-tubulin	GiGSP (granule specific protein)	?	0%	(Touz <i>et al.</i> , 2002)

* promotor pro produkci antisense RNA molekul

Většinou byl zaklonován celý čtecí rámec genu v opačné orientaci, jen jednou byla pro inhibici použita pouze část genu, a to u VSP9B10 (Prucca *et al.*, 2008). Nejčastěji používaný plazmid pro produkci antisense RNA je pTubHAPac (Obr. 16). Schéma vektorů pINDG a pTG3039 je v kapitole 4.4.



Obr. 16

Mapa plazmidu pTubHApac s vyznačením restrikčních enzymů

Vysvětlivky: Amp, betalaktamáza; pac, puromycin-N-acetyltransferáza; Tub, promotor nebo terminátor pro alfa-tubulin; gia, giardinový promotor; HAHA, sekvence pro hemaglutininové značení proteinů; GDH, terminátor pro glutamátdehydrogenázu; inzer, gen H7 VSP; pGem, sekvence plazmidu pGem; Zeleně jsou označeny promotory, červeně terminátory; velikost plazmidu je uvedena v párech bází.

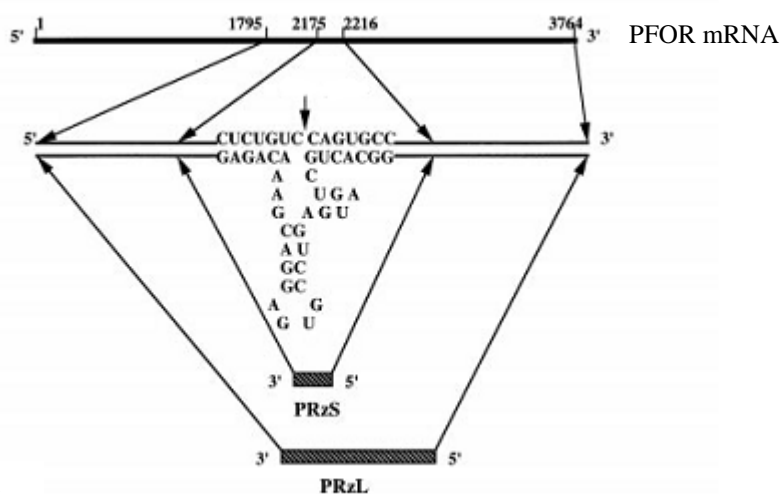
Všechny publikované práce věnované umlčování genů na bázi dsRNA viru vznikly v laboratoři Prof. C. C. Wang. Ve všech publikacích je ukázáno snížení mRNA inhibovaného genu. V žádné však není inhibice potvrzena pomocí imunoblotu. Snížení proteinu je nicméně vždy ukázáno měřením jeho aktivity či pozorováním vlivem inhibice na fenotyp.

Tabulka shrnující publikace s užitím dsRNA viru pro inhibici genů:

Vektor	Cílový gen	Snížení mRNA	Publikace
pC631neo	dicer	40%	(Saraiya and Wang, 2008)
	argonaut	50%	
pC631neo	diaphoráza	30%	(Li and Wang, 2006)
pC631neo	eIF4E1 (iniciační faktor translace)	40%	(Li and Wang, 2005)
pC631neo	eIF4E2	20%	
pC631pac	guaninfosforibosyl-transferáza	10%	(Munagala and Wang, 2002)
pC631pac	ADH E (alkoholdehydrogenáza E)	20%	(Dan and Wang, 2000)
pC631pac	PFOR (pyruvátferedoxin-oxidoreduktáza)	20%	(Dan <i>et al.</i> , 2000)

V těchto pracích je používán vektor odvozený od giardiaviru (obr. 17). Nejprve se *in vitro* nasyntetizuje RNA a ta se elektroporací vpraví do buněk. Pozorované snížení hladiny cílové mRNA bývá poměrně vysoké a silně závisí na délce antisense ramen ribozymu. Při délce ramen 20 a 21 nukleotidů bylo pozorováno snížení hladiny mRNA jen kolem 30%, u konstruktů s délkou ramen 2042 a 512 nukleotidů byla hladina mRNA snížena o 85% (Dan *et al.*, 2000). Inhibiční výsledek může záviset i na množství ribozymů v jedné molekule antisense RNA. Li a Wang (2006) uvádí, že exprese dvou ribozymů vyústila v lepší inhibici (Li and Wang, 2006).

A.



B.

GLV cDNA



C.

pC631pacPRzS(L)



Obr. 17

Schéma “hammerhead“ ribozymu a transfekčního vektoru pro inhibici genů pomocí dsRNA viru.

A. 2 ribozymy s antisense vláknou navržené pro inhibici PFOR mRNA (pyruvátferedoxinoxidoreduktáza), PRzS a PRzL.

B. cDNA odvozená od dsRNA sekvence giardiaviru; pol, RNA dependentní RNA polymeráza viru; gag, kapsidový protein.

C. DNA konstrukty pC631pacPRzS a pC631pacPRzL. Skládají se ze dvou koncových sekvencí odpovídajících virové cDNA (GLV cDNA), genu pro rezistenci k puromycinu (pac) a cDNA pro ribozym- antisense RNA (PrzS a PrzL).

Původně cirkulární vektor se linearizuje (konstrukty jsou vyobrazeny již v linární formě) a transkripce vznikne RNA, která se použije pro elektroporaci. Převzato a upraveno (Dan et al., 2000).

2.10 Techniky umlčování genů u *Entamoeba histolytica*

Měňavka *E. histolytica* je významný patogen člověka. Rozlišujeme u ní stádium infekční cysty, která je pozřena s potravou, a trofozoita, který se poté z cysty uvolní a kolonizuje střevo. Její forma “minuta“ se vyskytuje ve střevě jako komenzál. Může se však transformovat na formu “magna“, která způsobuje amébovou dysenterii. V malém procentu případů napadení člověka může dojít k rozsevu parazita mimo střevo. Nejčastěji pak působí jaterní abscesy, vzácně i smrt.

2.10.1 Transfekční a inducibilní systémy

V prvních experimentech se DNA vkládala do buněk améb pomocí elektroporace transientně (Nickel and Tannich, 1994). Posléze byl zaveden systém stabilní exprese pomocí cirkulárních plazmidů (Hamann *et al.*, 1995). Byly vyvinuty dva inducibilní systémy, oba založené na tet-represor/operátorovém mechanismu (Hamann *et al.*, 1997; Ramakrishnan *et al.*, 1997).

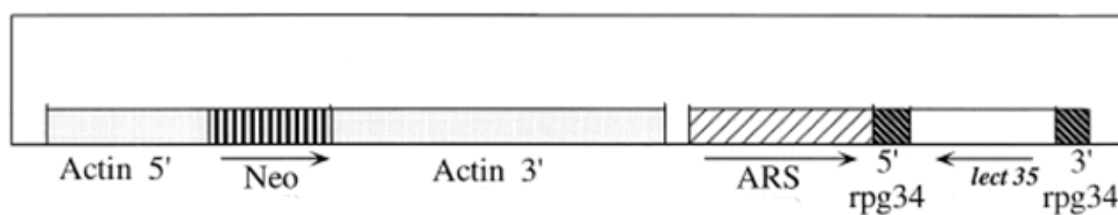
2.10.2 Úplná inhibice genů

Metody homologní rekombinace se u *E. histolytica* nepoužívají pro vysoký počet kopií jednotlivých genů (Meissner *et al.*, 2007).

2.10.3 Antisense RNA techniky

Pro RNA antisense techniky byl u *E. histolytica* zaveden systém produkující specifickou antisense RNA (obr. 18). Tato RNA má 5'UTR oblast odvozenou od transkriptu genu L21 (gen pro ribozomální protein, jinak také označovaný jako rpg34). Tato 5' UTR oblast na mRNA molekulách se neváže na polyribosomy (zřetězené ribosomy v cytoplazmě *E. histolytica*) jako jiné 5' UTR oblasti transkriptů. Při připojení této oblasti k produkovaným antisense RNA molekulám se zajistí “volnost“ antisense RNA molekul a tedy zvýšení pravděpodobnosti, že budou interagovat s mRNA vlákny (Moshitch-Moshkovitch *et al.*,

1997). Užití tohoto systému vedlo k signifikantnímu snížení exprese v několika studiích (Ankri *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 1999; Lavi *et al.*, 2008; Moncada *et al.*, 2006).



Obr. 18

Schéma plazmidu pSA20, který slouží k umlčení genu pro lektin 35.

Šipky označují orientaci genů. Gen pro rezistenci k neomycinu (neo) je přepisován pomocí aktinového (Actin) promotoru. Plazmid obsahuje ARS (autonomní replikační sekvence). Gen pro lektin 35 (lect 35) je přepisován v antisense orientaci z rpg34 promotoru. Převzato a upraveno (Ankri *et al.*, 1999).

Druhý systém pro produkci antisense RNA molekul je inducibilní (Sahoo *et al.*, 2003; Vats *et al.*, 2005). Namísto promotoru genu L21 se zde používá lektinového promotoru.

Degradace cílové mRNA prostřednictvím exprese antisense RNA byla dokumentována ve většině prací. Ani v jednom případě nebyla prezentována tvorba siRNA, která by naznačovala, že se této inhibice účastní RNA interferenční dráha (Ankri *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 1999; Lavi *et al.*, 2008; Moncada *et al.*, 2006; Sahoo *et al.*, 2003; Vats *et al.*, 2005).

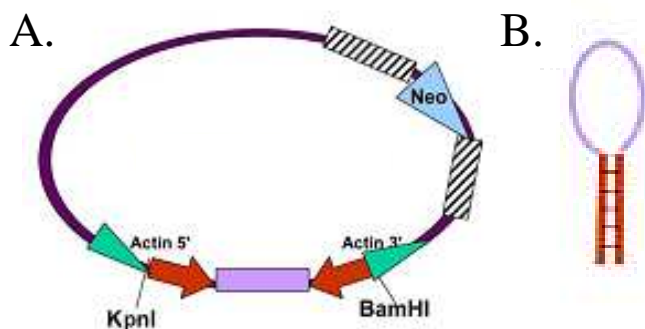
2.10.4 Inhibice pomocí PNA antisense oligonukleotidů

U *E. histolytica* byla použita inhibice tvorby proteinu pomocí PNA oligonukleotidů. Ty byly přidány volně do média k amébám. Za 96 hodin bylo měřeno množství cílového proteinu a u obou zkoumaných genů dosahovalo přibližně k 50 % původní hodnoty (Stock *et al.*, 2001). Dalším příkladem užití PNA oligonukleotidů je inhibice genu kódujícího alfa podjednotku Sec61 (Sanchez *et al.*, 2005).

2.10.5 RNA interference

U *E. histolytica* jsou známy homology klíčových enzymů RNA interferenční dráhy (Abed and Ankri, 2005; Ullu *et al.*, 2004). RNA interference již byla použita v několika studiích. K inhibici došlo v systémech produkujících dlouhou vlásenkovou dsRNA (Dastidar *et al.*, 2007; Kaur and Lohia, 2004; MacFarlane and Singh, 2007; Vayssie *et al.*, 2004), expresí krátkých 29 nukleotidů dlouhých vlásenek (Linford *et al.*, 2009) i přidáním siRNA do média (Solis and Guillen, 2008; Vayssie *et al.*, 2004). Schéma vektoru pro produkci dlouhé vlásenky je na obrázku 19.

Vznik siRNA v pracích ukázán nebyl, ale byly nalezeny malé endogenní RNA molekuly, které mají schopnost vázat se na Piwi doménu a pravděpodobně mají v buňce regulační funkci závislou na RNA interferenci (Zhang *et al.*, 2008).



Obr. 19

Schéma plazmidu pro expresi dsRNA vlásenky v buňkách *E. histolytica*.

Část genu EhDia (*E. histolytica* diaphanous protein) byla zaklonována v “head to head“ orientaci do plazmidu pro tvorbu dsRNA (A). Po přepisu z aktinového promotoru vznikne dsRNA vlásenka (B). Vysvětlivky: Fialová barva – DNA pro tvorbu smyčky; modrá - neo, rezistence k neomycinu; červená, část genu Eh Dia, který se přepisuje díky aktinovému promotoru a terminátoru (zeleně). Převzato a upraveno (Kaur and Lohia, 2004).

2.10.6 Unikátní inhibice transkripce

U *E. histolytica* se podařilo docílit zajímavého transkripčního umlčování genů (Bracha *et al.*, 2006; Bracha *et al.*, 2003; Mirelman *et al.*, 2006).

Prvně bylo transkripční umlčení pozorováno transfekcí plazmidu, ve kterém byl zaklonován v sense orientaci gen pro amoebapór A (EhAP-a) včetně jeho 5' promotorové oblasti, která také obsahovala repetitivní DNA element SINE [short interspersed nuclear element]. Tento konstrukt indukoval modifikaci chromatinu (Anbar *et al.*, 2005) a zabránil tak expresi EhAP-a genu (Bracha *et al.*, 2003).

Za cca 20 dní po transfekci je možné přestat buňky selektovat. Po vymizení plazmidu efekt inhibice zůstává. Taková linie buněk byla v laboratoři kultivována po 4 roky a efekt přetrval (Mirelman *et al.*, 2008). Prokázán byl nevirulentní fenotyp a uvažuje se o jeho klinickém využití při vakcinaci (Mirelman *et al.*, 2008).

Bylo ukázáno, že tímto způsobem lze transkripčně umlčovat i další geny (Bracha *et al.*, 2006) (obr. 20). Mechanismus, jakým k tlumení transkripce dochází, prozatím nebyl plně objasněn (Bracha *et al.*, 2006). V buňkách nebyla nalezena žádná komplementární dsRNA, pouze větší množství jedno-vlákně RNA o délce cca 140 nukleotidů a sekvenčně homologní se SINE elementem (Mirelman *et al.*, 2006). Při inhibici transkripce dochází k neznámé modifikaci chromatinu, není to však metylace (Mirelman *et al.*, 2008).

Nebylo také objasněno, proč může být další inhibice dosaženo pouze u té linie *E. histolytica*, která již má takto umlčený gen pro amoebapore (G3 linie) (Mirelman *et al.*, 2008). U parentní linie entaméb zkoumaný plazmid, který zapříčiní transkripční umlčení genu u linie G3, způsobí pouze "overexpresi" daného genu (Mirelman *et al.*, 2008).



Obr. 20

Schéma vektoru pro transkripční inhibici a inhibovaného místa na chromosomu.

Inhibován je *ehlg1* gen, plazmid je zřúzovaný ze sekvence *ehlg1* genu a *ehap-a* UTR oblasti, která obsahuje SINE element (není znázorněn).

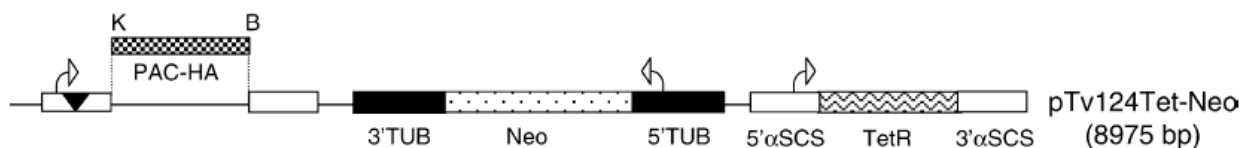
Vysvětlivky: Ehlg1 ORF, sekvence DNA kódující Ehlg1 protein; Ehlg1 je 5'UTR oblast *ehlg1* genu; Ehap-a, 5'UTR oblast *ehap-a* genu obsahující SINE. Převzato a upraveno (Bracha *et al.*, 2006).

2.11 Techniky umlčování genů u *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis je bičíkatý parazit, působící trichomonózu urogenitálního traktu člověka. Jedná se o nejčastější sexuálně přenosné onemocnění neviróvé povahy u člověka. U mužů je onemocnění většinou asymptomatické, u žen dochází k výraznějším zánětům vagíny. Akutní trichomonóza může později zapříčinit i předčasný porod. Osoby trpící trichomonózou jsou vnímavější k infekci virem HIV a snáze též nakazí partnera.

2.11.1 Transfekce a inducibilní systémy

U *T. vaginalis* se používá transientní a stabilní transfekce zaváděním cirkulárních plazmidů (Delgadillo *et al.*, 1997). Byl vyvinut i inducibilní systém založený na tet-represor/operátorovém mechanismu (Ortiz and Johnson, 2003) (obr. 21).



Obr. 21

Vektor pTv124Tet-Neo pro inducibilní transkripci u *T. vaginalis*.

Tento plazmid obsahuje neomycinfosfotransferázu (Neo), gen pro tetracyklinový represor (TetR) a gen pro puromycin-N-acetyltransferázu s hemaglutininovým značením, jehož α-SCS promotor (α-sukcinylCoAsyntetáza B) obsahuje sekvenci tetracyklinového operátoru znázorněnou černým klínkem.

Vysvětlivky: 5' a 3' TUB, tubulinový promotor a terminátor; 5' a 3' α-SCS, α-SCS promotor a terminátor. Převzato a upraveno (Ortiz and Johnson, 2003).

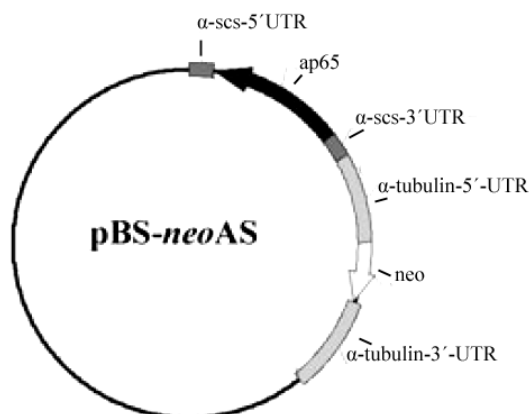
2.11.2 Úplná inhibice genů

T. vaginalis je haploidní organismus se 6 chromozomy (Zubacova *et al.*, 2008). Pomocí homologní rekombinace se podařilo deletovat gen pro [2Fe-2S] feredoxin (Land *et al.*, 2004). V tomto článku byla použita jednostupňová selekce. K výměně byl použit linearizovaný plazmid s konci komplementárními k UTR oblastem ferredoxinu. Mezi

komplementárními konci lineární DNA byl gen pro neomycinfosfotransferázu. Pomocí nothern a imunoblotu byla ověřena úspěšná delece genu. Tato delece však neukázala očekávanou změnu fenotypu u testovaných buněk, které byly i při absenci feredoxinu stále citlivé k metronidazolu. Proto autoři článku předpověděli pravděpodobnou existenci dalších v té době neznámých feredoxinů. Později bylo prokázáno, že feredoxinů je v buňce 7 (Carlton *et al.*, 2007). Genomový projekt odhalil velké množství kopií i u dalších genů (Carlton *et al.*, 2007). Tato skutečnost činí metody homologní rekombinace pro umlčování genů u tohoto organismu nepoužitelnými.

2.11.3 Antisense RNA a RNA interference

Snížení exprese proteinů pomocí produkce antisense RNA molekul bylo dokumentováno ve dvou studiích (Mundodi *et al.*, 2004; Mundodi *et al.*, 2007). V pracích je ukázáno snížení hladiny cílové mRNA i proteinu. Vznik siRNA molekul při inhibici ukázán nebyl. Konstrukt z práce Mundodi a kol. (2004) použitý pro inhibici je ukázán na obrázku 22.



Obr. 22

Vektor pro produkci antisense RNA pro ap65 u *T. vaginalis*.

Tento vektor obsahuje gen pro neomycinfosfotransferázu (neo), jejíž exprese je řízena z tubulinového promotoru, a gen pro ap65 v opačné orientaci, který je transkribovaný z α -SCS promotoru (α -sukcinylCoAsyntetáza B). 5' UTR značí promotor a 3' UTR značí terminátor. Převzato a upraveno (Mundodi *et al.*, 2004).

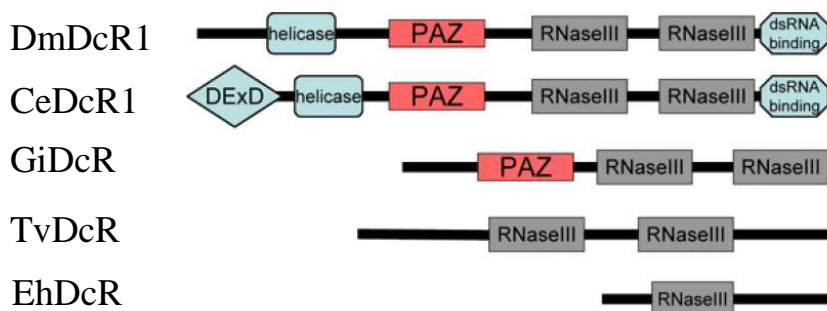
V práci Mundodi a kol. (2004) byl umlčen gen pro ap65-3 (přístupové číslo U35243), který má sekvenční identitu s jablečným enzymem, jenž se nachází v hydrogenozómu *T. vaginalis*. Jak je možné, že tento enzym slouží zároveň jako adhezín a zároveň jako dekarboxyláza, vysvětleno nebylo. Při inhibici poklesla jak dekarboxylázová aktivita tak adhezenční schopnost buněk.

U trichomonády byly nalezeny potenciální homology diceru a argonautu. Nalezené homology jsou srovnány s homology u jiných organismů na obrázku 23.

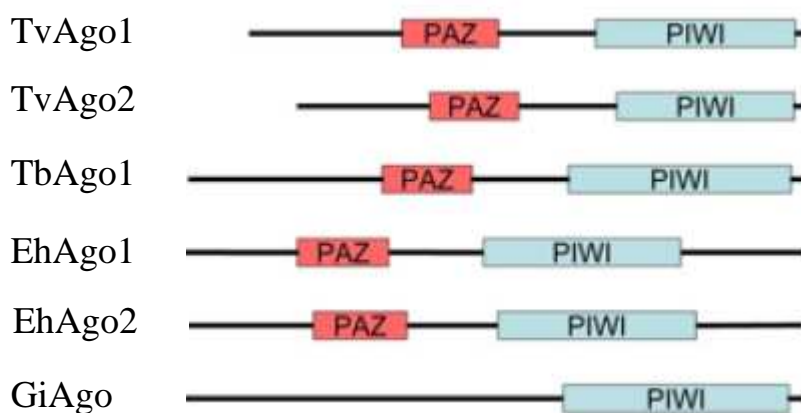
Inhibice genů pomocí RNA interference byla popsána v roce 2005. Do trichomonád byly dopraveny siRNA, které snížily hladinu mRNA peroxiredoxinu a thioredoxinreduktázy (Zhang *et al.*, 2005). Publikace je v čínštině, v angličtině je dostupný pouze abstrakt. Další práce o užití inhibice prostřednictvím RNA interference publikována nebyla.

Techniky reverzní genetiky jsou u *T. vaginalis* poměrně nevyvinuté a zatím nebylo navázáno na počáteční úspěchy s antisense RNA inhibicemi z let 2004 a 2007.

A.



B.



Obr. 23

Srovnání organizace domén potenciálních proteinů dicer a argonaut u *T. vaginalis* a jiných organismů.

A. Srovnání organizace domén u diceru. Dicer trichomonády se sice odlišuje absencí PAZ, helikázové, a dsRNA vázající domény, nicméně má typické eukaryotické uspořádání dvou “RNaseIII” domén. Vysvětlivky: DmDcR1, dicer *D. melanogaster*; CeDcR1, dicer *C. elegans*; GiDcR, dicer *G. intestinalis*; TvDcR, dicer *T. vaginalis* (přístupové číslo: TVAG_491480); EhDcR, dicer *E. histolytica*.

B. Srovnání organizace domén dvou potenciálních argonautů u *T. vaginalis* a jiných parazitických protistů. Oba nalezené argonauty trichomonády mají typickou organizaci PAZ a PIWI domény.

Vysvětlivky: TvAgo1 a TvAgo2, argonauty *T. vaginalis* (TVAG_463390, TVAG_419780); TbAgo1, argonaut *T. brucei*; EhAgo1 a EhAgo2, argonauty *E. histolytica*; GiAgo, argonaut *G. intestinalis*.

Převzato a upraveno (Carlton et al., 2007).

3 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo vyzkoušet techniky reverzní genetiky u *G. intestinalis*. K umlčení exprese byly vybrány geny kódující proteiny v mitosomech giardií.

Praktické cíle:

- 1) Pokusit se inhibovat mitosomální proteiny GiIscU a glutaredoxin 5 (GiGrx5) pomocí exprese antisense RNA molekul z plazmidů pINDG a pTG3039, které byly pro umlčování genů zkonstruovány v jiných laboratořích.
- 2) Připravit a otestovat plazmid, umožňující expresi antisense RNA molekul, které obsahují “hammerhead” ribozym.
- 3) Vytvořit plazmid pINDG_{tub} se silným inducibilním tubulinovým promotorem a vyzkoušet, zda je vhodný pro inhibici exprese GiIscU.
- 4) Pokusit se docílit inhibici exprese GiIscU pomocí exprese dsRNA.
- 5) Otestovat inhibici exprese genů pomocí antisense morpholinových oligonukleotidů.

4 Materiál a metody

4.1 Použité organismy

4.1.1 *Giardia intestinalis*

Pro veškeré pokusy byly použity trofozoiti *Giardia intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Gardie byly pěstovány v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s 10% hovězím sérem (Gibco) při 37 °C. V případě transfekovaných linií byly buňky kultivovány v médiu s příslušnými selekčními antibiotiky, puromycinem (PAA laboratories) o koncentraci 54 ug/ml a geneticinem G418 (PAA laboratories) o koncentraci 600 ug/ml. Pro indukci exprese byly některé linie kultivovány v médiu s tetracyklinem (Sigma Aldrich) o koncentraci 10 ug/ml. Pro kryoprezervaci experimentálních linií giardií byl použit roztok 5 % dimetylsulfoxidu (Merck) a linie byly uloženy v kapalném dusíku.

4.1.2 *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plazmidů byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 blue. Transformace buněk byla prováděna standardně tepelným šokem. Bakterie byly kultivovány v médiu LB s ampicilinem (100ug/ml) pro selekci pozitivních klonů.

4.2 Použitá média

- **Médium LB:** 10 g LB broth (Sigma Aldrich); dest. H₂O do 500 ml; pH = 7; sterilizovat v autoklávu 20 minut při 121 °C a tlaku 110 kPa.
- **Médium TYI-S-33 (Keister, 1983):** dest. H₂O 1740 ml; 2 g K₂HPO₄; 1,2 g KH₂PO₄; 4 g NaCl; 20 g glukóza p.a.; 20 g kvasničný extrakt; 40 g trypticase peptone (BBL); 4 g L- cystein; 0,4 g L- askorbová kyselina; 2 ml citrát železitoamonný; pH 6,8; poté přidat 200 ml inaktivovaného hovězího séra (bovine serum, Gibco) a 2 ml hovězí žluči; sterilizovat filtrací.

4.3 Pufry pro proteinovou elektroforézu (SDS-PAGE) a imunobloting

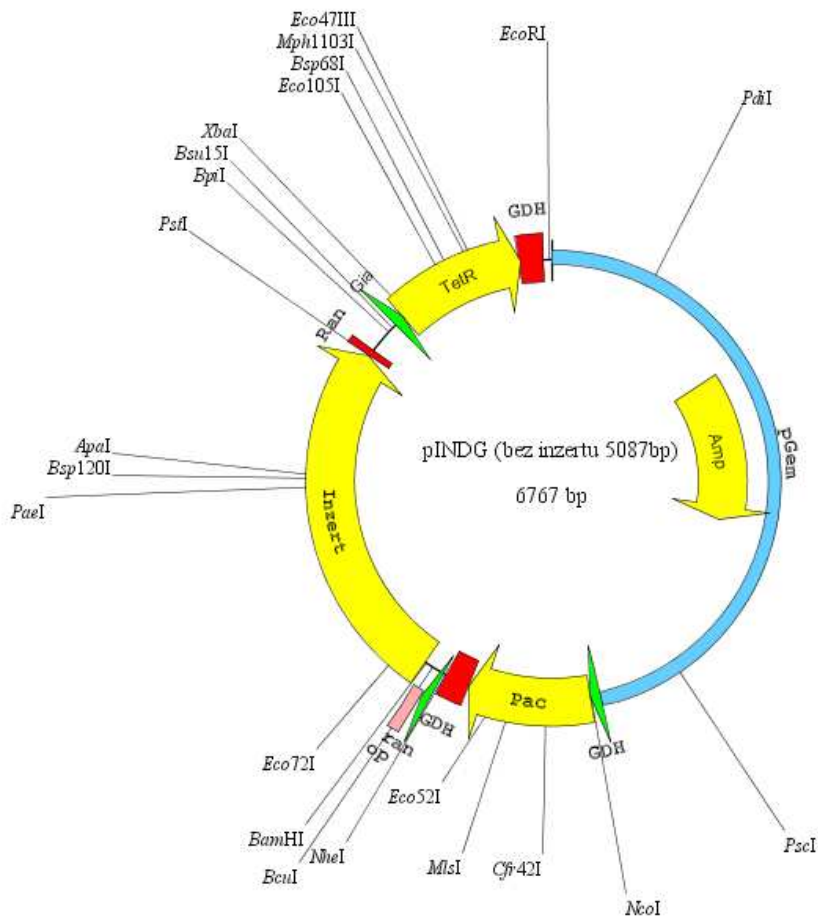
- **10 x SDS pufr:** glycin 144g; trizma base 30,3 g; SDS (dodecylsulfát sodný) 144 g; dest. H₂O do 1000 ml.
- **Roztok barvy Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB):** Dest. H₂O 225 ml; metanol 225 ml; Coomassie Brilliant Blue R 250 250 mg; kyselina octová 50 ml.
- **Odbarvovací roztok:** Dest. H₂O 650 ml; metanol 250 ml; kyselina octová 100 ml.
- **Roztok barvy Ponceau:** Ponceau S 0,5%; kyselina octová 1%.
- **C roztok na proteinovou elektroforézu:** trizma base 9,1 g; SDS 0,2 g; dest. H₂O do 100 ml, pH 8,8.
- **D roztok na proteinovou elektroforézu:** trizma base 3 g; SDS 0,2 g; dest. H₂O do 100 ml, pH 6,8.
- **G roztok na proteinovou elektroforézu:** persíran amonný 1g, dest. H₂O do 10 ml.
- **1x SDS vzorkovací pufr:** D roztok (bez SDS) 2,4 ml; 1% SDS v dest. H₂O 2ml; glycerol 1 ml, dest. H₂O 4 ml; roztok bromfenolové modři 0,1 ml; 2-merkaptioetanol 0,5 ml.
- **Blokovací pufr pro imunoblot:** nízkotučný sunar 10 g; PBS 100 ml; pH = 7,2.
- **Blotovací pufr pro imunoblot:** 10 x SDS pufr 50 ml; metanol 100 ml; dest. H₂O 350 ml.
- **Promývací pufr:** nízkotučný sunar 10 g; tween20 (0,5 %) 500 µl; PBS 100 ml; pH = 7,2.
- **Blokovací pufr pro fluorescenční preparáty:** BSA [Bovine serum albumin] 3 g; PBS 10 ml.
- **PBS:** NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,53 g; Dest. H₂O do 1000 ml; pH = 7,2.
- **Primární protilátky pro imunobloting a fluorescenci**
 - králíčí anti *Giardia intestinalis* GiIscU (1:1000)
 - králíčí anti *Giardia intestinalis* GiIscS (1:1000)
 - krysí anti *Giardia intestinalis* GiGrx5 (1:100)
 - myší monoklonální protilátka proti hemaglutininovému značení proteinů (1:250)
- **Sekundární protilátky pro imunobloting a fluorescenci**
 - protilátka proti králíčímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL) (1:1000)
 - protilátka proti krysímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL) (1:1000)
 - protilátka proti myšímu IgG, Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) (1:1000)

4.4 Použité plazmidy

Pro expresi antisense RNA molekul u *G. intestinalis* byly použity plazmidy pINDG (Touz *et al.*, 2005), pTG3039 (Lauwaet *et al.*, 2007) a mnou zkonstruovaný plazmid pINDGtub (mapa uvedena v kapitole 5.3.1.). Jako negativní kontrola byl v pokusech použit prázdný plazmid pTG3039nula, který byl zkonstruován z plazmidu pTG3039. V buněčném jádru se tyto cirkulární molekuly autonomně replikují. Pro naamplifikování GiIscU s hemaglutininovým značením (HA-značení) byl použit plazmid pONDRA_IscU_HA, který byl poskytnut Mgr. O. Šmídem (PřF UK) a pro naamplifikování sekvencí tubulinového terminátoru a promotoru byl použit plazmid pTubHApac (Touz *et al.*, 2002) (obr. 16 v kapitole 2.9.5), který byl poskytnut Prof. S. Svärдем (Uppsala University, Švédsko). Plazmid pONDRA_IscU_HA sloužil také k expresi HA-značeného GiIscU v linii buněk poskytnuté Mgr. O. Šmídem. Pro klonování fragmentů DNA byl použit plazmid pGEM-T Easy (Promega).

4.4.1 Expresní plazmid pINDG

Pro expresi antisense RNA molekul náležících mitosomálnímu proteinu GiIscU byl použit inducibilní plazmid pINDG (Touz *et al.*, 2005) (obr. 24), poskytnutý Prof. S. Svärдем. Obsahuje dvě tetracyklinové operátorové sekvence umístěné mezi *ran* promotorem a místem, kde začíná transkripce. Obsahuje také kazety pro expresi tetracyklinového represoru a puromycin-N-acetyltransferázy.



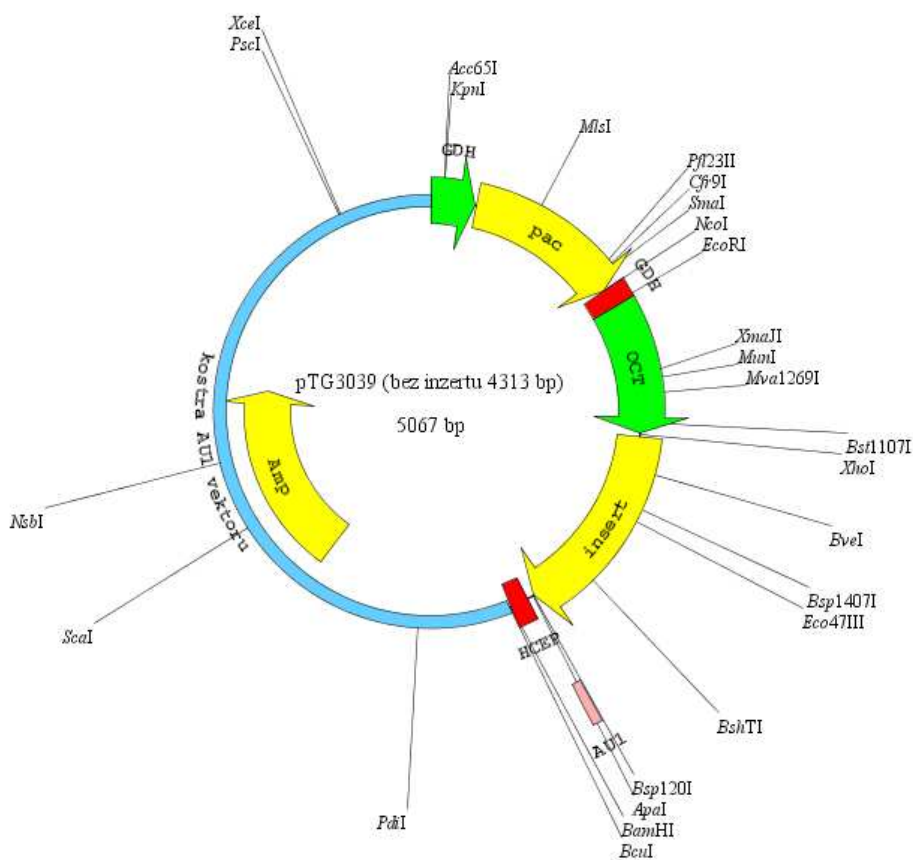
Obr. 24

Mapa plazmidu pINDG s vyznačením restričních enzymů.

Vysvětlivky: Amp, betalaktamáza; pac, puromycin-N-acetyltransferáza; TetR, tetracyklinový represor; GDH, terminátor glutamátdehydrogenázy; ran, *ran* promotor či terminátor; Gia, alfa-giardinový promotor; op, dva tetracyklinové operátory za sebou; invert, gen pro arginindiiminázu v antisense orientaci; pGem, sekvence odvozená z pGemu; Zeleně jsou označeny promotory, červeně terminátory; velikost plazmidu je uvedena v párech bází.

4.4.2 Expresní plazmid pTG3039

Plazmid pTG3039 (obr. 25), který byl poskytnut Prof. F. Gillinovou (University of California, San Diego, USA), byl použit pro expresi antisense RNA molekul za účelem inhibice proteinů GiIscU a GiGrx5. Expres antisense RNA molekul je v tomto plazmidu řízena nejsilnějším známým giardiovým promotorem (promotor pro ornitinkarbamoyl-transferázu).



Obr. 25

Mapa plazmidu pTG3039 s vyznačením restrikčních enzymů.

Vysvětlivky: Amp, betalaktamáza; pac, puromycin-N-acetyltransferáza; OCT, promotor pro ornitinkarbamoyltransferázu; GDH, terminátor či promotor glutamátdehydrogenázy; HCEP, terminátor pro “Highly conserved eukaryotic protein”; AUI, sekvence pro AUI značení proteinů na C konci; insert, gen pro Glucosamin-6-fosfátdeaminázu; Zeleně jsou označeny promotory, červeně terminátory; velikost plazmidu je uvedena v párech bází.

4.5 Amplifikace genů

4.5.1 Použité primery

Pomocí programu Primer Designer (verze 1.01) byly navrženy primery pro amplifikaci sekvencí mitosomálních genů pro protein GiIscU (přístupové číslo: XP_001708969) a GiGrx5 (glutaredoxin 5; XP_001709192.1) (Tab. 1). Primery pro protein GiPp2A (proteinfosfatáza 2A; XP_767901) byly převzaty z publikace (Lauwaet *et al.*, 2007). Pro vnesení ribozymů do antisense RNA sekvence *giiscu* byly navrženy mutační primery (Tab. 2). Primery pro tvorbu pINDGtub a prázdného vektoru pTG3039nula, který v diplomové práci slouží jako negativní kontrola, jsou uvedeny v tabulce 3. Do sekvence primerů byly ve většině případů přidány specifické sekvence pro restriktční enzymy. Konkrétní restriktázy jsou pak vyznačeny v tabulkách podtržením. Primery na detekci hladiny RNA molekul pomocí RT-PCR jsou uvedeny v tabulce 4.

Primery pro RT-PCR byly navrženy buď pomocí programu Primer Designer (verze 1.01) nebo byly použity online programy (Primer3Plus, www.bioinformatics.nl; NetPrimer, www.premierbiosoft.com). Primery pro detekci *gipp2a* byly přejaty z publikace Lauwaet a kol. (2007). Navrhování primerů se řídilo následujícími pravidly; dle (Bustin, 2000):

1. Musí se jednat o 20-mer.
2. TM [melting temperature] musí být v rozmezí 58-60 °C.
3. Poslední nukleotid na 3' konci musí být adenin nebo thymin.
4. V posledních pěti bázích na 3' konci mohou být maximálně 2 nukleotidy náležející guaninu nebo cytosinu.
5. V celém primeru nesmí být více jak 3 guaniny nebo cytosiny za sebou.
6. Výsledný produkt musí být dlouhý 70-250 bází.

Tab. 1: Primery použité pro amplifikaci genů, které byly následně vloženy v antisense orientaci do expresních plazmidů:

<i>giiscu</i> antisense do plazmidu pINDG _{tub} ; restrikční místa <i>Bam</i> HI a <i>Mph</i> 1103I	
Levý	5'- <u>GGATCCTCAAGAAGACTTTGATAC</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATGCATATGACAAGCCTTCAGCTC</u> -3'

<i>giiscu</i> antisense včetně 5'UTR do plazmidu pINDG; restrikční místa <i>Bam</i> HI a <i>Mph</i> 1103I	
Levý	5'- <u>GGATCCTCAAGAAGACTTTGATAC</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATGCATATGACTTCTGATGCCGCA</u> -3'

<i>giiscu</i> antisense do plazmidu pTG3039; restrikční místa <i>Apa</i> I a <i>Xho</i> I, tyto primery byly užity v kombinaci s primery v tabulce 2 pro tvorbu ribozymu v <i>giiscu</i> sekvenci	
Levý	5'- <u>ATACTCGAGGCTTTCTCTTGAGTCG</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATAGGGCCCATGACAAGCCTTCAGCTC</u> -3'

<i>giiscu</i> sense s HA-značením do plazmidu pINDG _{tub} ; restrikční místa <i>Bgl</i> II a <i>Mph</i> 1103I	
Levý	5'- <u>AGATCTATGACAAGCCTTCAGCTC</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATGCATCTCGAGTTAAGCGTAATC</u> -3'

<i>gigrx5</i> antisense do plazmidu pTG3039; restrikční místa <i>Apa</i> I a <i>Xho</i> I	
Levý	5'- <u>ATACTCGAGTTCCGCAGCTCTCCCGAC</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATAGGGCCCATGGACCAAATAAACGGG</u> -3'

<i>gipp2a</i> antisense do plazmidu pTG3039; restrikční místa <i>Apa</i> I a <i>Xho</i> I (sekvence primerů převzaty z publikace Lauwaet a kol., 2007)	
Levý	5'- <u>ATACTCGAGCTAAAGGAAGTAATCCGGAAC</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATAGGGCCCATGGGCATCAAGTCTTGCCTT</u> -3'

Tab. 2: Mutační primery použité pro vytvoření ribozymu:

Primery byly použity v kombinaci s primery z tabulky 1 (viz schéma tvorby ribozymu na obr. 26).

Mutační primery pro vytvoření <i>giiscu</i> antisense ribozymu	
Levý	5'- GATGAGTCCGTGAGGACGAAACGCGATAGCTGCGCCAC-3'
Pravý	5'- CGTCCTCACGGACTCATCAGTTCGAGCTACGCCACCTC-3'

Tab. 3: Primery použité pro vytvoření plazmidů pINDGtub a pTG3039nula:

tubulinový promotor, restrikční místa <i>Bgl</i> III	
Levý	5'- <u>AGATCT</u> GCTTCGCAGACGCATGAA-3'
Pravý	5'- <u>AGATCT</u> TTTTATTTCGCCCGTCC-3'

tubulinový terminátor; restrikční místa <i>Pst</i> I a <i>Cla</i> I	
Levý	5'- <u>CTGCAGAGTGAATTCTTTCCGTCG</u> -3'
Pravý	5'- <u>ATCGATAGGATGGACCAACGCCGT</u> -3'

primery pro vytvoření prázdného vektoru pTG3039nula, viz kapitola 4.5.3.	
Levý	5'- TCGAGAGATCTTGACTGACTGACATATGCTGCAGGGGCC -3'
Pravý	5'- CCTGCAGCATATGTCAGTCAGTCAAGATCTC -3'

Tab. 4: Primery použité pro RT-PCR detekci sense a antisense transkriptů:

beta-tubulin, detekce mRNA; (XP_001707372)	
Levý	5'- TCGTACTTCGTCGAGTGGAT -3'
Pravý	5'- GTGGAGTTTCCGATGAAGGT -3'

<i>gigrx5</i> , detekce antisense transkriptů z plazmidu pTG3039	
Levý	5'- CGCAGAGATAATGCCTAGTA -3'
Pravý	5'- CTAGATGTAGCGGTACGTGT -3'

<i>gipp2a</i> , detekce mRNA i antisense transkriptů z vektoru pTG3039	
Levý	5'- AGCAGTGCGTGACCATCTTCT -3'
Pravý	5'- TTGCCCCGCGGTTTC -3'

<i>gipp2a</i> , detekce mRNA	
Levý	5'- CATGGAACTGGACGAGAATA -3'
Pravý	5'- ATTGCTCTCAAGCGACTAAA -3'

<i>gipp2a</i> , detekce antisense transkriptů z plazmidu pTG3039	
Levý	5'- CATGAAAATCAAAAATGCTA -3'
Pravý	5'- CTAGATGTAGCGGTACGTGT -3'

<i>giiscu</i> , detekce mRNA v buňkách transfekovaných plazmidem pTG3039, detekce součtu mRNA a antisense RNA pro <i>giiscu</i> v buňkách transfekovaných plazmidem pINDGtub	
Levý	5'- ACCGATATAAGTGATAAGCT -3'
Pravý	5'- TTGATACCTGTATCTTGCTT -3'

<i>giiscu</i> , detekce mRNA v buňkách transfekovaných pINDGtub plazmidem	
Levý	5'- ACCGATATAAGTGATAAGCT -3'
Pravý	5'- AGCAGGAGGCAGCAGTATCA-3'

<i>giiscu</i> , detekce mRNA pro GiIscU s HA-značením exprimované z plazmidu pONDRA	
Levý	5'- ACCGATATAAGTGATAAGCT -3'
Pravý	5'- CATCGTATGGGTAGGATCCT-3'

<i>giiscu</i> , detekce antisense transkriptů z plazmidu pINDGtub	
Levý	5'- CTCGTCTGAACTGGTCTTCT -3'
Pravý	5'- AGAATTCCTCTGCATATGA -3'

<i>giiscu</i> , detekce antisense transkriptů z plazmidu pTG3039	
Levý	5'- CTCGTCTGAACTGGTCTTCT -3'
Pravý	5'- CTAGATGTAGCGGTACGTGT -3'

4.5.2 PCR

Amplifikace genů byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Množství použitých chemikálií je v tabulce 5 a počet a délka cyklů v tabulce 6. Geny byly amplifikovány z celkové genomové DNA, která byla izolována z buněk *G. intestinalis* pomocí “High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche). Sekvence tubulinového promotoru a terminátoru byly amplifikovány z plazmidu pTubHApac (Touz *et al.*, 2002) a sekvence GiIscU s HA-značením z plazmidu pONDRA_IscU_HA (viz kapitola 4.4).

Tab. 5: Složení PCR reakce (chemikálie fermentas):

Reagencie	Objem	Finální koncentrace
H ₂ O	12,2 ul	xxx
10x PCR Pufr -MgCl ₂	2 ul	1x
DTP	0,4 ul	0,2 mM
MgCl ₂	2 ul	0,625 mM
DNA	1 ul	~100ng
Primer 1	1 ul	10 uM
Primer 2	1 ul	10 uM
Taq/Pfu polymeráza	0,4 ul	0,05 U/ul

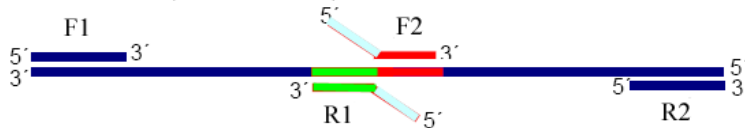
Tab. 6: PCR, počet a délka cyklů – program gradient

1	Denaturace	94 °C	5 min
2	Denaturace	94 °C	0,5 min
3	Nasedání primerů	60-45 °C *	0,5 min
4	Syntéza	72 °C	1 min
Krok č. 2 až 4			15x
5	Denaturace	94 °C	0,5 min
6	Nasedání primerů	45 °C	0,5 min
7	Syntéza	72 °C	1 min
Krok č. 5-7			20x
8	Syntéza	72 °C	7 min
9	Chlazení	15 °C	∞

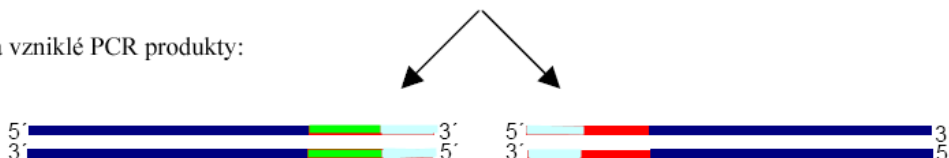
* V každém cyklu se teplota sníží o 1 °C

asociují komplementární úseky obou produktů (v části sekvence odpovídající ribozymu) a tím slouží jako primery pro syntézu komplementárních DNA řetězců.

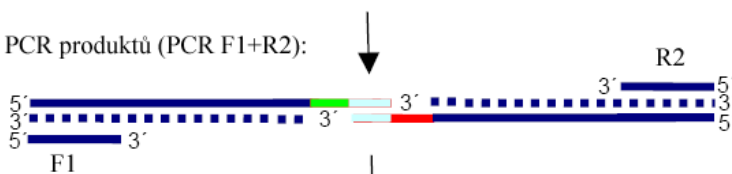
1. Dvě oddělené PCR reakce (F1+R1; F2+R2):



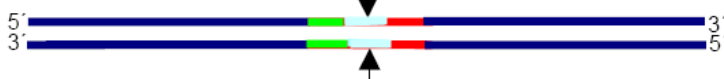
2. Dva vzniklé PCR produkty:



3. Sloučení obou PCR produktů (PCR F1+R2):



4. Výsledný PCR produkt s vneseným ribozymem:



Obr. 26

Základní schéma pro inzerci ribozymu do genu pro *güscu* metodou PCR.

Nejprve je potřeba připravit dvě oddělené PCR reakce s užitím F1+R1 a F2+R2 primerů a genomové DNA jako templátu (krok 1). Po přečištění sloučit oba produkty (krok 2) ve vhodném poměru a připravit další PCR reakci s F1 a R2 primery. V počátečních cyklech této PCR reakce asociují komplementární úseky obou produktů a tím slouží jako primery pro syntézu komplementárních DNA řetězců (krok 3).

Vysvětlivky: Sekvence ribozymu je znázorněna světle modře, části sekvence *güscu* jsou znázorněny červeně, zeleně a tmavě modře. Primery jsou znázorněny barvami dle sekvencí, ke kterým jsou komplementární. Schéma upraveno a převzato z diplomové práce P. Rady (PřF UK) z roku 2006.

4.6 Izolace a klonování DNA fragmentů

1. PCR produkty byly smíchány se vzorkovým pufrem (Fermentas) a analyzovány horizontální elektroforézou v 1 % agarózovém gelu a TAE pufru při napětí cca. 8V/ cm délky gelu. Nukleové kyseliny byly detekovány ethidium bromidem pomocí UV záření. Na extrakci DNA z agarózového gelu byl používán “Qiaquick Gel Extraction kit“ (Qiagen).
2. Vyizolované fragmenty byly nejprve zaklonovány do plazmidu pGem-T-easy (kit pGEM®-T-Easy Vectors System; Promega). Plazmidy byly poté z bakteriálních kultur izolovány komerčním kitem “QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen).
3. Zaligované fragmenty byly z plazmidu vyštěpeny dvojicí specifických restričních enzymů (Fermentas) podle doporučeného postupu a přečištěny přes agarózový gel.
4. Takto připravené fragmenty genů s kohezními konci byly vloženy do příslušných rozštěpených plazmidů. Ligační reakce s použitím T4 DNA ligázy (Fermentas) byla připravena podle doporučovaného postupu, přičemž množství plazmidu a fragmentu v reakci bylo přibližně v poměru 1:1 (určeno vizuálně na agarózové elektroforéze). Celá ligační reakce byla použita pro transformaci kompetentních bakterií XL1-blue tepelným šokem. Transformované bakterie byly vysety na agarózové plotny a kultivovány přes noc.
5. Z narostlých kolonií bylo 10 otestováno na přítomnost plazmidu s fragmentem. Test proběhl pomocí PCR z tepelně lyzovaných buněk za použití stejných podmínek jako při amplifikaci vloženého fragmentu. Přítomnost fragmentu byla determinována na agarózové elektroforéze. Pozitivní klony byly kultivovány a plazmidy byly vyizolovány kitem “QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen).
6. Kontrola mutací a správného vložení fragmentů do plazmidů byla provedena sekvenací.
7. Ověřené klony bakterií (jeden od každé varianty klonovaného fragmentu) byly napěstovány ve 100 ml LB média s ampicilinem a plazmidy z nich byly vyizolovány kitem “Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System“ (Promega).
8. Koncentrace plazmidu pro použití při elektroporaci byla stanovena na přístroji NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.
9. Alternativně byly PCR produkty po vyizolování z gelu přímo štěpeny pomocí restriktáz, znova přečištěny přes agarózový gel a poté ligovány přímo do expresních vektorů.
10. Pro klonování fragmentů s identickými restričními místy na obou koncích byly konce těchto fragmentů defosforylovány pomocí “Calf intestinal alkaline phosphatase“ (Fermentas), reakce byla namíchána dle doporučeného postupu.

4.7 Analýza RNA

4.7.1 Izolace RNA z buněk *G. intestinalis*

Celková RNA byla z buněk izolována TRIZOLEm (Total RNA Isolation Reagent, Gibco BRL).

Postup:

1. K 1×10^8 buňkám nalít sterilní vychalzený PBS a nechat stát na ledu cca 30 min. Při chlazení se přisedlé giardie odpoutají od stěn kultivační nádoby.
2. Buňky poté centrifugovat při $1000 \times g / 15 \text{ min.} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pelet buněk převést do sterilní DEPC ependorfové zkumavky (sterilizované v autoklávu 20 minut při $121 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku 110 kPa za přítomnosti malého množství H_2O s rozpuštěným diethyl pyrocarbonátem).
3. Pelet resuspendovat v 1 ml Triazol Reagent a nechat směs inkubovat 5 min. při laboratorní teplotě.
4. Do reakce přidat 200 μl chloroformu, směs promíchat otáčením v ruce a inkubovat 3 min. při laboratorní teplotě.
5. Směs centrifugovat při $11\,500 \times g / 15 \text{ min.} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Při centrifugaci se oddělí spodní červená fáze (DNA a proteiny), interfáze a vrchní bezbarvá vodní fáze (RNA).
6. Vrchní bezbarvou fází s RNA opatrně přenést do DEPC ependorfové zkumavky, poté přidat 0,5 ml izopropanolu a promíchat. Směs inkubovat 10 min. při laboratorní teplotě.
7. Poté centrifugovat při $11\,500 \times g / 15 \text{ min.} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$. RNA precipitát vytvořil pelet na dně.
8. Supernatant opatrně odsát a pelet promýt 1 ml 75% etanolu. Vortexováním pelet rozmíchat.
9. Centrifugovat při $7\,500 \times g / 5 \text{ min.} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$.
10. Etanol opatrně odsát, pelet usušit na vzduchu 30 min. a rozpustit ve 30 – 50 μl vody bez RNáz (“RNase free water“, součást kitu Nucleospin RNA II; Macherey Nagel). Při rozpouštění byla RNA inkubována 10 min. při $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté byl odebrán vzorek 1 pro kontrolu na PCR.

Vzorek RNA je ovšem znečištěný DNA, kterou je nutné odstranit následujícím postupem:

1. Do DEPC ependorfové zkumavky namíchat následující složky (na 10 μ l reakci, chemikálie Fermentas):
RNA 1 μ g
10 x reakční pufr + MgCl₂ 1 μ l
DNase I (RNase-free, 1 U/ μ l) 1 μ l
voda bez RNás do 10 μ l
2. Směs inkubovat 1 hod. při 37 °C.
3. Do reakce přidat 1 μ l 25mM EDTA a směs inkubovat 10 min. při 65 °C.
4. Poté odebrat vzorek 2 pro kontrolu na PCR.
5. Čistotu RNA ověřit pomocí PCR a specifických primerů pro *giscu* se vzorky 1 a 2 z předchozích odběrů. U vzorku čisté RNA na DNA elektroforéze nesmí být žádný signál.

Alternativně byla RNA izolována kitem Nucleospin RNA II (Macherey Nagel).

4.7.2 Příprava cDNA *G. intestinalis*

cDNA byla připravena reverzní transkripcí vyizolované RNA (podle výše uvedeného postupu) pomocí kitu “SuperScript II Revers Transcriptase Kit“ (Invitrogen).

4.7.3 Real Time PCR (RT-PCR)

Pro RT-PCR byl použit “IQ Sybr Green Supermix“ (Biorad). Reakce probíhala na přístroji Light Cycler 480 (Roche). Příprava reakční směsi a podmínky RT-PCR jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Výsledná koncentrace mRNA se potom stanovovala metodou $\Delta\Delta$ CT [cycle threshold] dle (Livak and Schmittgen, 2001). Kupříkladu výpočet hladiny mRNA pro *gipp2a* v linii buněk produkujících antisense RNA pro *gipp2a* (linie buněk je značena pp2A-as) byl proveden takto:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{gipp2a} - CT_{tubulin})_{pp2A-as} - (CT_{gipp2a} - CT_{tubulin})_{wt}$$

$2^{\Delta\Delta CT}$ = rozdíl hladiny mRNA pro *gipp2a* u linie pp2A-as a netransfekovaných buněk (wt).

Spodní indexy v rovnici značí značí mRNA genů (*gipp2a* a tubulin) a linii buněk (pp2A-as a wt).

Tab. 7: Reakční směs pro RT- PCR

Reagencie	Objem	Finální koncentrace
H ₂ O	3,8 ul	xxx
Sybr green	5 ul	1x
cDNA	0,4 ul	xxx
Primer 1	0,4 ul	10 uM
Primer 2	0,4 ul	10 uM

Tab. 8: Schéma RT- PCR reakce

1	Denaturace	95 °C	10 min
2	Denaturace	95 °C	10 s
3	Nasedání primerů	59 °C	12 s
4	Syntéza	72 °C	30 s
Krok č. 2 až 4			50x
5	“Melting“ analýza	97 °C	10 s
6		65 °C	1 min
7		65-97 °C *	5 min
8	Ochlazení	40 °C	10 s

* Teplota stoupá z 65 °C na 97 °C rychlostí 0,1 °C/s.

4.8 Analýza proteinů

4.8.1 Podmínky polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE)

Proteiny byly děleny za denaturujících podmínek na základě molekulových hmotností elektroforézou ve vertikálním 12% nebo 13,5% polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem

sodným. Složky gelu jsou uvedeny v tabulce 9. Před nanesením na elektroforézu byly vzorky nejdříve rozmíchány ve vzorkovém pufru a denaturovány po dobu 5 min. při 100 °C. Pro určení relativní molekulové hmotnosti byl použit standard Sigma VII-L (Sigma Aldrich), nebo předbarvený standard Pageruller (Fermentas). Po elektroforéze byly proteiny detekovány obarvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R a odbarvením v odbarvovacím roztoku.

Tab. 9 Složky polyakrylamidového gelu (příprava roztoků A, C, D a G je uvedena v kap. 4.3.)

Reagencie	12% gel	13,5% gel	Zaostřovací gel
Akrylamid (ml) *	2	2,25	0,4
C roztok (ml)	2,5	2,5	1,25 (roztoku D)
H ₂ O (ml)	0,4	0,25	0,8
Temed (ul) **	5	5	5
G roztok (ul)	50	50	25

* Akrylamid..... 30% Acrylamide/Bis Solution (Biorad)

** Temed..... NNNN-tetra methylethylen diamine (Sigma Aldrich)

4.8.2 Imunobloting (Western blot)

Postup:

1. Po proteinové elektroforéze za denaturujících podmínek změřit velikost gelu a nastříhat 6 filtračních papírů a nitroceluózovou membránu o přesně stejné velikosti.
2. Nitroceluózovou membránu ponořit na 5 min. do dest. H₂O a potom společně s filtračními papíry ponořit na 5 min. do blotovacího pufru.
3. Nitroceluózovou membránu a filtrační papíry společně s gelem navrstvit do polosuchého blotu (Biorad) v pořadí 3 filtrační papíry, nitrocelulózová membrána, gel, 3 filtrační papíry.
4. Blotovat v přístroji pro polosuché blotování při proudu 1,5 mA/cm² 1 hod. Přeblotování proteinů ověřit promytím membrány v roztoku ponceau S.
5. Po promytí v dest. H₂O lze membránu skladovat při 4 °C před dalším zpracováním.

4.8.3 Detekce proteinů na nitrocelulóзовé membráně

Postup:

1. Nitrocelulóзовou membránu inkubovat s přebílotovanými proteiny v blokovacím pufru přes noc při 4 °C.
2. Membránu inkubovat s primární protilátkou v blokovacím pufru po dobu 2 hod. při laboratorní teplotě. Protilátku ředit v poměru 1:100 - 1:1000 dle užití primární protilátky (viz kap.4.3.).
3. Membránu promýt 3 x 20 min. promývacím pufrům při laboratorní teplotě.
4. Membránu inkubovat se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000) v blokovacím pufru po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě.
5. Membránu promýt 2 x 20 min. promývacím pufrům bez nízkotučného sunaru při laboratorní teplotě.
6. Membránu promýt po dobu 20 min. PBS pufrům. Membránu inkubovat se substrátem pro alkalickou fosfatázu BCIP/NBT (BCIP, 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indol fosfát; NBT, nitro-blue tetrazolium chlorid; od firmy Sigma Aldrich).

4.9 Pokusy s morpholinovými oligonukleotidy (MO)

4.9.1 Přehled použitých morpholinových a DNA oligonukleotidů

Pro pokusy byly použity standardní kontrolní MO s náhodnou sekvencí, které mají připojený FITC (fluorescein isothiokyanát) na 3' konci (Gene tools LC). Ty byly používány pro určení úspěšnosti doručení MO do buněk. Pro samotnou inhibici mitosomálních genů *gigrx5* (glutaredoxinu 5; přístupové číslo XP_001709192.1) a *giiscs* (cysteinsulfotransferáza; AAK39427) byly navrženy MO bez fluoresceinu, které byly zacíleny na počátek translace genů (viz kapitola 5.5.3. obrázek 44 A).

DNA oligonukleotidy byly navrženy dle článku (Morcos, 2001). Komplementární část s MO má být dlouhá okolo 16 nukleotidů a T_m má být okolo 37 °C. Sekvence MO a komplementárních DNA nukleotidů jsou uvedeny v tabulce 10. Schéma vzniklých duplexů je na obrázku 44 B v kapitole 5.5.3. Před elektroporací se DNA oligonukleotidy smísí s MO ve vhodném poměru (25 ul 1mM MO se smísí s 25 ul 700uM DNA oligonukleotidů).

Tab. 10: Sekvence morpholinových a k nim komplementárních DNA oligonukleotidů (F* znázorňuje FITC značení)

Cílový gen	MO	DNA komplementární oligonukleotidy
Náhodný oligonukleotid	5'- CCTCTTACCTCAGTTACA ATTTATA –F* -3'	5'- AAAAAAAAAAATATAAATTG TAACTGA -3'
<i>giiscs</i>	5'- TTGTCCAGGTAAATCAT TAAAAAAT -3'	5'- AAAAAAAAAAATTTTTTAAT GATTTAC -3'
<i>gigrx5</i>	5'- AAAGCCCCCGTTTATTT GGTCCAT -3'	5'- AAAAAAAAAAATGGACCAA ATAAA -3'

4.9.2 Pokusy s doručením morpholinových oligonukleotidů pomocí reagentie Endo-porter

Endo-porter (Summerton, 2005) je amfipatická molekula, která v acidifikovaných endozómech vytvoří póry a umožní morpholinovým oligonukleotidům dostat se do cytosolu buňky. Endo-porter (Gene tools LC) byl dodán ve 100% dimetyl sulfoxidu. Buňky byly inkubovány v médiu s přidávanými morpholinovými oligonukleotidy o koncentraci 2 uM a reagentií Endo-porter o koncentracích 0, 2, 4 nebo 6 uM. Po inkubaci byly buňky promyty PBS pufrem, přeneseny na sklíčko a ihned mikroskopovány.

4.9.3 Elektroporace morpholinových oligonukleotidů

Elektroporace MO je popsána v kapitole 5.5.2. 2 hodiny po elektroporaci bylo od přisedlých buněk odebráno médium a nahrazeno čerstvým. Buňky ve zkumavkách poté byly zchlazeny na ledu (touto procedurou se odpoutají od stěn zkumavek) a i s médiem rozplněny do kultivačních zkumavek pro odběry po 24, 48 a 72 hodinách.

MO v 1mM koncentraci byly před použitím inkubovány 5 min. při 65 °C pro jejich lepší rozpuštění ve vodě (doporučený protokol, Gene Tools LC).

4.9.4 Fluorescenční mikroskopie

Doručení morpholinových oligonukleotidů lze sledovat pouze u živých buněk. Buňky byly před pozorováním promyty v PBS (pro odmytí MO), nanесeny na podložní sklíčko a přikryty krycím sklíčkem, které bylo zafixováno lakem na nehty. Buňky byly ihned pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81. Obraz byl zaznamenáván digitální kamerou Hamamatsu Orca-AG za použití programu cell[^]R imaging.

4.10 Transfekce buněk *G. intestinalis*

Postup:

1. Buňky odpoutat od stěn kultivační nádoby pomocí výměny média za ledový sterilní PBS pufr a následného chlazení na ledu po dobu 30 min. Suspenzi buněk poté centrifugovat při 1000 x g / 10 min. / 4 °C.
2. Pelet buněk rozsuspendovat v médiu TYI-S-33 a vzniklou suspenzi buněk opět centrifugovat při 1000 x g / 10 min. / 4 °C.
3. Pelet rozsuspendovat v 1 ml média. Spočítat koncentraci buněk a posléze buňky naředit pomocí přidání dalšího média na koncentraci $3,33 \times 10^7$ buněk/ml.
4. Suspenzi buněk protáhnout jehlou G23, aby se rozrušily shluky buněk giardií.
5. Odebrat 300 μ l suspenze do 4 mm elektroporační kyvety (4 milimetry široký sloupec elektroporované suspenze).
6. Přidat 50 μ l plazmidu (o koncentraci ~ 1000 ng/ μ l), kyvety poté nechat stát 5 min. na ledu.
7. Elektroporovat při 350 V, 1000 μ F, 750 Ω ; přístroj Gene Pulser Xcell (Bio-Rad).
8. Po elektroporaci nechat kyvety 10 min. na ledu, poté přenést buňky z kyvet do 15ml kultivačních zkumavek s médiem TYI-S-33 bez selekčních antibiotik.
9. Za 24 hod. od buněk odebrat médium a přidat médium s puromycinem (PAA laboratories) o koncentraci 54 μ g/ml. Médium poté vyměňovat v intervalu 3 dny. Po dvou týdnech je možné začít buňky normálně očkovat.

4.10.1 Klonování transfekovaných giardií

Buňky v médiu naředit a rozpíjetovat na 96-jamkovou destičku tak, aby pravděpodobnost, že v jedné jamce bude 1 buňka byla přibližně 10%. Poté buňky kultivovat cca 1 týden v prostředí bez kyslíku pomocí Oxoid anaerogen systém (Oxoid).

4.11 Imunolokalizace HA-značeného GiIscU v buňkách *G. intestinalis*

Postup:

1. Narostlou kulturu giardií nechat přilnout na podložní skla v inkubační komůrce při 37 °C po dobu 15 min.
2. Buňky fixovat ve vychlazeném metanolu 5 min. a potom permeabilizovat 5 min. ve vychlazeném acetonu.
3. Preparáty nechat uschnout.
4. Preparáty blokovat v blokovacím pufru 1 hod. ve vlhké komůrce.
5. Inkubovat v blokovacím pufru s primární myší monoklonální protilátkou proti hemaglutininovému značení proteinů 1 hod. ve vlhké komůrce, protilátku ředit 1:250.
6. Preparáty promýt 3 x 5 min. v PBS.
7. Inkubovat v blokovacím pufru se sekundární protilátkou ALEXA FLUOR 488 proti myší protilátce 1 hod. ve vlhké komůrce. Protilátku ředit 1:1000.
8. Preparáty promýt 3 x 5 min. v PBS.
9. Preparáty zalít médiem Vecta-shield s DAPI pro značení jaderné DNA (Vector laboratories).
10. Mikroskopovat pod fluorescenčním mikroskopem.

5 Výsledky

5.1 Testování plazmidů pINDG a pTG3039

5.1.1 Testování plazmidu pINDG pro umlčování genu kódujícího GiIscU

Plazmid pINDG byl štěpen restriktázami *Bam*HI a *Pst*I. Do tohoto plazmidu jsem vložil gen pro *giiscu* v antisense orientaci. Antisense RNA jsem navrhl tak, aby byla komplementární i s nepřekládanou oblastí na cílené mRNA (obr. 27). Tento konstrukt byl elektroporací vpraven do buněk a buňky byly selektovány 3 týdny puromycinem (54 mg/ml). Tuto polyklonální kulturu buněk jsem naklonoval a odvodil od ní 4 klonální linie, protože v polyklonální kultuře by některé buňky mohly vykazovat různou míru inhibice GiIscU a přitom by to nemuselo být patrné na imunoblotu. K ustáleně rostoucím kulturám giardií jsem poté přidal tetracyklin. Buňky rostly v médiu s tetracyklinem po dobu 48 hodin a poté v nich byla detekována hladina proteinu GiIscU metodou imunoblotu. Výrazné snížení exprese GiIscU u polyklonální linie ani u klonálních linií však pozorováno nebylo (obr. 28). Na imunoblotu je patrný dvojitý signál, který odpovídá proteinu GiIscU. Patrně se jedná o procesovanou a neprocesovanou formu GiIscU (Dolezal et al., 2005).

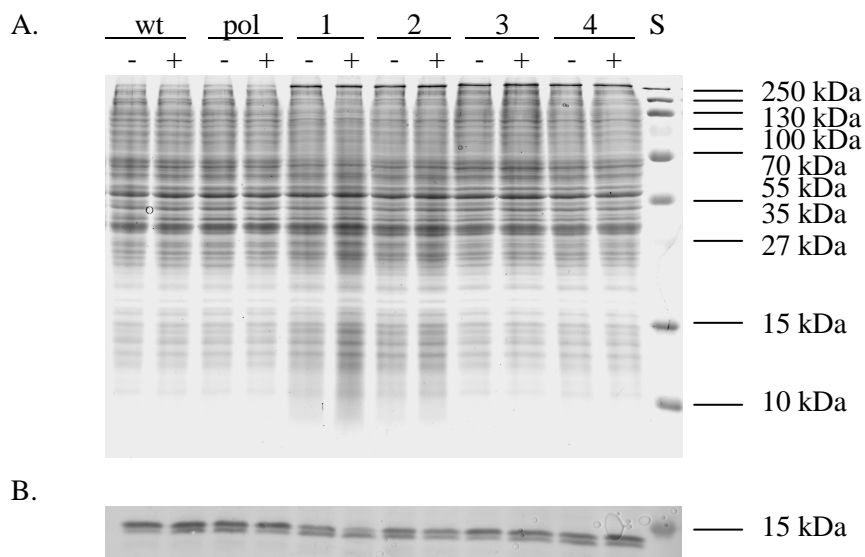
5´ -

```
ATGACTTCTGATGCCGCAGATATGAAATGGGAGGACTTTCATCACTGGTATGGTCAGATTACAGTCAGGAATAC
GTTTCAGGCGTTTACACGGAATGGTGCTTACCCGACCTCAAACCTCGTGGTTCATAACATCAGCCATAAATTCTAAT
TTAATGACAAGCCTTCAGCTCTCTAGCACTTCCCTTTTGCAGTCTGTTGCACGCTTCCTCACAAAGAAGACCAGT
TCAGACGAGGTTTATTCTGAGCTAGCCATGCAGCATTACCCGACGCCGGTTAACATAGGGACCCTTGATGACGAT
GACGAACATGTCGGCTCCGGTCTAGTCGGCGCGCCTGCCTGTGGTGATGTTATGCGCCTTCAGATCAAGGTCGGG
GACGATGGTAAGATTTTCGGAAGCCAAGTTCAAGACATTTGGATGTGGCGCAGCTATCGCGTCTTCGAGCTACGCC
ACCTCTCTTCTCCAAGGCAAGAGTTTGGAAAGAGGCCTCTCAGATCAAGAATACCGATATAAGTGATAAGCTCGGT
CTCCCTCTGTCAAGCTACTGCAGCGTTCTGGCGGAGGACGCCATCAGACAAGCTATAGACGACTACAAGAGA
AAGCGGGGAAGCAAGATACAGGTATCAAAGTCTTCTTGA -3´
```

Obr. 27

Sekvence genu *giiscu* i s nepřekládanou oblastí. Tato sekvence byla zaklonována do vektoru pINDG.

Modře je vyznačena překládaná oblast genu *giiscu* a červeně je vyznačen počátek translace. Zeleně je vyznačena nepřekládaná oblast, která je součástí *giiscu* v antisense orientaci, vloženého do vektoru pINDG.



Obr. 28

Analýza hladiny proteinu GiIscU pomocí imunoblotu u buněk produkujících antisense *giiscu* RNA z plazmidu pINDG.

A. Elektroforéza (SDS-PAGE) ukazující vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu transfekovaných giardií.

B. Imunoblot ukazující nezměněnou expresi proteinu GiIscU.

Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; pol, polyklonální linie; 1,2,3,4, čtyři klonální linie; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu; S, standard molekulových hmotností. Tento pokus byl proveden v biologickém duplikátu, data z druhé paralely nejsou ukázána.

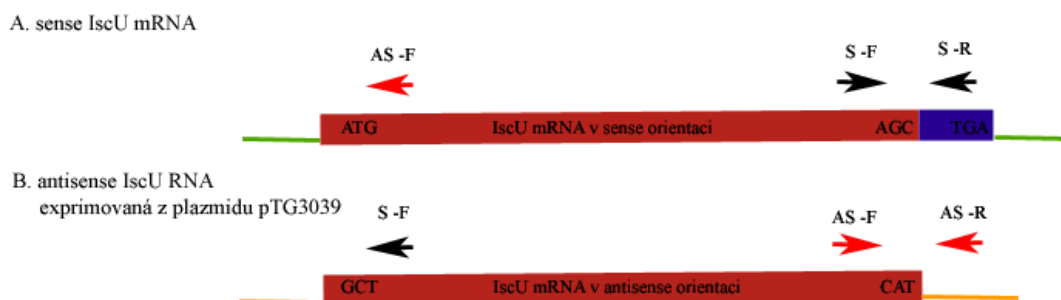
5.2 Testování plazmidu pTG3039 pro umlčování genů kódujících GiIscU a GiGrx5

5.2.1 Konstrukce plazmidů pro produkci konkrétních antisense RNA molekul

Do plazmidu pTG3039 byly v antisense orientaci zaklonovány DNA fragmenty náležící proteinu GiIscU a proteinu GiGrx5. GiPp2A byla použita jako pozitivní kontrola. Lauwaet a kol. (2007) totiž publikovali inhibici tohoto proteinu použitím identického

plazmidu (pTG3039). Pro vložení tohoto genu v antisense orientaci do plazmidu jsem užil stejných primerů jako ve zmíněné publikaci.

Antisense vlákna odpovídající *giiscu* a *gigrx5* byla zkrácena o přibližně 20 nukleotidů dlouhé části oproti sense vláknům (viz primery uvedené v kapitole 4.5.1). Tato část odpovídá posledním 20 nukleotidům na sense mRNA molekulách. Díky této úpravě jsem poté mohl pomocí RT-PCR snadno odlišit sense a antisense RNA vlákno (obr. 29). Gen pro *gipp2a* byl ale v antisense orientaci vložen celý, aby se přesně zopakoval postup z publikace.



Obr. 29

Schéma RT-PCR detekce přirozené mRNA pro *giiscu* a antisense RNA pro *giiscu*, která je exprimována z plazmidu pTG3039.

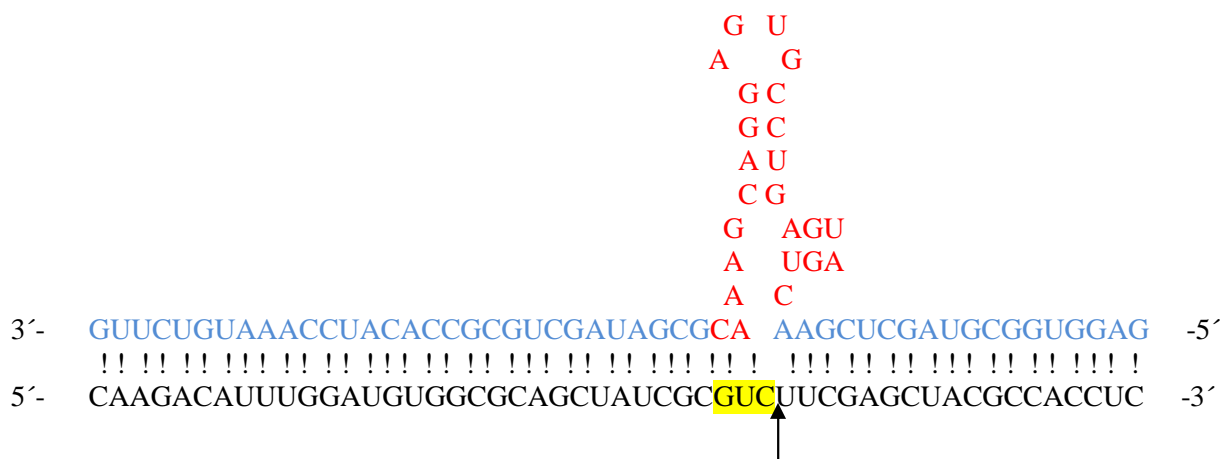
A) Schéma mRNA pro *giiscu*. Černě jsou znázorněny primery S-F a S-R, které jsou zacíleny do překládané oblasti mRNA molekuly. Část této oblasti se na antisense RNA molekule nevyskytuje. Pro názornost je na schématu znázorněn i primer AS-F v místě, kde sekvenčně odpovídá mRNA molekule.

B) Schéma antisense RNA molekuly pro *giiscu*. Červeně jsou znázorněny primery AS-F a AS-R, které jsou zacíleny do oblasti, která odpovídá překládané části *giiscu* mRNA a do oblasti odvozené od vektoru pTG3039. Tato část se na mRNA molekule nevyskytuje.

Vysvětlivky: Tmavě červeně je vyznačena část společná sense i antisense RNA molekule. Modře je vyznačena cca 20 nukleotidů dlouhá část sense *giiscu* mRNA, která se na antisense RNA molekule nevyskytuje. Zeleně jsou vyznačeny nepřekládané oblasti na sense mRNA molekule. Žlutě jsou vyznačeny části na antisense RNA molekule odvozené od sekvence plazmidu, které se nevyskytují na sense mRNA molekule.

Od plazmidu pTG3039 jsem odvodil “prázdný“ plazmid nazvaný pTG3039nula, který neobsahuje žádný vložený gen. Na místo inzertu je vložena pouze krátká sekvence obsahující stop kodóny ve všech třech čtecích rámcích. Tento plazmid byl použit jako negativní kontrola.

Pomocí mutačních primerů byl připraven ribozym přibližně uprostřed antisense RNA náležící *giiscu* a zaklonován do vektoru pTG3039. Byl použit identický ribozym jako v publikacích popisujících inhibici pomocí giardiaviru (Dan *et al.*, 2000), který byl dle publikace zacílen do místa v mRNA sekvenci, kde jsou vedle sebe guanin, uracil a cytosin. V tomto místě je pak inhibovaná mRNA štěpena. Schéma konkrétního ribozymu, který jsem použil v této diplomové práci, je na obr. 30. Pro zjednodušení není uvedena celá sekvence náležící *giiscu* a také není uvedena celá k ní komplementární část antisense RNA ramen ribozymu. Po přepisu do RNA by měl mít “hammerhead“ ribozym schopnost štěpit mRNA molekuly se sekvencí komplementární k antisense RNA ramenům, která ribozym obklopují (Dan *et al.*, 2000).



Obr. 30

Schéma ribozymu v antisense RNA molekule, který byl zkonstruován pro inhibici *giiscu*.

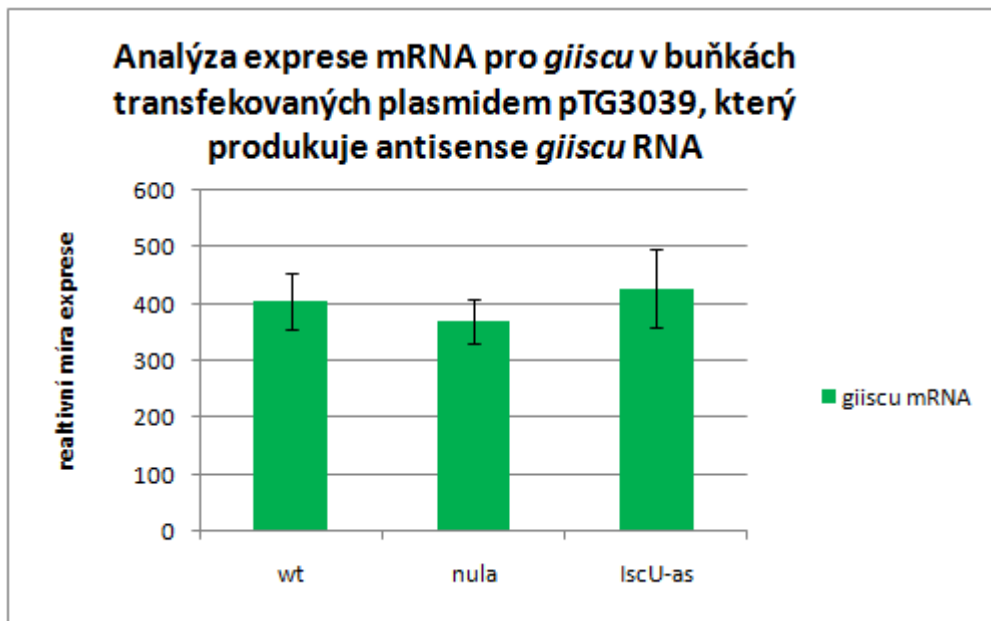
Červeně je znázorněna sekvence ribozymu, části antisense RNA ramen komplementární k *giiscu* jsou znázorněny modře. Černě je znázorněna část mRNA náležící *giiscu*. Žlutě je vyznačena trojice guanin uracil a cytosin, což je místo, za kterým dochází ke štěpení (vyznačeno šipkou).

5.2.2 Exprese antisense RNA molekul v liniích s pTG3039 plazmidy a vliv na expresi *giiscu* a *gigrx5*

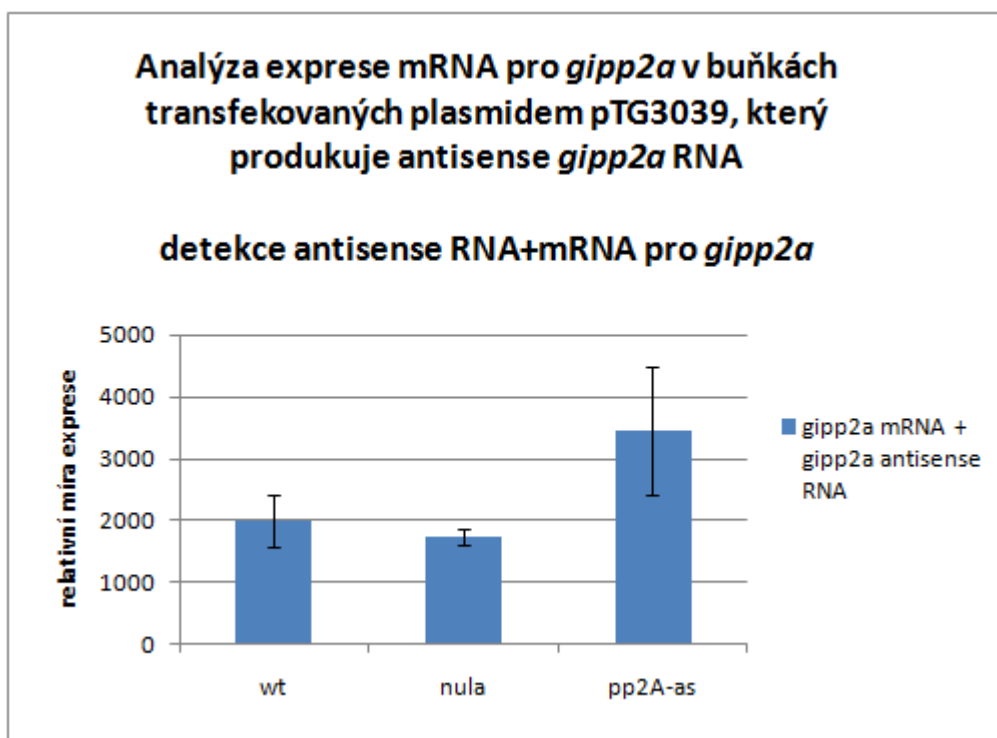
Zmíněné konstrukty byly transfekovány do buněk a selektovány dva týdny puromycinem. Vzniklé linie buněk jsem nazval Grx5-as (*gigrx5* antisense), pp2A-as (*gipp2a* antisense), IscU-as (*giiscu* antisense), IscU-rib (*giiscu* antisense s vloženým ribozymem) a Nula (prázdný vektor).

Úspěšná exprese antisense RNA molekul z linií IscU-as, IscU-rib, Grx5-as a pp2A-as byla potvrzena pomocí RT-PCR (data nejsou ukázána). Pomocí RT-PCR byla rovněž zjišťována případná změna hladiny mRNA molekul náležících *giiscu* a *gipp2a* (obr. 31). Hladina *giiscu* mRNA se u buněk produkujících *giiscu* antisense nemění (obr. 31 A). Exprese *gipp2a* mRNA v buňkách byla zjišťována pomocí dvojice primerů identických jako v publikaci Lauwaet a kol. (2007). Tato dvojice primerů však nedokáže rozlišovat mezi sense a antisense RNA vláknem (sekvence rozeznávané primery jsou na sense i antisense RNA molekule). Proto byla pro detekci použita i druhá dvojice primerů, která rozeznává pouze sense mRNA vlákno (jeden z primerů totiž rozeznává 3' UTR oblast unikátní pro mRNA molekulu). U buněk, které mají produkovat antisense *gipp2a* RNA, ukázala první dvojice primerů zvýšenou hladinu *gipp2a* RNA, což opět naznačilo úspěšnou expresi antisense RNA molekul v této transfekované linii buněk. Mnou navržená dvojice primerů, která měří pouze sense mRNA vlákno, ukázala, že se v pp2A-as linii buněk *gipp2a* mRNA snižuje, a to o 39 ±30 % oproti netransfekovaným buňkám.

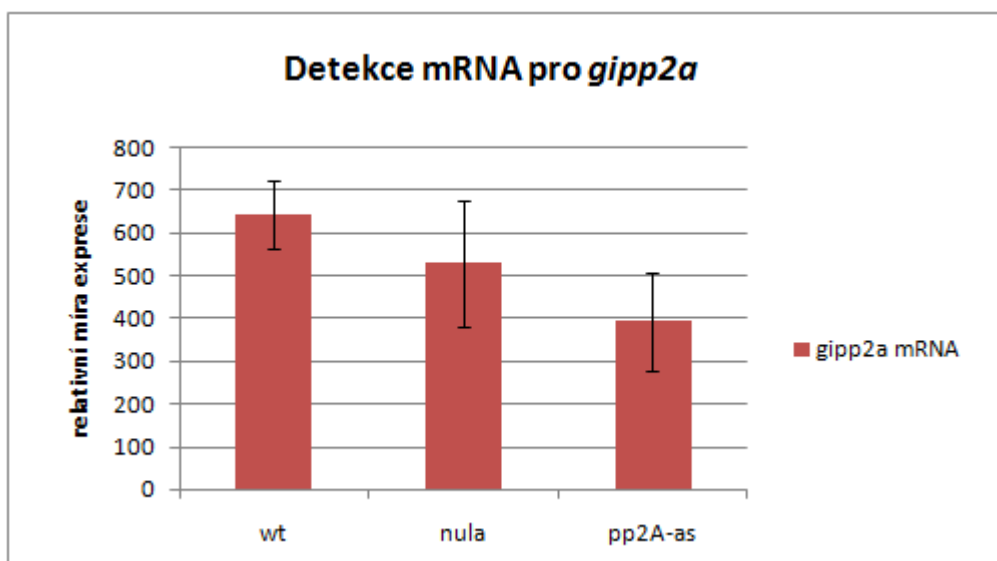
A.



B.



C.



Obr. 31

RT-PCR analýza hladiny mRNA pro *giiscu* a *gigrx5* v liniích giardií transfekovaných plazmidem pTG3039.

A. RT-PCR analýza exprese mRNA pro *giiscu* v linii produkující antisense *giiscu* RNA molekuly (IscU-as). Hladina mRNA pro *giiscu* není v linii IscU-as snížena.

■ Primery které rozeznávají *giiscu* mRNA vlákno.

B. RT-PCR analýza exprese mRNA pro *gipp2a* v linii produkující antisense *gipp2a* RNA molekuly (pp2A-as) pomocí první dvojice primerů, která nedokáže odlišit sense a antisense vlákno. Zvýšení RNA v pp2A-as linii značí úspěšnou expresi antisense RNA molekul v této linii.

■ Primery, které rozeznávají mRNA pro *gipp2a* a současně i antisense RNA pro *gipp2a*. Tyto primery byly použity v publikaci Lauwaet a kol. (2007).

C. RT-PCR analýza exprese mRNA pro *gipp2a* pomocí druhé dvojice primerů, která rozeznává pouze mRNA pro *gipp2a*. mRNA náležející *gipp2a* se v pp2A-as linii snížila o $39 \pm 30\%$ oproti netransferovaným buňkám.

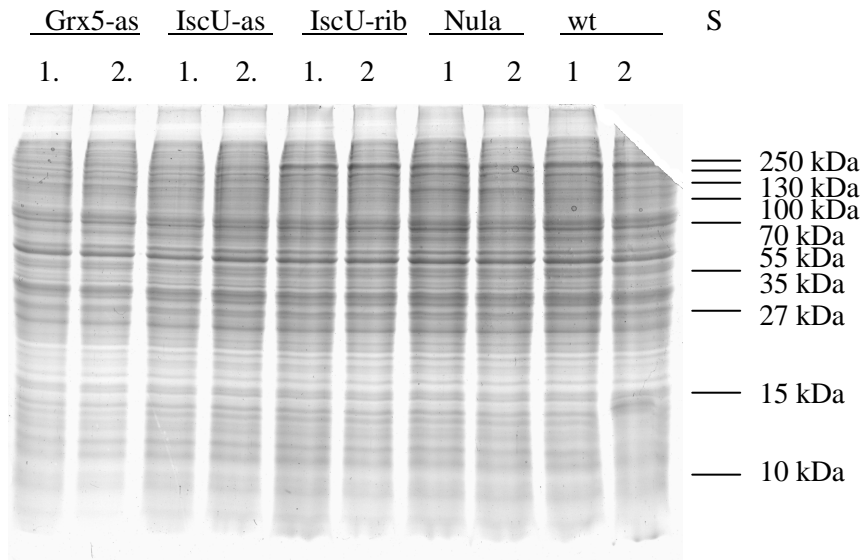
■ Primery které rozeznávají *gipp2a* mRNA vlákno.

Vysvětlivky: wt, netransfekovaná linie buněk; nula, linie s prázdným plazmidem; IscU-as, linie exprimující antisense RNA pro *giiscu*; pp2A-as, linie exprimující antisense RNA pro *gipp2a*; I v sloupcích grafu značí směrodatnou odchylku.

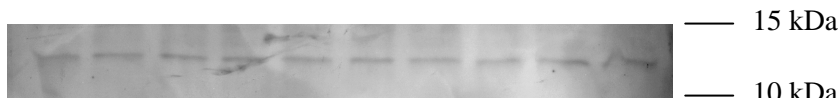
Tento pokus byl proveden v biologickém i technickém duplikátu (buňky z každé linie byly nasazeny do dvou kultivačních nádob a z každé nádoby se poté izolovala RNA v duplikátu). Hodnoty v grafech jsou průměrem hodnot získaných z těchto čtyřech RNA odběrů.

V liniích IscU-as, IscU-rib, Grx5-as a Nula jsem zjišťoval hladinu proteinu GiIscU a GiGrx5 metodou imunoblotu. Nepozoroval jsem změnu exprese GiIscU v liniích IscU-as a IscU-rib a ani změnu exprese GiGrx5 v linii Grx5-as (obr. 32).

A.



B.



C.



Obr. 32

Analýza exprese GiIscU a GiGrx5 u linií produkujících antisense RNA pro *giiscu* (IscU-as), antisense RNA pro *giiscu* s ribozymem (IscU-rib) a antisense RNA pro *gigrx5* (Grx5-as).

A. Elektroforéza (SDS-PAGE) ukazující vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu transfekovaných giardií.

B. Imunoblot ukazující nezměněnou expresi proteinu GiGrx5 v linii Grx5-as.

C. Imunoblot ukazující nezměněnou expresi proteinu GiIscU v liniích IscU-as a IscU-rib.

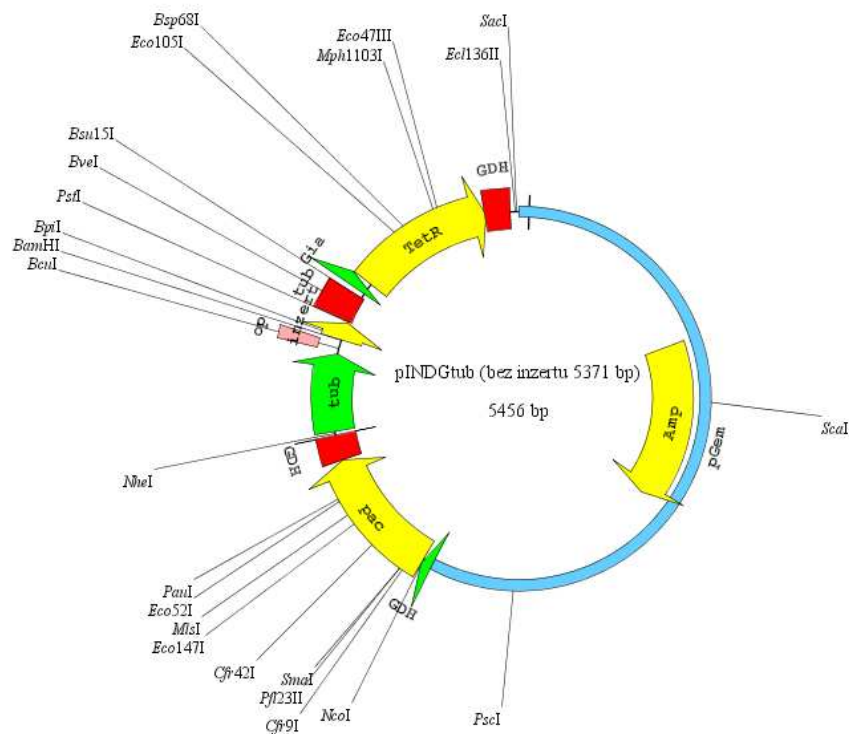
Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; Grx5-as, IscU-as, IscU-rib a nula jsou zmíněné linie transfekovaných buněk; S, standard molekulových hmotností.

Tento pokus byl proveden v biologickém duplikátu, na elektroforéze a imunoblotu jsou duplikáty vždy vedle sebe a označeny čísly 1 a 2.

5.3 Příprava a testování plazmidu pINDGtub s inducibilním alfa-tubulinovým promotorem

5.3.1 Konstrukce plazmidu pINDGtub

Plazmid je znázorněn na obr. 33. Pro konstrukci byl užit jako základ plazmid pINDG s vloženým *gii* v antisense orientaci. Pomocí restriktázy *Bgl*III byl vyštěpen *ran* promotor. Konce vzniklé lineární DNA byly poté defosforylovány pomocí “Calf intestinal“ alkalické fosfatázy. Tímto krokem se zamezí zavření plazmidu při ligační reakci bez toho, aniž by byl spojen s inzertem. Do rozštěpeného plazmidu byl vložen tubulinový promotor. Poté byl plazmid znova štěpen restriktázami *Pst*I a *Cla*I. Do takto rozštěpeného plazmidu byl vložen alfa-tubulinový terminátor, který nahradil glutamátdehydrogenázový terminátor. Tubulinový terminátor i promotor byly naamplifikovány z poskytnutého plazmidu pTubHApac (Touz et al., 2002).



Obr. 33

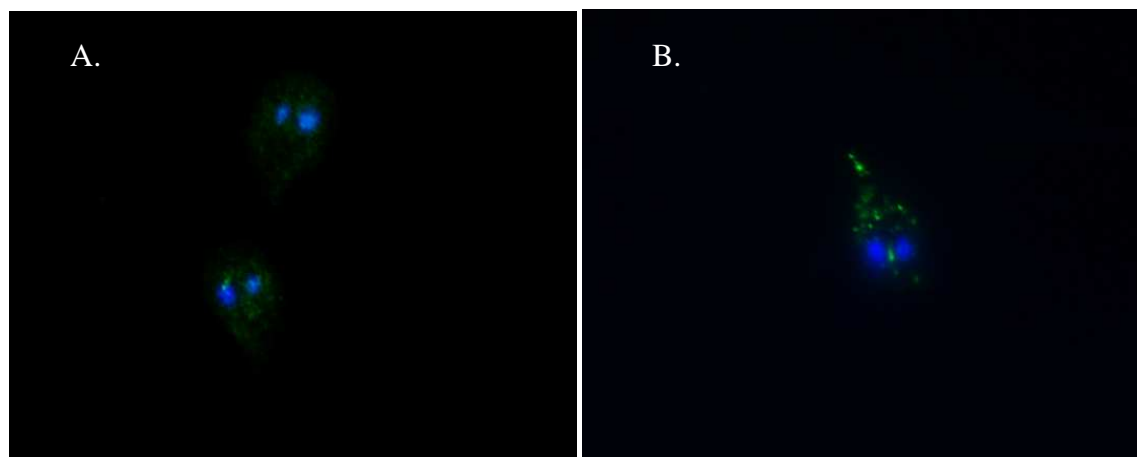
Mapa zkonstruovaného plazmidu pINDGtub s vyznačením restriktčních enzymů.

Vysvětlivky: Amp, betalaktamáza; pac, puromycin-N-acetyltransferáza; TetR, tetracyklinový represor; GDH, terminátor glutamátdehydrogenázy; tub, alfa-tubulinový promotor či terminátor; Gia, alfa-

giardinový promotor; op, dva tetracyklinové operátory za sebou; inzerť, část genu pro *giiscu* v antisense orientaci; pGem, část sekvence pGemu; Zeleně jsou označeny promotory, červeně terminátory.

5.3.2 Ověření inducibilní exprese genů z plazmidu pINDGtub

Indukce tvorby proteinu byla sledována pomocí fluorescenční imunolokalizace. Gen kódující GiIscU s HA-značením na C terminálním konci byl naamplifikován z plazmidu pONDRA_IscU_HA. Tento DNA fragment byl vložen do plazmidu pINDGtub, kterým byla transfekována linie giardií. Po vyselektování byla linie 48 hodin indukována tetracyklinem. Imunolokalizace ukázala zřetelnou indukci tvorby proteinu (obr. 34). U buněk pěstovaných za přítomnosti tetracyklinu je patrná typická mitosomální lokalizace HA-značeného GiIscU. Fluorescenční signál u neindukovaných buněk byl na úrovni pozadí.



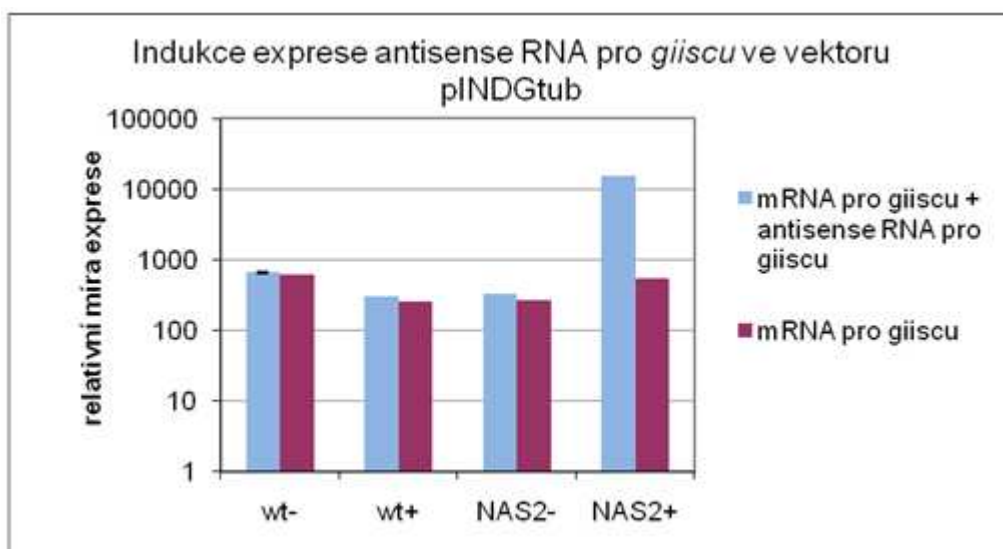
Obr. 34

Indukce exprese HA-značeného GiIscU v buňkách transfekovaných plazmidem pINDGtub.

A. Buňky pěstované bez tetracyklinu. B. Buňky pěstované 48 hodin v médiu s tetracyklinem. GiIscU s HA-značením má předpokládanou typickou mitosomální lokalizaci. Buňky jsou znázorněny pod zvětšením 1000x.

Schopnost nově vytvořeného vektoru inducibilně produkovat RNA molekuly byla charakterizována pomocí RT-PCR (obr. 35). Pokusy se prováděly na linii buněk exprimujících gen *giiscu* v antisense orientaci. Pro detekci antisense *giiscu* RNA byly použity primery, které nedokáží rozlišit sense a antisense RNA vlákno. Proto byla mRNA pro *giiscu* detekována pomocí další dvojice primerů a hladina antisense RNA tedy činí rozdíl hladiny naměřené druhou a první dvojicí primerů. V buňkách bez tetracyklinu dochází k nezatelné expresi antisense RNA molekul, což dokládá velmi malý rozdíl hladiny, kterou detekovala

první a druhá dvojice primerů (obr. 35). Při dvoudenní indukci množství antisense *giiscu* RNA naroste na zhruba třicetinasobek násobek hodnoty sense *giiscu* mRNA.



Obr. 35

RT-PCR analýza indukibilní exprese antisense RNA molekul pro *giiscu* ve vektoru pINDGtub v čase 48 hodin.

Relativní míra exprese je uvedena v logaritmickém vynesení. Je patrná silná exprese antisense RNA molekul pro *giiscu* u transfekovaných buněk kultivovaných za přítomnosti tetracyklinu.

■ mRNA pro *giiscu* + antisense RNA pro *giiscu*, první dvojice primerů, která detekuje tyto RNA molekuly.

■ mRNA pro *giiscu*, druhá dvojice primerů, která detekuje pouze hladinu mRNA pro *giiscu*.

Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; NAS2, linie transfekovaná plazmidem pINDGtub produkující antisense RNA pro *giiscu*; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu.

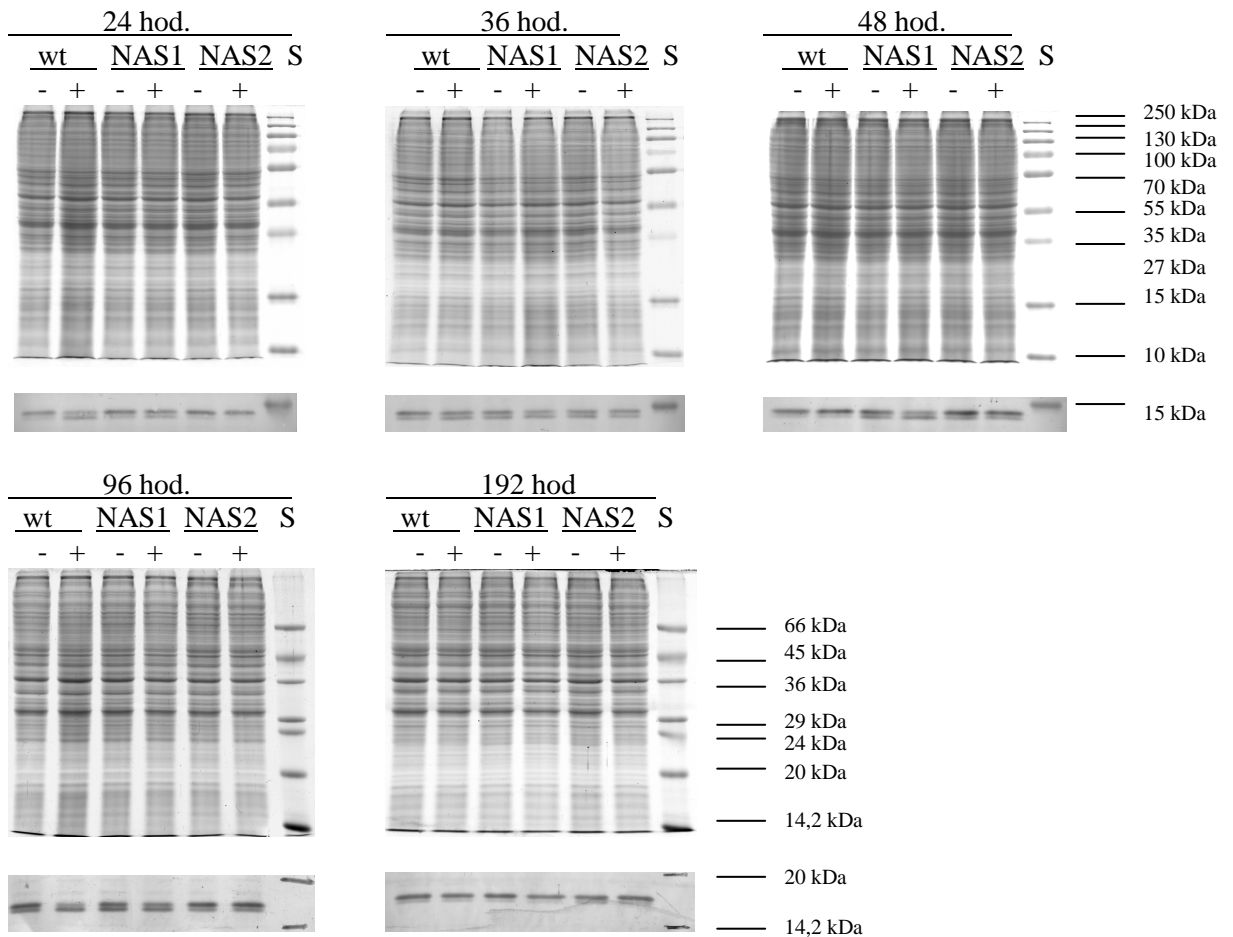
5.3.3 Testování vlivu délky indukce antisense RNA molekul z plazmidu pINDGtub na expresi *GiIscU* v buňkách giardií

Plazmid pINDGtub byl štěpen restriktázami *BamHI* a *PstI* a byl do něj vložen gen pro *giiscu* v antisense orientaci. Tento plazmid byl poté transfekován do buněk a 2 linie transfektantů byly použity pro další pokusy (dále označovány jako NAS1 a NAS2).

Indukce tvorby *giiscu* antisense RNA ve vektoru pINDGtub byla ověřena pomocí RT-PCR (obr. 35). Analyzována byla pouze indukce v čase 48 hodin u NAS2 linie. Na grafu je patrný silný nárůst antisense RNA molekul u indukovaných buněk, který dosahuje zhruba 30

násobku *giiscu* sense transkriptů. I při tak silné expresi antisense RNA molekul však nedošlo ke snížení hladiny *giiscu* mRNA (obr. 35).

Hladina GiIscU byla pomocí imunoblotu sledována u obou linií v čase 24, 36, 48, 96 a 192 hodin (obr. 36). Významný úbytek GiIscU však nebyl pozorován.



Obr. 36

Analýza exprese GiIscU u buněk transfekovaných plazminem pINDGtub, který tvoří antisense RNA molekuly pro *giiscu*. Analýza byla prováděna v časech 24, 36, 48, 96 a 192 hodin indukce tetracyklinem.

Elektroforézy (SDS-PAGE) ukazují vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu transfekovaných giardií. Imunoblots ukazují nezměněnou expresi proteinu GiIscU v případě všech testovaných časů.

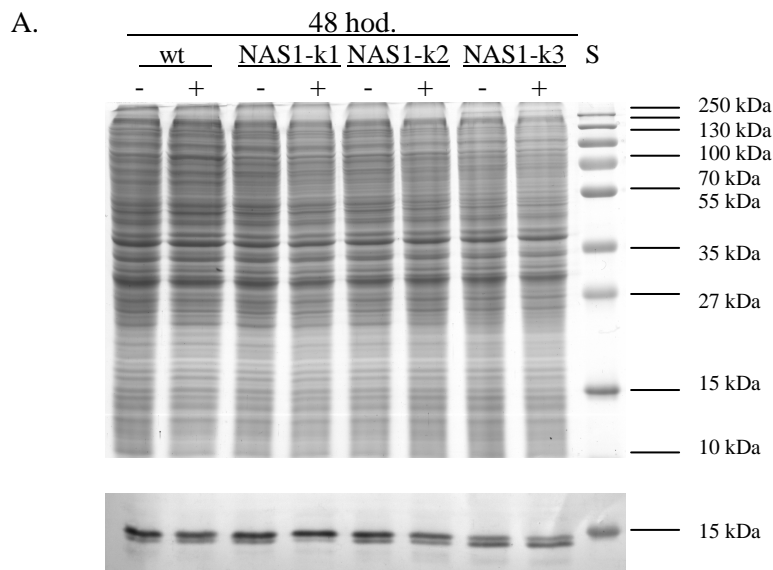
Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; NAS1, NAS2 jsou dvě polyklonální linie, které produkují antisense *giiscu*; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu; S, standard molekulových hmotností.

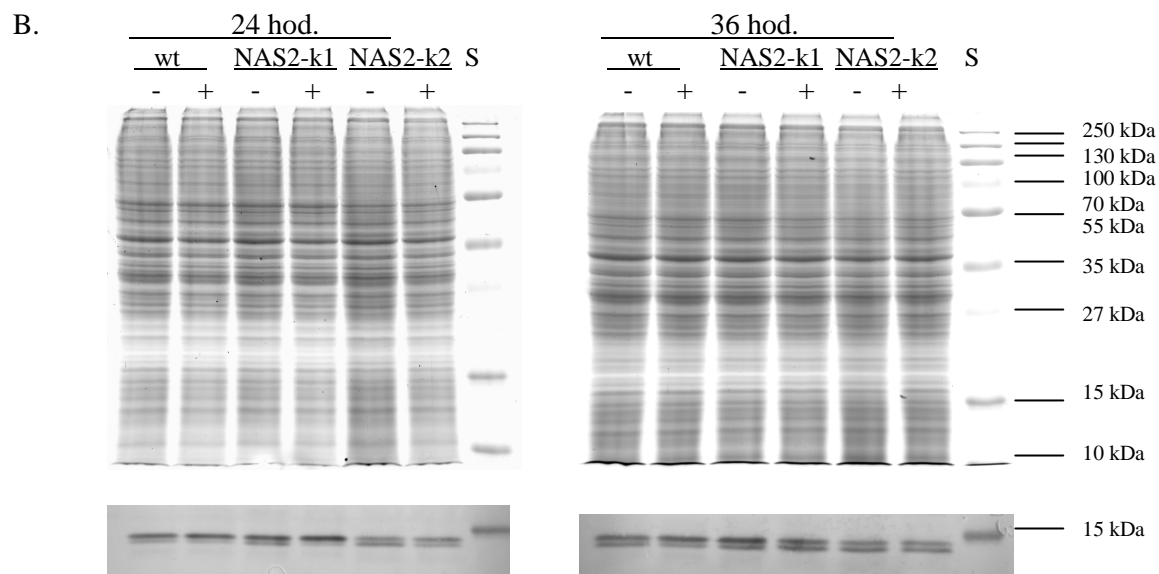
5.3.4 Analýza exprese GiIscU u klonálních linií giardií exprimujících antisense RNA z plazmidu pINDGtub

Pro další testování byly od linií NAS1 a NAS2 (uvedené v kapitole 5.3.3.) odvozeny klony. Od linie NAS1 byly odvozeny tři klony (NAS1-k1, NAS1-k2 a NAS1-k3) a od linie NAS2 dva klony (NAS2-k1, NAS2-k2).

Klonální linie NAS1-k1, NAS1-k2 a NAS1-k3 byly 48 hodin pěstovány v médiu s nebo bez tetracyklinu a poté byla analyzována exprese GiIscU pomocí imunoblotu. Exprese GiIscU u klonů pěstovaných s tetracyklinem snížena nebyla (obr. 37 A).

Klonální linie NAS2-k1 a NAS2-k2 byly pěstovány v médiu s nebo bez tetracyklinu také 48 hodin, přičemž množství proteinu bylo analyzováno v časech 24 a 48 hodin. Ani u klonů NAS2-k1 a NAS2-k2 nedošlo k významné inhibici exprese proteinu GiIscU (obr. 37 B).





Obr. 37

Analýza exprese GiIscU u klonálních linií giardií exprimujících antisense RNA z plazmidu pINDGtub.

Elektroforézy (SDS-PAGE) ukazují vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu transfekovaných giardií. Imunoblotty ukazují nezměněnou expresi proteinu GiIscU.

A. Analýza exprese GiIscU u klonálních linií NAS1-k1, NAS1-k2 a NAS1-k3 které byly 48 hodin kultivovány v médiu s tetracyklinem. Ke změně exprese proteinu GiIscU u indukovaných buněk nedochází.

B. Analýza exprese GiIscU u klonálních linií NAS2-k1, NAS2-k2, které byly 48 hodin kultivovány v médiu s tetracyklinem. Exprese GiIscU byla analyzována v čase 24 a 48 hodin v přítomnosti tetracyklinu. K inhibici exprese proteinu nedochází ani v jednom z časů.

Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; NAS1-k1, NAS1-k2 a NAS1-k3, NAS2-k1, NAS2-k2 jsou klonální linie; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu; S, standard molekulových hmotností.

Tento pokus byl proveden v biologickém duplikátu, data z druhé paralely nejsou ukázána.

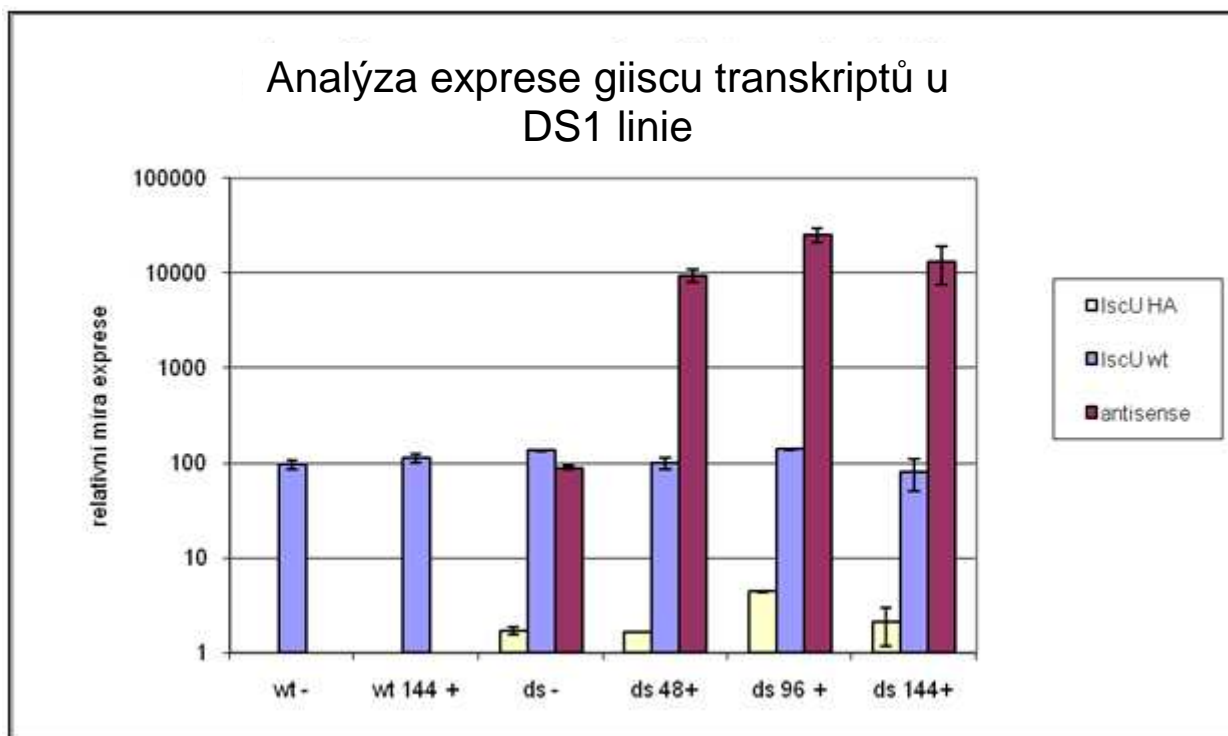
5.4 Indukce tvorby dsRNA v buňkách giardií

Do buněk exprimujících mRNA pro GiIscU s HA-značením (z vektoru pONDRA) byl vpraven vektor pINDGtub, který inducibilně exprimuje antisense RNA molekuly pro *giiscu*. Tyto dvě RNA by spolu v buňce mohly vytvořit dsRNA a sloužit tak k umlčení přirozeného *giiscu* prostřednictvím RNA interference.

Tento pokus byl prováděn v návaznosti na neúspěšné inhibice genu *giiscu* pomocí antisense RNA. Samotná exprese antisense RNA molekul by teoreticky mohla postačit k tvorbě dsRNA, neboť se v buňce vyskytuje sense mRNA náležící přirozenému *giiscu*. To, že produkce antisense RNA nevede k tvorbě dsRNA, bylo ale zjištěno např. u *T. brucei* (Drozd et al., 2002). U *T. brucei* (u které dobře fungují techniky umlčování pomocí dsRNA) při expresi antisense RNA nedojde k inhibici genu. Inhibice genu Drozd a kol (2002) dosáhli jen v buňkách s dvěma plazmidy, které produkovaly sense a antisense RNA molekuly.

Buňky giardií byly po transfekci selektovány v médiu s puromycinem a geneticinem G418 dva týdny a poté byly analyzovány dvě polyklonální linie (linie DS1 a linie DS2).

Tvorba sense i antisense RNA z plazmidů a také hladina přirozeného *giiscu* transkriptu byla u DS1 linie sledována pomocí RT-PCR v časech 2, 4 a 6 dnů indukce (obr. 38). U buněk pěstovaných s tetracyklinem se antisense RNA tvoří a její množství je přibližně stonásobně větší oproti tetracyklinem neindukovaným buňkám. Exprese antisense RNA molekul i za absence tetracyklinu se dá vysvětlit nedostatečnou inhibicí transkripce tetracyklinovým represorem (tzv. leakage). Hladina mRNA náležící HA-značenému *giiscu* zůstala po dobu indukce tvorby antisense RNA nezměněna a nesnížila se ani hladina mRNA náležící přirozenému *giiscu* transkriptu (obr. 38).



Obr. 38

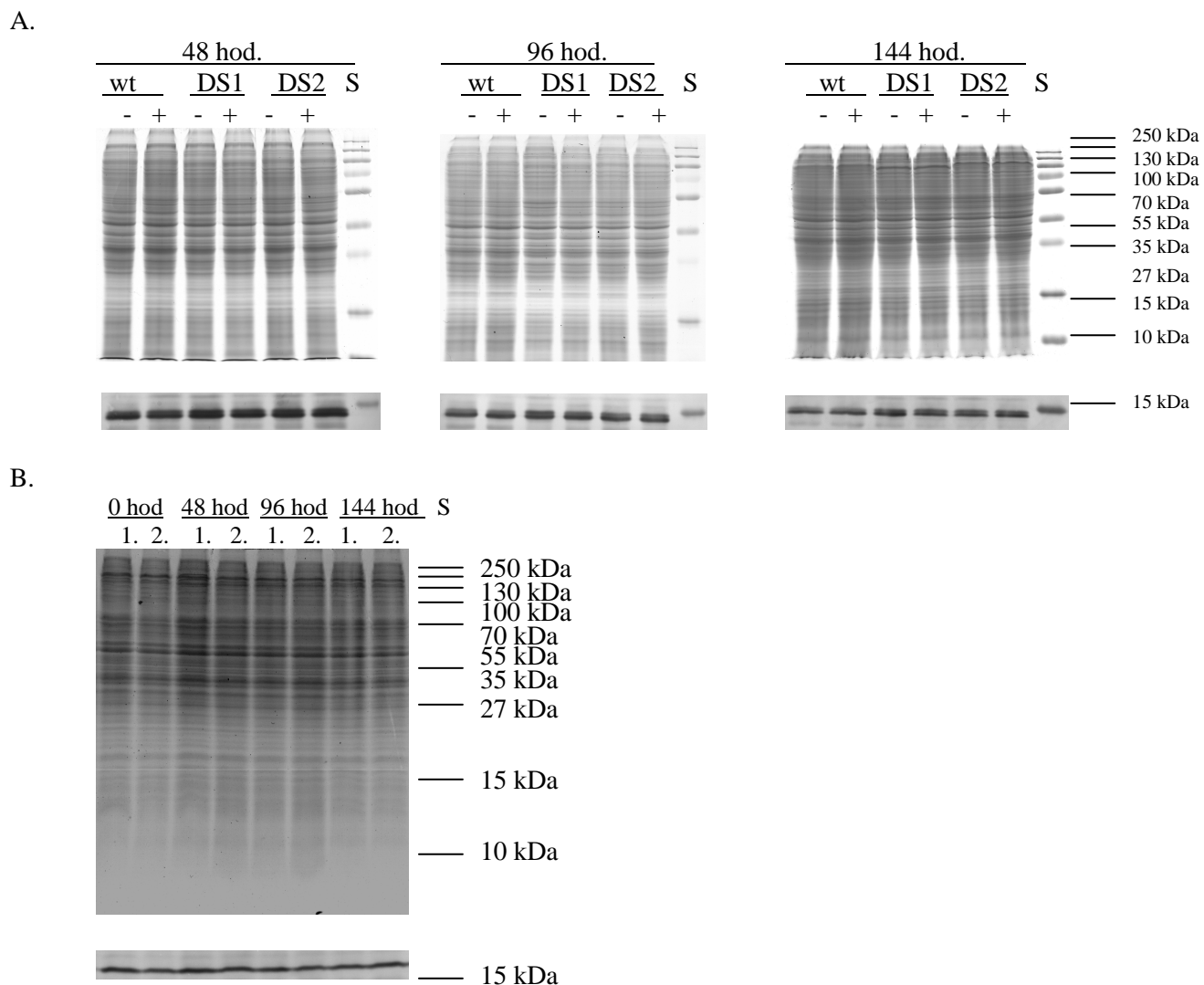
RT-PCR analýza exprese *giiscu* transkriptů u linie DS1 během indukce tvorby antisense RNA z vektoru pINDGtub.

Relativní míra exprese je uvedena v logaritmickeém vynesení. I při silné expresi antisense RNA molekul nedojde ke snížení exprese přirozených *giiscu* transkriptů ani transkriptů náležících HA-značenému *giiscu*.

Vysvětlivky: ■ IscU HA, mRNA pro *giiscu* s HA-značením; ■ IscU wt, přirozená mRNA pro *giiscu*; ■ antisense, antisense RNA pro *giiscu*; wt, netransfekované buňky; ds, transfekované buňky, 48, 96 a 144 značí dobu indukce tetracyklinem v hodinách; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu;

I v sloupcích grafu značí směrodatnou odchylku. Pokus byl proveden v biologickém duplikátu.

Schopnost tohoto systému snižovat expresi přirozeného GiIscU a HA-značeného GiIscU u linií DS1 a DS2 byla sledována pomocí imunoblotu (obr. 39). Buňky byly pěstovány 2, 4 a 6 dnů v přítomnosti či za absence tetracyklinu. Ke změně exprese jak HA-značeného, tak i přirozeného GiIscU nedochází ani v jednom z časů.



Obr. 39

Analýza exprese přirozeného GiIscU a HA-značeného GiIscU u linií buněk současně transfekovaných plazmidem pINDGtub produkujícím antisense RNA pro *giiscu* a plazmidem pONDRA, který produkuje mRNA náležící HA-značenému *giiscu*.

Elektroforézy (SDS-PAGE) ukazují vyrovnané množství nanášeného proteinu. Imunoblots ukazují nezměněnou expresi proteinu GiIscU.

A. Analýza exprese přirozeného GiIscU v buňkách linií DS1 a DS2 při 48, 96 a 144 hodinové indukci tvorby antisense RNA pro *giiscu*. Hladina proteinu se u DS1 ani u DS2 linie nemění.

B. Analýza exprese HA-značeného GiIscU v buňkách linie DS1 při 48, 96 a 144 hodinové indukci tvorby antisense RNA pro *giiscu*. Hladina HA-značeného GiIscU se nemění. Pokus byl proveden v biologickém duplikátu, na elektroforéze a imunoblotu jsou duplikáty vždy vedle sebe a označeny čísly 1 a 2.

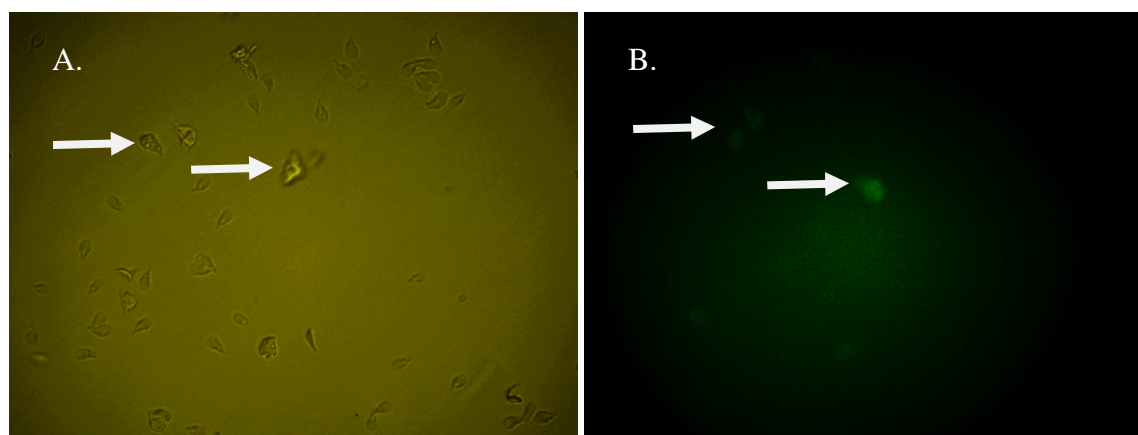
Vysvětlivky: wt, netransfekované buňky; DS1, DS2 jsou dvě polyklonální linie transfektantů; + a – značí přítomnost tetracyklinu v médiu; S, standard molekulových hmotností.

5.5 Testování morpholinových oligonukleotidů pro inhibici genů u *G. intestinalis*

Doručení MO do buněk je zcela nezbytný, avšak obtížný krok při zavádění inhibičního protokolu. MO jsou totiž nenabitě, což snižuje efektivitu elektroporace či doručení pomocí kationických lipidů. U některých linií savčích buněk se proto k doručení MO používá látka Endo-porter (Summerton, 2005). Tato látka přisedá k povrchu buňky a je nespecificky endocytována. V acidifikovaných endozómech vytvoří póry a uvolní tak nespecificky endocytované MO do cytosolu buňky. Pro sledování úspěšnosti doručení do buněk jsem měl k dispozici nesmyslné MO značené FITC.

5.5.1 Doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pomocí Endo-porteru

Pomocí fluorescence byla zjišťována schopnost Endo-porteru doručit MO do buněk *G. intestinalis*. Buňky byly inkubovány v médiu s MO o koncentraci 2uM a s Endo-porterem o koncentraci 0 uM, 2 uM, 4 uM nebo 6 uM. Po 3 a 24 hodinách byly živé buňky pozorovány pod mikroskopem. Endo-porter nedoručil MO do buněk v žádné z uvedených koncentrací. Doručení nebylo pozorováno ani za 3 ani za 24 hodin. Malé procento buněk svítilo, ale vždy se jednalo o mrtvé buňky (obr. 40). To naznačuje, že se do nich MO dostaly nespecificky při porušení plazmatické membrány.



Obr. 40

Neúspěšné doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pomocí Endo-porteru.

A. Buňky pod fázovým kontrastem; B. Fluorescence MO značených FITC byla pozorována pouze u mrtvých buněk (šipka). Buňky byly pozorovány pod zvětšením 200x.

5.5.2 Doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pomocí elektroporace

Pro doručení MO do buněk jsem vyzkoušel metodu založenou na elektroporaci. Elektroporace MO do buněk se provádí obdobně jako elektroporace plazmidů. Buňky se připravují identickým postupem. Do kyvety se k 1×10^7 buňkám přidá 50 ul MO o koncentraci 500uM. Poté se kyvety s buňkami nechají stát na ledu cca 1 minutu a následně se elektroporují při napětí 350 V, elektrická kapacitě 1000 uF a odporu 750 Ω . Po elektroporaci jsem nechal buňky v kyvetách stát 10 minut na ledu a poté je přenesl z kyvet do 15 ml kultivačních zkumavek s médiem.

Pomocí tohoto protokolu bylo dosaženo doručení MO do buněk. Fluorescence však byla velmi slabá (obr. 42 A).

Proto jsem testoval úspěšnost doručení do buněk pomocí navázání zčásti komplementární DNA na elektroporované MO (obr. 41, navrhování oligonukleotidů viz kapitola 4.9.1.). Komplementárně navázaná DNA udělí celému duplexu záporný náboj. To se ukázalo být dobré právě pro doručení MO do buněk. Podobný systém byl již v literatuře publikován. Morcos (2001) používal duplexy morpholinových a DNA oligonukleotidů a doručoval je do buněk pomocí kationických lipidů. DNA oligonukleotidy byly navrženy s 5' poly A přesahem, aby se po doručení lépe odbouraly exonukleázami (viz kap.6.4).

V mém pokusu jsem připipetoval DNA oligonukleotidy zčásti komplementární k FITC značeným MO (tento konkrétní duplex je znázorněn na obr. 41). Elektroporací takovýchto duplexů se podařilo MO doručit do většího množství buněk *G. intestinalis* (obr. 42 B). Navíc se MO dostaly do buněk ve větší koncentraci, což dokumentuje i silnější fluorescence buněk. V čase 3 hodiny po elektroporaci jsem spočítal okolo 50% svítících buněk v případě MO-DNA duplexů. Při elektroporaci samotných MO svítilo pouze okolo 25% buněk. Po 24 hodinách byl rozdíl ještě výraznější, svítilo 15% buněk v paralele kde byly elektroporovány duplexy a pouze 2% buněk, kde samotné MO (obr. 43). Buňky v čase 48 hodin již nesvítily. V kontrolních buňkách bez elektroporovaného morpholina nebyla pozorována žádná fluorescence (obr 42 C).

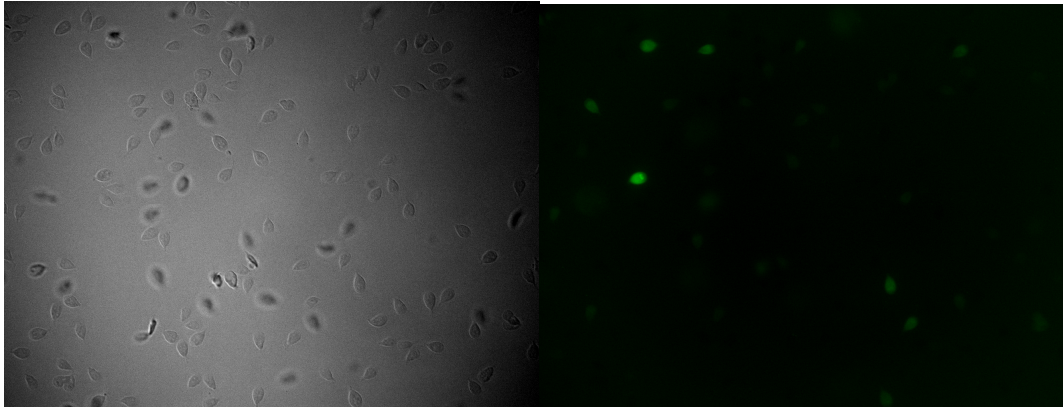


Obr. 41

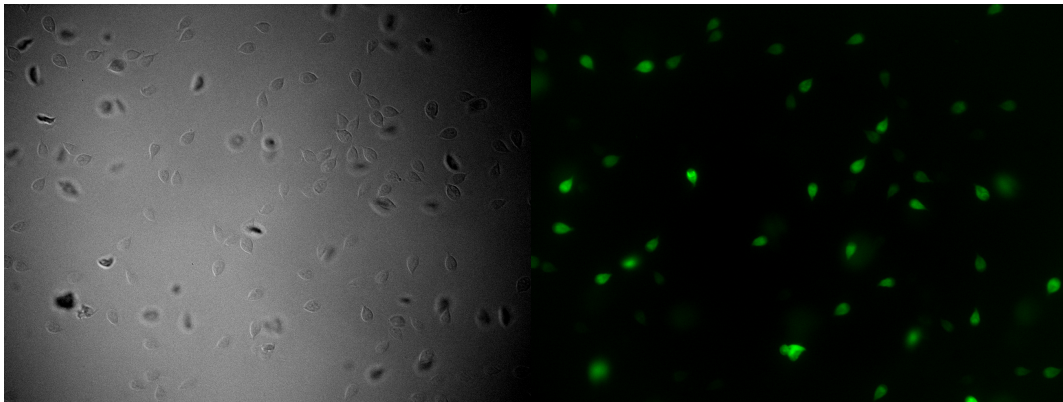
Schéma duplexu DNA a morpholinových oligonukleotidů.

DNA je značena červeně. Morpholinový oligonukleotid černě.

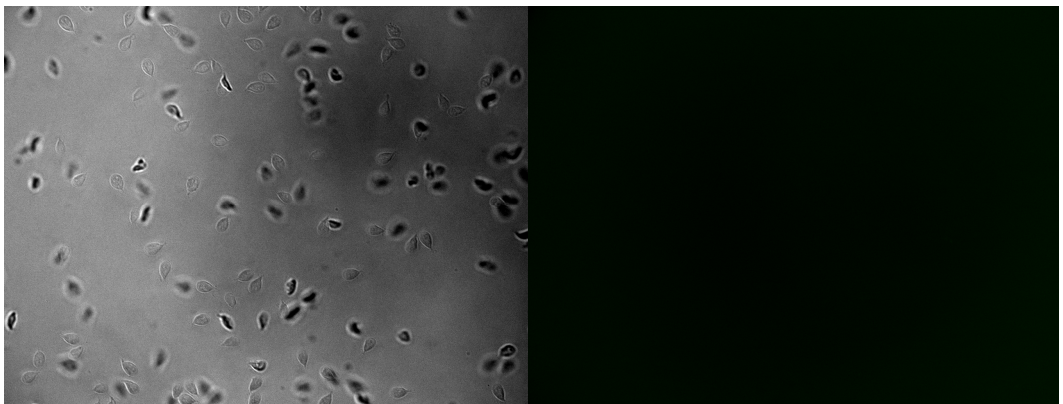
A.



B.



C.



Obr. 42

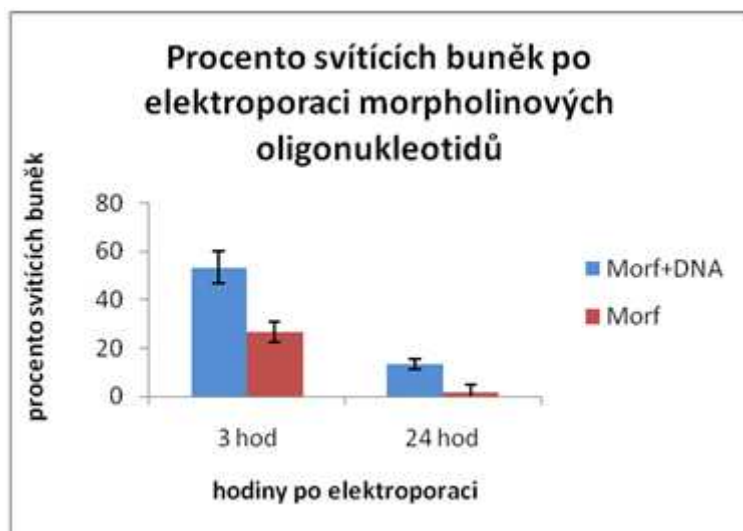
Doručení fluorescenčně značených morpholinových oligonukleotidů do giardií pomocí elektroporace. Fluorescence buněk 3 hodiny po elektroporaci.

A. Svítící buňky po elektroporaci MO.

B. Svítící buňky po elektroporaci MO-DNA duplexů.

C. Buňky nesvíí, elektroporována byla samotná H₂O. Tato paralela buněk slouží jako negativní kontrola.

Buňky byly pozorovány při zvětšení 200x. Fotky ukazují buňky vyfocené pod fázovým kontrastem a při FITC fluorescenci. Pokus byl proveden v biologickém duplikátu.



Obr. 43

Graf znázorňující procento svítících buněk v čase 3 hod a 24 hod po elektroporaci samotných morpholinových oligonukleotidů nebo morpholino-DNA duplexů.

- Morf+DNA, elektroporovány byly duplexy morpholinových a DNA oligonukleotidů;
- Morf, elektroporovány byly samotné MO. I v sloupcích grafu značí směrodatnou odchylku.

5.5.3 Pokus o inhibici genů kódujících *GiIscS* a *GiGrx5* pomocí elektroporace morpholinových oligonukleotidů

Navrhl jsem morpholinové oligonukleotidy pro *giiscs* a *gigrx5* tak, aby blokovaly místo, kde pravděpodobně začíná translace proteinu (obr. 44 A). K těmto oligonukleotidům jsem navrhl zčásti komplementární DNA oligonukleotidy s polyA přesahem (obr. 44 B).

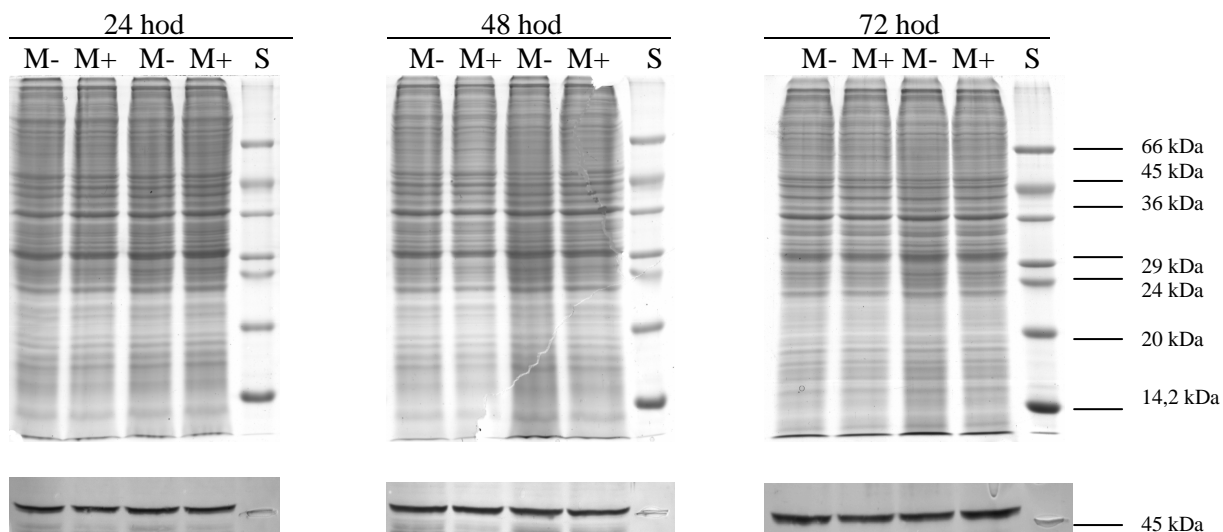
A.

>*giiscs*

5' - AGTCACCACAAATTAAGCTTGCCTGGATTATTTTTTA
 ATGATTACCTGGACAA CCAGGCCACTACGGCTATCGACCCCCGCGTGTTAGCTA
 AGATGGTCCCGTACATGACCACAAA - 3'

>*gigrx5*

5' - AGATTAAAACAAAAATTCATTCATACAAACGCCTGGAGGG
 ATGGACCAATAAACGGGGGGCTTTTCCTAAGGCACTTGCACTGACGCGGTATG
 CGTCAAGGGGGCTCATACTAGGCAT - 3'

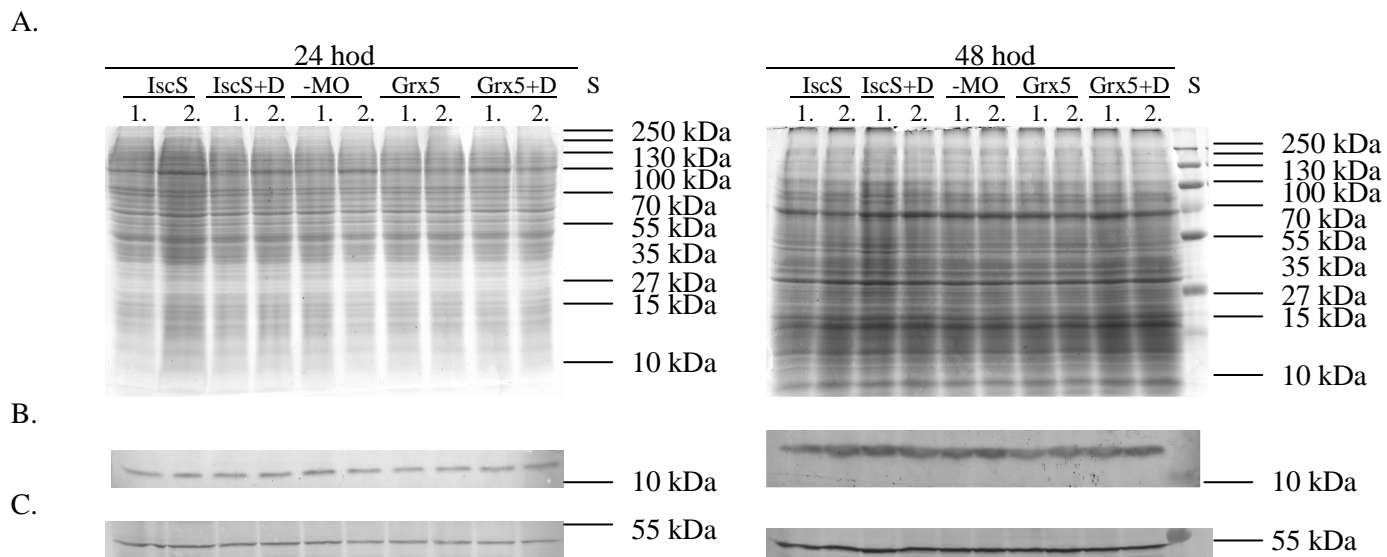


Obr.45

Analýza exprese GiIscS proteinu po elektroporaci duplexů morpholino-DNA oligonukleotidů pro *giiscs* v časech 24, 48 a 72 hodin.

Elektroforézy (SDS-PAGE) ukazují vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu elektroporovaných giardií. Imunoblots ukazují nezměněnou expresi proteinu GiIscS.

Vysvětlivky: M-, buňky elektroporované bez přítomnosti morpholinových oligonukleotidů; M+, buňky elektroporované MO-DNA duplexy pro *giiscs*.



Obr.46

Analýza exprese GiIscS a GiGrx5 po elektroporaci morpholino-DNA duplexů pro *giiscs* a *gigrx5* a také po elektroporaci morpholinových oligonukleotidů pro *giiscs* a *gigrx5* v časech 24, 48 hodin.

A. Elektroforézy (SDS-PAGE) ukazující vyrovnané množství nanášeného proteinu lyzátu elektroporovaných giardií.

B. Imunoblotty ukazující nezměněnou expresi proteinu GiGrx5 po elektroporaci výše zmíněných kombinací morpholinových a DNA oligonukleotidů.

C. Imunoblotty ukazující nezměněnou expresi proteinu GiIscS.

Vysvětlivky: -MO, buňky elektroporované bez přítomnosti MO; IscS, buňky elektroporované morpholinovými oligonukleotidy pro *giiscs*; IscS+D, buňky elektroporované MO-DNA duplexy pro *giiscs*; Grx5, buňky elektroporované MO pro *gigrx5*; Grx5+D, buňky elektroporované MO-DNA duplexy pro *gigrx5*.

6 Diskuze

6.1 Inhibice genů pomocí antisense RNA molekul u *G. intestinalis*

U *G. intestinalis* bylo publikováno několik významných prací, ve kterých byl pomocí produkce antisense RNA molekul umlčen některý z genů. Jedna tato práce byla publikována v prestižním časopise Nature (Prucca *et al.*, 2008). V některých publikacích je dokonce popsán letální efekt této techniky, který je patrně zapříčiněn silným umlčením některého esenciálního genu (Elias *et al.*, 2008; Prucca *et al.*, 2008).

Výsledky získané při vypracovávání této diplomové práce ale ukazují, že k inhibici některých genů prostřednictvím exprese antisense RNA nedochází. I při silné produkci antisense RNA molekul se nepodařilo snížit expresi proteinu GiIscU a GiGrx5.

6.1.1 Exprese antisense RNA molekul z plazmidu pTG3039

Při provedených pokusech nedošlo k inhibici exprese proteinu GiIscU a GiGrx5, přestože byla exprese antisense RNA molekul z plazmidu pTG3039 potvrzena pomocí RT-PCR. Nezměněná hladina těchto proteinů byla dokumentována na imunoblotu. V případě *giiscu* byla analyzována i hladina mRNA, která v buňkách exprimujících antisense RNA také nebyla snížena. Snížení hladiny mRNA pro *gipp2a* ale dosaženo bylo, což indikuje nevhodnost genů kódujících GiIscU a GiGrx5 pro inhibici pomocí této techniky.

V provedeném pokusu exprese antisense RNA z plazmidu pTG3039 úspěšně vedla k inhibici mRNA pro *gipp2a* podobně jako v pokusu popsaném v článku Lauwaet a kol. (2007). V této publikaci byla exprese antisense RNA molekul detekována pomocí PCR z cDNA. Množství inhibovaného proteinu bylo sníženo o 30 %. Pozorován byl i vliv inhibice na fenotyp. Buňky měly při encystaci sníženou tvorbu ESV [encystation secretory vesicles] a po encystaci sníženou excystační schopnost.

Snížení mRNA bylo analyzováno pomocí RT-PCR. Primery na RT-PCR uvedené v tomto článku však nedokáží rozlišit sense a antisense *gipp2a* RNA vlákno. Proto je zarážející, že pomocí této dvojice primerů Lauwaet a kol. (2007) pozorovali snížení hladiny *gipp2a* RNA u linie, která exprimuje antisense RNA molekuly. Pomocí identických primerů jsem ve stejně provedeném pokusu pozoroval naopak zvýšení hladiny, což by mohlo

odpovídat expresi antisense *gipp2a* RNA molekul v buňkách. Vysvětlením rozdílů ve výsledcích obou pokusů mohou být nepřesně uvedené primery pro detekci *gipp2a* mRNA v publikaci Lauwaet a kol. (2007), neboť autoři v textu pracují s výstupy této RT-PCR, jako by tato dvojice primerů skutečně detekovala pouze sense mRNA molekuly a nikoli antisense RNA. V tomto případě by pak přibližně odpovídala míra inhibice mRNA pro *gipp2a* v obou pokusech. Lauwaet a kol. pozoroval inhibici mRNA o $47 \pm 11\%$ oproti netransfekovaným buňkám. V mnou provedeném pokusu jsem pozoroval snížení exprese o $39 \pm 30\%$.

6.1.2 Exprese antisense RNA molekul pro *giiscu* z plazmidu pINDG

Pro dosažení inhibice *giiscu* byl testován plazmid pINDG, který umí inducibilně exprimovat antisense RNA molekuly. Vytvořil jsem konstrukt, kde byla antisense RNA zčásti komplementární k 5' UTR oblasti v cílené mRNA. Inhibice pomocí tohoto konstruktů však nebyla pozorována ani u polyklonální linie, ani u klonů z ní odvozených.

Tento plazmid byl použit v pokusech popsáných v publikaci Touz a kol. (2005). V tomto článku bylo dosaženo snížení exprese GiPAT (palmytoyltransferáza). Snížení GiPAT proteinu nebylo zjišťováno a inhibice byla potvrzena pomocí analýzy hladiny mRNA molekul v indukovaných buňkách a pozorováním vlivu inhibice na fenotyp. Byl ukázán snížený přenos palmytoylové kyseliny na VSP proteiny. Úbytek mRNA pro *gipat* byl natolik výrazný, že ji nebylo možné pomocí semi-kvantitativní RT-PCR u buněk indukovaných tetracyklinem detekovat. Produkce antisense RNA v buňkách v článku dokumentována nebyla.

6.1.3 Zkonstruování plazmidu pINDGtub se silným inducibilním promotorem pro inhibici genů pomocí produkce antisense RNA

Pro silnou produkci antisense RNA molekul se podařilo zkonstruovat plazmid pINDGtub, který obsahuje silný inducibilní alfa-tubulinový promotor. Alfa-tubulinový promotor patří mezi nejsilnější známé promotory u *G. intestinalis*. V porovnání s *ran* promotorem (řídí expresi v plazmidu pINDG) ukázal několika-řádově větší expresi luciferázy při transienčních transfekcích giardií (Elmendorf *et al.*, 2001b). Tento promotor byl navíc užít

ve většině publikací, ve kterých je popsána inhibice genů pomocí tvorby antisense RNA molekul u *G. intestinalis* (Touz *et al.*, 2002).

Schopnost plazmidu pINDGtub inducibilně produkovat RNA molekuly byla demonstrována v systému produkce antisense RNA molekul pro *giiscu*. Schopnost inducibilně produkovat protein byla demonstrována při expresi genu *giiscu* s HA-značením. Jak RT-PCR analýza, tak fluorescence HA-značeného GiIscU v buňkách giardií, ukázala velmi malou “leakage“ promotoru a silnou expresi v buňkách, které byly pěstovány v přítomnosti tetracyklinu.

Plazmid pINDGtub byl otestován pro inhibici genu *giiscu*. V mé diplomové práci ukazují, že k inhibici *giiscu* nedochází ani na úrovni proteinu ani na úrovni mRNA. Hladina antisense RNA v buňkách je přitom 30x vyšší, než je hladina mRNA pro *giiscu*. Testována byla polyklonální linie i od ní odvozené klony. Zkoušena byla různá doba indukce od 1 až po 8 dní. Ani jednou však nebyl pozorován úbytek proteinu.

6.1.4 Možné důvody nezdařené inhibice genů pro GiIscU a GiGrx5 pomocí exprese antisense RNA molekul

Neúspěšné inhibice *giiscu* a *gigrx5* mohou být zapříčiněny pro pokus nevhodně zvolenou linií giardií. Při vlastních pokusech jsem používal originální WB kmen (ATCC 30957), který je polyklonální. V pracích, kde byla publikována inhibice, byly přitom pokaždé použity klonální linie WB kmenu, a sice klon WB/C6 (ATCC 50803), klon WB/1267 (ATCC 50582) nebo klon WB/9B10. Použití polyklonální linie v této práci nicméně vedlo k úbytku mRNA pro *gipp2a*, a proto bude pravděpodobně důvod neúspěšné inhibice *giiscu* a *gigrx5* jiný.

Je možné, že konkrétní sense a antisense RNA molekuly v buňce efektivně neinteragují, a z toho důvodu nemůže dojít k inhibici. Je totiž známo, že v sobě sekvence mRNA mohou obsahovat informaci, kam mají být v buňce doručeny (Kloc *et al.*, 2002). Signál pro mRNA “targeting“ může být ukryt v 3' UTR oblasti transkriptů (Kloc *et al.*, 2002). Oba geny, které se nepodařilo pomocí antisense mRNA umlčet, kódují mitosomální proteiny. Je tedy možné, že mRNA kódující tyto proteiny se přednostně nachází v jiných oblastech buňky než z vektoru produkovaná antisense RNA, která má 3' UTR oblast odvozenou od genů kódujících proteiny z cytoplazmy (alfa-tubulin ve vektoru pINDGtub,

glutamátdehydrogenáza ve vektoru pINDG a HCEP protein ve vektoru pTG3039). U kvasinek bylo zjištěno, že jsou vlákna mRNA molekul (náležející mitochondriálním proteinům) navázána buď na cytoplazmatické ribozomy, nebo na ribozomy přímo sedící na membráně mitochondrie (Marc *et al.*, 2002). Mitosom je organela evolučně příbuzná mitochondrii, a proto se podobnost na této úrovni nedá vyloučit.

Sense a antisense RNA molekuly v buňce nemusejí interagovat také z důvodu, že se antisense RNA molekuly efektivně neexportují z jádra. V lidských buňkách bylo např. zjištěno, že se antisense RNA pro thymidilátsyntázu nachází výhradně v jádru, zatímco sense mRNA náležející tomuto proteinu se vyskytuje rovnoměrně v jádru i v cytoplazmě buněk (Faghihi and Wahlestedt, 2006).

Příčinou nezdaření inhibice *giiscu* a *gigrx5* by mohl být jiný než inhibiční účinek exprimovaných antisense RNA molekul. Je totiž známo, že se v přírodě tyto molekuly vyskytují u řady organismů a jejich funkce je velmi variabilní (Werner and Sayer, 2009).

Také je možné, že inhibice selhala z důvodu nedostatečné produkce antisense RNA molekul. RT-PCR analýza ukázala silnou exprese těchto molekul v liniích transfekovaných giardií (v buňce transfekovaných giardií byla 30x větší hladina antisense RNA molekul pro *giiscu* než mRNA transkriptů). V publikacích, které popisují inhibici genů, nebyla hladina produkované antisense RNA prezentována, proto námi zjištěný poměr sense a antisense RNA molekul nemůžeme porovnat s expresí při úspěšných inhibicích. Je tedy možné, že námi pozorovaná poměrně silná produkce antisense RNA molekul je i tak nedostačující. Pro inhibici byly nicméně vybrány identické plazmidy, jako v publikacích úspěšných inhibičních pokusů (Lauwaet *et al.*, 2007; Touz *et al.*, 2005) a dá se předpokládat, že exprese antisense RNA molekul by u nich měla být přibližně srovnatelná.

Inhibice *giiscu* a *gigrx5* mohly být oproti umlčování *gipp2a* neúspěšné z důvodů zkrácení antisense RNA molekul o 20 nukleotidů v pTG3039 konstruktech. Je to ale nepravděpodobné, neboť zkrácená část je jen nepatrný zlomek komplementární mRNA molekuly. To, že pro inhibici není potřeba kompletní antisense RNA sekvence, bylo ukázáno v publikaci Prucca a kol. (2008). Inhibice genu kódujícího protein VSP9B10 bylo dosaženo pomocí antisense RNA molekul komplementárních pouze k polovině inhibované mRNA molekuly. Gen byl umlčen nezávisle na tom, zda se exprimovala antisense RNA molekula komplementární k 5' nebo k 3' části mRNA molekuly pro VSP9B10.

Neúspěšné inhibice mohou být také způsobeny velmi rychlou odpovědí buňky na snížení hladiny některého z umlčovaných proteinů. Zda jsou tyto geny (*giiscu* a *gigrx5*) do takové míry flexibilně regulovány, však známo není.

6.2 *Giardia intestinalis* a inhibice pomocí ribozymů

Podářilo se zkonstruovat plazmid obsahující ribozym pro *giiscu* s antisense RNA rameny. Plazmid byl zaklonován do buněk, exprese antisense RNA s ribozymem byla potvrzena pomocí RT-PCR a přesto nedošlo k inhibici exprese *giiscu*.

V několika studiích byly u *G. intestinalis* umlčeny geny pomocí ribozymů v antisense RNA sekvenci. Ve všech těchto případech byly inhibice dosaženy pomocí dsRNA virového vektoru (Dan *et al.*, 2000). Není přesně dokumentováno, jaké procesy se v buňce při inhibici odehrávají. Koexistence dsRNA viru a RNA interferenční dráhy u *G. intestinalis* již byla v literatuře diskutována (Ullu *et al.*, 2004). Mechanismus, kterým dsRNA virus uniká pravděpodobně se vyskytující RNA interferenční dráze, nicméně znám není. V publikacích, kde dochází k inhibici exprese pomocí ribozymu, není nikdy dokumentována tvorba mRNA štěpů v transfekovaných buňkách, i když je ukázána katalytická účinnost ribozymů v *in vitro* systému. Není tedy možné vyloučit, že je vnášená molekula dsRNA, která má z virové dsRNA zachované pouze koncové sekvence, sama substrátem pro dicer a že jsou pozorované inhibice způsobeny RNA interferencí. Antisense RNA molekuly se v případě systému s dsRNA virem produkují přímo v cytoplazmě. V systému testovaném v této práci byla antisense RNA molekula exprimována z plazmidu, který se nacházel v jádru. Podobný systém vedl k inhibici genů např. u *T. gondii* (Al-Anouti and Ananvoranich, 2002).

Je možné, že k inhibici exprese proteinu GiIscU nedošlo ze stejného důvodu jako při použití metody exprese antisense RNA molekul, neboť byl k expresi antisense RNA molekuly s ribozymem použit stejný plazmid (pTG3039). Je také možné, že k inhibici nedošlo z důvodu katalytické neúčinnosti zkonstruovaného ribozymu. Schopnost degradovat mRNA pro *giiscu* totiž nebyla potvrzena v *in vitro* systému.

6.3 *Giardia intestinalis* a RNA interference

Ve své práci jsem zkusil inhibovat gen pro GiIscU pomocí současné produkce sense a antisense RNA vláken (sense mRNA kódovala protein GiIscU s hemaglutininovým značením). Každá RNA byla produkována z jiného plazmidu. Obdobný systém byl použit pro umlčení genu pomocí RNA interference u *T. brucei* (Drozd *et al.*, 2002). Pomocí RT-PCR byla potvrzena tvorba obou RNA molekul. K inhibici proteinu GiIscU ani vneseného GiIscU s hemaglutininovým značením ovšem nedošlo. Geny nebyly umlčeny ani na úrovni mRNA.

U *G. intestinalis* byla publikována jediná inhibice genu pomocí tvorby dsRNA (Touz *et al.*, 2004). DsRNA byla produkována z opačně orientovaných *ran* promotorů. V této práci nebyl demonstrován vznik krátkých siRNA molekul charakteristických pro RNA interferenci ani tvorba dsRNA. Pomocí northern-blotu bylo ukázáno snížení mRNA a pomocí fluorescenční mikroskopie i snížení hladiny proteinu.

U *G. intestinalis* byl nalezen argonaut i dicer, dvě hlavní komponenty RNA interferenční dráhy. Je možné, že se RNAi podílí na modulaci kondenzace chromatinu a možná též hraje roli v represi translace pomocí miRNA molekul (Saraiya and Wang, 2008; Ullu *et al.*, 2005). Pravděpodobně je přítomen také RNA interferenční mechanismus podléjící se na degradaci dsRNA molekul v cytoplazmě, jak bylo ukázáno v případě VSP genů (Prucca *et al.*, 2008).

Umlčení genu pomocí produkce dsRNA se podařilo pouze ve zmíněné publikaci z roku 2004. Zavést systém na inhibici genů pomocí dvou-řetězcové RNA se u *G. intestinalis* v minulosti neúspěšně pokoušelo již několik laboratoří. Data o této činnosti nebyla publikována (citace z článku Saraiya a kol., 2008).

Je možné, že se inhibice *giiscu* nezdařila z důvodu neexistence RNA interferenční dráhy umožňující umlčování genů pomocí dsRNA. To by vysvětlovalo i neúspěšné pokusy jiných laboratoří. Je také možné, že se tato dráha u *G. intestinalis* vyskytuje, a teprve odhalení dalších skutečností o jejím charakteru dopomůže k nalezení spolehlivého systému pro inhibici genů.

6.4 Užití morpholinových oligonukleotidů

Využití morpholinových oligonukleotidů u *G. intestinalis* nebylo prozatím publikováno. V této práci byla k doručení těchto oligonukleotidů do buněk otestována látka Endo-porter. Endo-porter lyzuje acidifikované endozómy a vypustí endocytované morpholinové oligonukleotidy do cytosolu buňky. Tento systém funguje u několika linií savčích buněk (Summerton, 2005). U giardie ale doručení morpholinových oligonukleotidů do buněk pozorováno nebylo.

V této práci se podařilo nalézt elektroporační protokol na doručení těchto oligonukleotidů do buněk. Úspěšnost doručení se podařilo zvýšit přidáním komplementárních DNA oligonukleotidů k morpholinovým oligonukleotidům. DNA totiž udělí celému duplexu záporný náboj. Tyto DNA oligonukleotidy mají 5' polyA nekomplementární části, které

slouží pro zatraktivnění navázaných DNA molekul pro exonukleázy (Morcos, 2001). Morcos (2001) doručoval tyto duplexy pomocí transfekce buněk kationickými lipidy. Pomocí tohoto systému dokázal úspěšně snížit expresi luciferázy v HeLa- buňkách. V tomto článku byl také diskutován model uvolnění morpholinových oligonukleotidů z duplexu po doručení do cytosolu. DNA by se z duplexu měla uvolnit díky silnější vazbě morpholinových oligonukleotidů na inhibované mRNA molekuly (morpholinové oligonukleotidy jsou komplementární k mRNA molekulám v úseku 26 nukleotidů oproti 16 nukleotidům v případě DNA oligonukleotidů). Jistá dynamika v slučování a rozpojování těchto duplexů lze předpokládat, neboť DNA oligonukleotidy byly navrženy, tak aby T_m (tepota, kdy polovina duplexů je disociovaná) byla okolo 37 °C. V momentu rozpojení duplexu je navíc DNA vystavena degradaci prostřednictvím exonukleáz. Tomu by měla DNA pravděpodobně čelit i v momentu, kdy je navázaná v duplexu, a to díky polyA přesahu.

Morpholinové oligonukleotidy pro *giiscs* a *gigrx5* byly do buněk dopraveny pomocí již zmíněné elektroporace. Testována byla schopnost inhibice samotných morpholinových oligonukleotidů i oligonukleotidů s komplementárně nasedlou DNA, které se efektivněji dopravují do buněk. Inhibice proteinu GiIscS a GiGrx5 nebyla pozorována ani v jednom případě. Důvodem, proč k inhibici nedošlo, může být nedostatečná koncentrace doručených morpholinových oligonukleotidů v buňce. V případě morpholino-DNA duplexů možná neúspěch zapříčinila nedostatečná degradace DNA oligonukleotidů navázaných na morpholinových oligonukleotidech pomocí buněčných exonukleáz.

7 Závěr

V buňce *G. intestinalis* jsou organely zvané mitosomy, jejichž funkce je dodnes neznámá. Tato práce se zabývá testováním systémů reverzní genetiky u *G. intestinalis*. Pro inhibici byly vybrány právě geny kódující proteiny nalezené v mitosomu giardie: protein GiIscU, cysteinsulfotransferáza (GiIscS) a glutaredoxin 5 (GiGrx5).

Pro inhibici byly přednostně testovány plazmidy, které již byly k umlčování genů použity v jiných laboratořích. Plazmidy pINDG a pTG3039, s geny *giiscu* a *gigrx5* v antisense orientaci, byly úspěšně zkonstruovány, transfekovány do buněk a exprese antisense RNA molekul z těchto plazmidů byla potvrzena pomocí RT-PCR. Exprese genů *giiscu* a *gigrx5* nebyla snížena, což bylo ukázáno na úrovni proteinu pomocí imunoblotu a v případě *giiscu* i na úrovni mRNA pomocí RT-PCR. Prostřednictvím plazmidu pTG3039 byla v této práci umlčena exprese genu pro *gipp2a*, což odpovídá již publikované inhibici tohoto genu, která byla provedena identickým postupem.

Pro silnou inducibilní expresi antisense RNA molekul byl zkonstruován plazmid pINDG_{tub}, který obsahuje inducibilní alfa-tubulinový promotor. Pomocí RT-PCR a fluorescenční mikroskopie byla potvrzena schopnost tohoto plazmidu inducibilně exprimovat RNA molekuly i protein GiIscU. Umlčet expresi *giiscu* prostřednictvím produkce antisense RNA molekul se ale nepodařilo, a to navzdory tomu, že hladina antisense RNA molekul v buňkách byla 30 x větší než hladina mRNA molekul náležícím *giiscu*.

Tyto výsledky nasvědčují tomu, že k inhibici některých genů prostřednictvím produkce antisense RNA nedochází.

Zkonstruován byl plazmid obsahující ribozym pro *giiscu* s antisense RNA rameny. Plazmid byl transfekován do buněk, exprese antisense RNA molekul s ribozymem byla potvrzena pomocí RT-PCR, avšak přesto nedošlo k inhibici exprese *giiscu*. Transfekcí plazmidů pONDRA a pINDG_{tub} a následnou selekcí buněk puromycinem a geneticinem G418 byla vytvořena linie buněk exprimující sense a antisense RNA vlákno pro *giiscu*. Exprese obou RNA molekul z plazmidů byla potvrzena. Hladina *giiscu* mRNA a proteinu však snížena nebyla.

Pro inhibici exprese proteinu GiIscS a GiGrx5 byly testovány morpholinové oligonukleotidy. Jsou to antisense oligonukleotidy, které blokují iniciaci translace na komplementární mRNA molekule. Tyto oligonukleotidy se podařilo dopravit do buněk giardie pomocí elektroporace. Pro tento účel byly morpholinové oligonukleotidy

zkonjugovány s DNA oligonukleotidy, které celému duplexu udělují záporný náboj. Po doručení těchto duplexů do buněk ale umlčení exprese nebylo pozorováno ani u jednoho z inhibovaných genů.

8 Použitá literatura

- Abed,M., Ankri,S., 2005. Molecular characterization of *Entamoeba histolytica* RNase III and AGO2, two RNA interference hallmark proteins. *Exp. Parasitol.* 110, 265-269.
- Achenbach,T.V., Brunner,B., Heermeier,K., 2003. Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *Chembiochem.* 4, 928-935.
- Adam,R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447-475.
- Ahmed,A., Sharma,Y.D., 2008. Ribozyme cleavage of *Plasmodium falciparum* gyrase A gene transcript affects the parasite growth. *Parasitol. Res.* 103, 751-763.
- Al-Riyahi,A., Al-Anouti,F., Al-Rayes,M., Ananvoranich,S., 2006. Single argonaute protein from *Toxoplasma gondii* is involved in the double-stranded RNA induced gene silencing. *Int. J. Parasitol.* 36, 1003-1014.
- Al-Anouti,F., Ananvoranich,S., 2002. Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12, 275-281.
- Al-Anouti,F., Quach,T., Ananvoranich,S., 2003. Double-stranded RNA can mediate the suppression of uracil phosphoribosyltransferase expression in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 316-323.
- Al-Anouti,F., Tomavo,S., Parmley,S., Ananvoranich,S., 2004. The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 279, 52300-52311.
- Ananvoranich,S., Al,R.M., Al,R.A., Wang,X., 2006. RNA silencing of glycolysis pathway in *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 Suppl 1, S162-S163.
- Anbar,M., Bracha,R., Nuchamowitz,Y., Li,Y., Florentin,A., Mirelman,D., 2005. Involvement of a short interspersed element in epigenetic transcriptional silencing of the amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 4, 1775-1784.
- Ankri,S., Padilla-Vaca,F., Stolarsky,T., Koole,L., Katz,U., Mirelman,D., 1999. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.* 33, 327-337.
- Bannai,H., Sakurai,T., Inoue,N., Sugimoto,C., Igarashi,I., 2003. Cloning and spression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10, 926-933.
- Bastin,P., Sherwin,T., Gull,K., 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391, 548.
- Baulcombe,D., 2005. RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290-293.

Baum,J., Papenfuss,A.T., Mair,G.R., Janse,C.J., Vlachou,D., Waters,A.P., Cowman,A.F., Crabb,B.S., 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.

Berriman,M., Ghedin,E., Hertz-Fowler,C., Blandin,G., Renault,H., Bartholomeu,D.C., Lennard,N.J., Caler,E., Hamlin,N.E., Haas,B., Bohme,U., Hannick,L., Aslett,M.A., Shallom,J., Marcello,L., Hou,L., Wickstead,B., Alsmark,U.C., Arrowsmith,C., Atkin,R.J., Barron,A.J., Bringaud,F., Brooks,K., Carrington,M., Cherevach,I., Chillingworth,T.J., Churcher,C., Clark,L.N., Corton,C.H., Cronin,A., Davies,R.M., Doggett,J., Djikeng,A., Feldblyum,T., Field,M.C., Fraser,A., Goodhead,I., Hance,Z., Harper,D., Harris,B.R., Hauser,H., Hostetler,J., Ivens,A., Jagels,K., Johnson,D., Johnson,J., Jones,K., Kerhornou,A.X., Koo,H., Larke,N., Landfear,S., Larkin,C., Leech,V., Line,A., Lord,A., Macleod,A., Mooney,P.J., Moule,S., Martin,D.M., Morgan,G.W., Mungall,K., Norbertczak,H., Ormond,D., Pai,G., Peacock,C.S., Peterson,J., Quail,M.A., Rabinowitsch,E., Rajandream,M.A., Reitter,C., Salzberg,S.L., Sanders,M., Schobel,S., Sharp,S., Simmonds,M., Simpson,A.J., Tallon,L., Turner,C.M., Tait,A., Tivey,A.R., Van,A.S., Walker,D., Wanless,D., Wang,S., White,B., White,O., Whitehead,S., Woodward,J., Wortman,J., Adams,M.D., Embley,T.M., Gull,K., Ullu,E., Barry,J.D., Fairlamb,A.H., Opperdoes,F., Barrell,B.G., Donelson,J.E., Hall,N., Fraser,C.M., Melville,S.E., El-Sayed,N.M., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.

Beverley,S.M., 2003. Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4, 11-19.

Blackman,M.J., 2003. RNAi in protozoan parasites: what hope for the Apicomplexa? *Protist.* 154, 177-180.

Bracha,R., Nuchamowitz,Y., Anbar,M., Mirelman,D., 2006. Transcriptional silencing of multiple genes in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *PLoS. Pathog.* 2, e48.

Bracha,R., Nuchamowitz,Y., Leippe,M., Mirelman,D., 1999. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 34, 463-472.

Bracha,R., Nuchamowitz,Y., Mirelman,D., 2003. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot. Cell* 2, 295-305.

Bustin,S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.

Carlton,J.M., Hirt,R.P., Silva,J.C., Delcher,A.L., Schatz,M., Zhao,Q., Wortman,J.R., Bidwell,S.L., Alsmark,U.C., Besteiro,S., Sicheritz-Ponten,T., Noel,C.J., Dacks,J.B., Foster,P.G., Simillion,C., Van de,P.Y., Miranda-Saavedra,D., Barton,G.J., Westrop,G.D., Muller,S., Dessi,D., Fiori,P.L., Ren,Q., Paulsen,I., Zhang,H., Bastida-Corcuera,F.D., Simoes-Barbosa,A., Brown,M.T., Hayes,R.D., Mukherjee,M., Okumura,C.Y., Schneider,R., Smith,A.J., Vanacova,S., Villalvazo,M., Haas,B.J., Pertea,M., Feldblyum,T.V., Utterback,T.R., Shu,C.L., Osoegawa,K., de Jong,P.J., Hrdy,I., Horvathova,L., Zubacova,Z., Dolezal,P., Malik,S.B., Logsdon,J.M., Jr., Henze,K., Gupta,A., Wang,C.C., Dunne,R.L., Upcroft,J.A., Upcroft,P., White,O., Salzberg,S.L., Tang,P., Chiu,C.H., Lee,Y.S., Embley,T.M., Coombs,G.H., Mottram,J.C., Tachezy,J., Fraser-Liggett,C.M., Johnson,P.J.,

2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.
- Carthew,R.W., Sontheimer,E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Carvalho,T.G., Menard,R., 2005. Manipulating the *Plasmodium* genome. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 39-55.
- Cerutti,H., Casas-Mollano,J.A., 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* 50, 81-99.
- Chakraborty,R., Dasgupta,D., Adhya,S., Basu,M.K., 1999. Cationic liposome-encapsulated antisense oligonucleotide mediates efficient killing of intracellular *Leishmania*. *Biochem. J.* 340 (Pt 2), 393-396.
- Chen,D.Q., Kolli,B.K., Yadava,N., Lu,H.G., Gilman-Sachs,A., Peterson,D.A., Chang,K.P., 2000. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 68, 80-86.
- Chu,J., Dolnick,B.J., 2002. Natural antisense (rTSalpha) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1587, 183-193.
- Clayton,C.E., 1999. Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol. Today* 15, 372-378.
- Coppel,R.L., Black,C.G., 2005. Parasite genomes. *Int. J. Parasitol.* 35, 465-479.
- Cottrell,T.R., Doering,T.L., 2003. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol.* 11, 37-43.
- Crooke,A., Diez,A., Mason,P.J., Bautista,J.M., 2006. Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase- 6-phosphogluconolactonase. *FEBS J.* 273, 1537-1546.
- Dan,M., Wang,A.L., Wang,C.C., 2000. Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Mol. Microbiol.* 36, 447-456.
- Dan,M., Wang,C.C., 2000. Role of alcohol dehydrogenase E (ADHE) in the energy metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 25-36.
- daRocha,W.D., Otsu,K., Teixeira,S.M., Donelson,J.E., 2004. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 175-186.
- Dasaradhi,P.V., Mohmmmed,A., Kumar,A., Hossain,M.J., Bhatnagar,R.K., Chauhan,V.S., Malhotra,P., 2005. A role of falcipain-2, principal cysteine proteases of *Plasmodium falciparum* in merozoite egression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1062-1068.

- Dasgupta,D., Adhya,S., Basu,M.K., 2002. The effect of beta-tubulin-specific antisense oligonucleotide encapsulated in different cationic liposomes on the suppression [correction of supression] of intracellular *L. donovani* parasites in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 23-27.
- Dastidar,P.G., Majumder,S., Lohia,A., 2007. Eh Klp5 is a divergent member of the kinesin 5 family that regulates genome content and microtubular assembly in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 9, 316-328.
- Delgadillo,M.G., Liston,D.R., Niazi,K., Johnson,P.J., 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4716-4720.
- Dias,N., Stein,C.A., 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* 1, 347-355.
- Dolezal,P., Smid,O., Rada,P., Zubacova,Z., Bursac,D., Sutak,R., Nebesarova,J., Lithgow,T., Tachezy,J., 2005. *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 10924-10929.
- Donald,R.G., Roos,D.S., 1998. Gene knock-outs and allelic replacements in *Toxoplasma gondii*: HXGPRT as a selectable marker for hit-and-run mutagenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 295-305.
- Draper,B.W., Morcos,P.A., Kimmel,C.B., 2001. Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis.* 30, 154-156.
- Drozd,M., Quijada,L., Clayton,C.E., 2002. RNA interference in trypanosomes transfected with sense and antisense plasmids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 149-152.
- Durand-Dubief,M., Kohl,L., Bastin,P., 2003. Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 11-21.
- Eid,J., Sollner-Webb,B., 1987. Efficient introduction of plasmid DNA into *Trypanosoma brucei* and transcription of a transfected chimeric gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7812-7816.
- Ekker,S.C., Larson,J.D., 2001. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis.* 30, 89-93.
- 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., Ghedin,E., Peacock,C., Bartholomeu,D.C., Haas,B.J., Tran,A.N., Wortman,J.R., Alsmark,U.C., Angiuoli,S., Anupama,A., Badger,J., Bringaud,F., Cadag,E., Carlton,J.M., Cerqueira,G.C., Creasy,T., Delcher,A.L., Djikeng,A., Embley,T.M., Hauser,C., Ivens,A.C., Kummerfeld,S.K., Pereira-Leal,J.B., Nilsson,D., Peterson,J., Salzberg,S.L., Shallom,J., Silva,J.C., Sundaram,J., Westenberger,S., White,O., Melville,S.E., Donelson,J.E., Andersson,B., Stuart,K.D., Hall,N., 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404-409.

- Elias,E.V., Quiroga,R., Gottig,N., Nakanishi,H., Nash,T.E., Neiman,A., Lujan,H.D., 2008. Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 283, 35996-36010.
- Elmendorf,H.G., Singer,S.M., Nash,T.E., 2001a. The abundance of sterile transcripts in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 29, 4674-4683.
- Elmendorf,H.G., Singer,S.M., Pierce,J., Cowan,J., Nash,T.E., 2001b. Initiator and upstream elements in the alpha2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 157-169.
- Estevez,A.M., Kierszenbaum,F., Wirtz,E., Bringaud,F., Grunstein,J., Simpson,L., 1999. Knockout of the glutamate dehydrogenase gene in bloodstream *Trypanosoma brucei* in culture has no effect on editing of mitochondrial mRNAs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 5-17.
- Faghihi,M.A., Wahlestedt,C., 2006. RNA interference is not involved in natural antisense mediated regulation of gene expression in mammals. *Genome Biol.* 7, R38.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., Mello,C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Flynt,A.S., Li,N., Thatcher,E.J., Solnica-Krezel,L., Patton,J.G., 2007. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat. Genet.* 39, 259-263.
- Foger,F., Noonpakdee,W., Loretz,B., Joojuntr,S., Salvenmoser,W., Thaler,M., Bernkop-Schnurch,A., 2006. Inhibition of malarial topoisomerase II in *Plasmodium falciparum* by antisense nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 319, 139-146.
- Fox,B.A., Ristuccia,J.G., Gigley,J.P., Bzik,D.J., 2009. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. *Eukaryot. Cell* 8, 520-529.
- Gardiner,D.L., Holt,D.C., Thomas,E.A., Kemp,D.J., Trenholme,K.R., 2000. Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 33-41.
- Gissot,M., Briquet,S., Refour,P., Boschet,C., 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.
- Gottesman,S., 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet.* 21, 399-404.
- Gueiros-Filho,F.J., Beverley,S.M., 1996. Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major*. *Mol. Cell Biol.* 16, 5655-5663.
- Gunasekera,A.M., Patankar,S., Schug,J., Eisen,G., Kissinger,J., Roos,D., Wirth,D.F., 2004. Widespread distribution of antisense transcripts in the *Plasmodium falciparum* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136, 35-42.

- Hamann,L., Buss,H., Tannich,E., 1997. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 84, 83-91.
- Hamann,L., Nickel,R., Tannich,E., 1995. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 8975-8979.
- Haseloff,J., Gerlach,W.L., 1992. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. 1988. Biotechnology 24, 264-269.
- Heasman,J., 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? Dev. Biol. 243, 209-214.
- Hehl,A.B., Marti,M., Kohler,P., 2000. Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. Mol. Biol. Cell 11, 1789-1800.
- Hotz,H.R., Hartmann,C., Huober,K., Hug,M., Clayton,C., 1997. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. Nucleic Acids Res. 25, 3017-3026.
- Ingram,A.K., Cross,G.A., Horn,D., 2000. Genetic manipulation indicates that ARD1 is an essential N(infinity)-acetyltransferase in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 111, 309-317.
- Inoue,N., Otsu,K., Ferraro,D.M., Donelson,J.E., 2002. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. Mol. Biochem. Parasitol. 120, 309-313.
- Kalmykova,A.I., Klenov,M.S., Gvozdev,V.A., 2005. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. Nucleic Acids Res. 33, 2052-2059.
- Karkare,S., Bhatnagar,D., 2006. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 575-586.
- Kaur,G., Lohia,A., 2004. Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 1118-1122.
- Keister,D.B., 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 487-488.
- Kim,K., Soldati,D., Boothroyd,J.C., 1993. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. Science 262, 911-914.
- Kiriakidou,M., Tan,G.S., Lamprinaki,S., De Planell-Saguer,M., Nelson,P.T., Mourelatos,Z., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell 129, 1141-1151.
- Kloc,M., Zearfoss,N.R., Etkin,L.D., 2002. Mechanisms of subcellular mRNA localization. Cell 108, 533-544.

- Kos,R., Tucker,R.P., Hall,R., Duong,T.D., Erickson,C.A., 2003. Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Dev. Dyn.* 226, 470-477.
- Krieger,S., Schwarz,W., Ariyanayagam,M.R., Fairlamb,A.H., Krauth-Siegel,R.L., Clayton,C., 2000. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 35, 542-552.
- Kumar,R., Adams,B., Oldenburg,A., Musiyenko,A., Barik,S., 2002. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar. J.* 1, 5.
- Laban,A., Wirth,D.F., 1989. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 9119-9123.
- Land,K.M., gadillo-Correa,M.G., Tachezy,J., Vanacova,S., Hsieh,C.L., Sutak,R., Johnson,P.J., 2004. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* 51, 115-122.
- Lauwaet,T., Davids,B.J., Torres-Escobar,A., Birkeland,S.R., Cipriano,M.J., Preheim,S.P., Palm,D., Svard,S.G., McArthur,A.G., Gillin,F.D., 2007. Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 80-89.
- Lavi,T., Siman-Tov,R., Ankri,S., 2008. EhMLBP is an essential constituent of the *Entamoeba histolytica* epigenetic machinery and a potential drug target. *Mol. Microbiol.* 69, 55-66.
- Li,H., Han,Z., Lu,Y., Lin,Y., Zhang,L., Wu,Y., Wang,H., 2004. Isolation and functional characterization of a dynamin-like gene from *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 664-671.
- Li,L., Wang,C.C., 2005. Identification in the ancient protist *Giardia lamblia* of two eukaryotic translation initiation factor 4E homologues with distinctive functions. *Eukaryot. Cell* 4, 948-959.
- Li,L., Wang,C.C., 2006. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. *Mol. Microbiol.* 59, 202-211.
- Liang,X.H., Liu,Q., Michaeli,S., 2003. Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7521-7526.
- Linford,A.S., Moreno,H., Good,K.R., Zhang,H., Singh,U., Petri,W.A., Jr., 2009. Short hairpin RNA-mediated knockdown of protein expression in *Entamoeba histolytica*. *BMC. Microbiol.* 9, 38.
- Liu,J., Valencia-Sanchez,M.A., Hannon,G.J., Parker,R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
- Liu,W., Boitz,J.M., Galazka,J., Arendt,C.S., Carter,N.S., Ullman,B., 2006. Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150, 300-307.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorenz, P., Maier, A.G., Baumgart, E., Erdmann, R., Clayton, C., 1998. Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. *EMBO J.* 17, 3542-3555.
- MacFarlane, R.C., Singh, U., 2007. Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity. *Eukaryot. Cell* 6, 2139-2146.
- Macrae, I.J., Li, F., Zhou, K., Cande, W.Z., Doudna, J.A., 2006. Structure of Dicer and Mechanistic Implications for RNAi. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 73-80.
- Malhotra, P., Dasaradhi, P.V., Kumar, A., Mohammed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R.K., 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.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., Jacq, C., 2002. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* 3, 159-164.
- Matter, N., Konig, H., 2005. Targeted 'knockdown' of spliceosome function in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 33, e41.
- McRobert, L., McConkey, G.A., 2002. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 273-278.
- Meissner, M., Brecht, S., Bujard, H., Soldati, D., 2001. Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 29, E115.
- Meissner, M., gop-Nersesian, C., Sullivan, W.J., Jr., 2007. Molecular tools for analysis of gene function in parasitic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Meissner, M., Schluter, D., Soldati, D., 2002. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298, 837-840.
- Meissner, M., Krejany, E., Gilson, P.R., de Koning-Ward, T.F., Soldati, D., Crabb, B.S., 2005. Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2980-2985
- Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mikolajczak, S.A., Aly, A.S., Dumpit, R.F., Vaughan, A.M., Kappe, S.H., 2008. An efficient strategy for gene targeting and phenotypic assessment in the *Plasmodium yoelii* rodent malaria model. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 213-216.
- Militello, K.T., Refour, P., Comeaux, C.A., Duraisingh, M.T., 2008. Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working? *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 117-126.

- Mirelman,D., Anbar,M., Bracha,R., 2008. Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*. IUBMB. Life 60, 598-604.
- Mirelman,D., Anbar,M., Nuchamowitz,Y., Bracha,R., 2006. Epigenetic silencing of gene expression in *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res. 37, 226-233.
- Mohammed,A., Dasaradhi,P.V., Bhatnagar,R.K., Chauhan,V.S., Malhotra,P., 2003. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 309, 506-511.
- Moncada,D., Keller,K., Ankri,S., Mirelman,D., Chadee,K., 2006. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. Gastroenterology 130, 721-730.
- Morcos,P.A., 2001. Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells. Genesis. 30, 94-102.
- Moshitch-Moshkovitch,S., Stolarsky,T., Petter,R., Mirelman,D., 1997. Upstream regions of rp L21 genes play a role in regulation of expression at the post-transcriptional level in *E. histolytica* and *E. dispar*. Arch. Med. Res. 28 Spec No, 36-38.
- Motyka,S.A., Englund,P.T., 2004. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. Curr. Opin. Microbiol. 7, 362-368.
- Muller,U., 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. Mech. Dev. 82, 3-21.
- Munagala,N., Wang,C.C., 2002. The pivotal role of guanine phosphoribosyltransferase in purine salvage by *Giardia lamblia*. Mol. Microbiol. 44, 1073-1079.
- Mundodi,V., Kucknoor,A.S., Alderete,J.F., 2007. Antisense RNA decreases AP33 gene expression and cytoadherence by *T. vaginalis*. BMC. Microbiol. 7, 64.
- Mundodi,V., Kucknoor,A.S., Klumpp,D.J., Chang,T.H., Alderete,J.F., 2004. Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol. 53, 1099-1108.
- Nakaar,V., Ngo,H.M., Aaronson,E.P., Coppens,I., Stedman,T.T., Joiner,K.A., 2003. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rho-trypan protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. J. Cell Sci. 116, 2311-2320.
- Nakaar,V., Samuel,B.U., Ngo,E.O., Joiner,K.A., 1999. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. J. Biol. Chem. 274, 5083-5087.
- Nasevicius,A., Ekker,S.C., 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nat. Genet. 26, 216-220.
- Ngo,H., Tschudi,C., Gull,K., Ullu,E., 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 14687-14692.

- Nickel,R., Tannich,E., 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 7095-7098.
- Noonpakdee,W., Pothikasikorn,J., Nimitsantiwong,W., Wilairat,P., 2003. Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation in vitro by antisense oligodeoxynucleotides against malarial topoisomerase II. Biochem. Biophys. Res. Commun. 302, 659-664.
- Ortiz,D., Johnson,P.J., 2003. Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 128, 43-49.
- Pandey,S., Chakraborti,P., Sharma,R., Bandyopadhyay,S., Sarkar,D., Adhya,S., 2004. Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. J. Biosci. 29, 15-22.
- 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., Berriman,M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat. Genet. 39, 839-847.
- Prucca,C.G., Slavin,I., Quiroga,R., Elias,E.V., Rivero,F.D., Saura,A., Carranza,P.G., Lujan,H.D., 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. Nature 456, 750-754.
- Pyrih, J; Tachezy, J; 2007. Techniky umlčování genů u parazitických protistů. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze
- Rada, P; Tachezy, J; 2006. Transport proteinů mitochondriálního typu *Giardia intestinalis* do hydrogenozomů *Trichomonas vaginalis*. Diplomová práce, Univerzita karlova v Praze
- Raj,D.K., Mu,J., Jiang,H., Kabat,J., Singh,S., Sullivan,M., Fay,M.P., McCutchan,T.F., Su,X.Z., 2009. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. J. Biol. Chem. 284, 7687-7696.
- Ramakrishnan,G., Vines,R.R., Mann,B.J., Petri,W.A., Jr., 1997. A tetracycline-inducible gene expression system in *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 84, 93-100.
- Rathjen,T., Nicol,C., McConkey,G., Dalmay,T., 2006. Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. FEBS Lett. 580, 5185-5188.
- Robinson,K.A., 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.
- Sahoo,N., Bhattacharya,S., Bhattacharya,A., 2003. Blocking the expression of a calcium binding protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* by tetracycline regulatable antisense-RNA. Mol. Biochem. Parasitol. 126, 281-284.

- Sanchez,R., Saralegui,A., Olivos-Garcia,A., Scapolla,C., Damonte,G., Sanchez-Lopez,R., Alagon,A., Stock,R.P., 2005. *Entamoeba histolytica*: intracellular distribution of the sec61alpha subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids. *Exp. Parasitol.* 109, 241-251.
- Saraiya,A.A., Wang,C.C., 2008. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS. Pathog.* 4, e1000224.
- Scherer,L.J., Rossi,J.J., 2003. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* 21, 1457-1465.
- Sheng,J., Al-Anouti,F., Ananvoranich,S., 2004. Engineered delta ribozymes can simultaneously knock down the expression of the genes encoding uracil phosphoribosyltransferase and hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 253-263.
- Shi,H., Djikeng,A., Tschudi,C., Ullu,E., 2004. 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., Tschudi,C., Ullu,E., 2006. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA.* 12, 2063-2072.
- Singer,S.M., Yee,J., Nash,T.E., 1998. Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 59-69.
- Soldati,D., Boothroyd,J.C., 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 260, 349-352.
- Soldati,D., Kim,K., Kampmeier,J., Dubremetz,J.F., Boothroyd,J.C., 1995. Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74, 87-97.
- Solis,C.F., Guillen,N., 2008. Silencing genes by RNA interference in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Methods Mol. Biol.* 442, 113-128.
- Somanna,A., Mundodi,V., Gedamu,L., 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* 277, 25305-25312.
- Sriwilaijaroen,N., Boonma,S., Attasart,P., Pothikasikorn,J., Panyim,S., 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.
- Stock,R.P., Olvera,A., Sanchez,R., Saralegui,A., Scarfi,S., Sanchez-Lopez,R., Ramos,M.A., Boffa,L.C., Benatti,U., Alagon,A., 2001. Inhibition of gene expression in *Entamoeba histolytica* with antisense peptide nucleic acid oligomers. *Nat. Biotechnol.* 19, 231-234.
- Subramaniam,C., Veazey,P., Redmond,S., Hayes-Sinclair,J., Chambers,E., Carrington,M., Gull,K., Matthews,K., Horn,D., Field,M.C., 2006. Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. *Eukaryot. Cell* 5, 1539-1549.

- Sugiyama,T., Cam,H., Verdel,A., Moazed,D., Grewal,S.I., 2005. RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 152-157.
- Summerton,J., 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 141-158.
- Summerton,J.E., 2005. Endo-porter: a novel reagent for safe, effective delivery of substances into cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1058, 62-75.
- Sun,C.H., Chou,C.F., Tai,J.H., 1998. Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 123-132.
- Sun,C.H., Tai,J.H., 2000. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 51-60.
- Sunil,S., Hossain,M.J., Ramasamy,G., Malhotra,P., 2008. Transient silencing of *Plasmodium falciparum* Tudor Staphylococcal Nuclease suggests an essential role for the protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 373-378.
- Teixeira,S.M., daRocha,W.D., 2003. Control of gene expression and genetic manipulation in the *Trypanosomatidae*. *Genet. Mol. Res.* 2, 148-158.
- Teixeira,S.M., Kirchhoff,L.V., Donelson,J.E., 1995. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270, 22586-22594.
- ten Asbroek,A.L., Mol,C.A., Kieft,R., Borst,P., 1993. Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 133-142.
- Touz,M.C., Conrad,J.T., Nash,T.E., 2005. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* 58, 999-1011.
- Touz,M.C., Gottig,N., Nash,T.E., Lujan,H.D., 2002. Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 277, 50557-50563.
- Touz,M.C., Kulakova,L., Nash,T.E., 2004. Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Cell* 15, 3053-3060.
- Tumova,P., Hofstetrova,K., Nohynkova,E., Hovorka,O., Kral,J., 2007. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* 116, 65-78.
- Tuteja,R., Pradhan,A., Sharma,S., 2008. *Plasmodium falciparum* signal peptidase is regulated by phosphorylation and required for intra-erythrocytic growth. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 137-147.
- Uchida,T., Rossignol,F., Matthay,M.A., Mounier,R., Couette,S., Clottes,E., Clerici,C., 2004. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-

2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* 279, 14871-14878.

Ullu,E., Lujan,H.D., Tschudi,C., 2005. Small sense and antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell* 4, 1155-1157.

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

van Dijk,M.R., Waters,A.P., Janse,C.J., 1995. Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science* 268, 1358-1362.

Vats,D., Vishwakarma,R.A., Bhattacharya,S., Bhattacharya,A., 2005. Reduction of cell surface glycosylphosphatidylinositol conjugates in *Entamoeba histolytica* by antisense blocking of *E. histolytica* GlcNAc-phosphatidylinositol deacetylase expression: effect on cell proliferation, endocytosis, and adhesion to target cells. *Infect. Immun.* 73, 8381-8392.

Vayssie,L., Vargas,M., Weber,C., Guillen,N., 2004. Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 21-28.

Vinayak,S., Sharma,Y.D., 2007. Inhibition of *Plasmodium falciparum* ispH (lytB) gene expression by hammerhead ribozyme. *Oligonucleotides.* 17, 189-200.

vis-Hayman,S.R., Nash,T.E., 2002. Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 1-7.

Wen,L.M., Xu,P., Benegal,G., Carvahao,M.R., Butler,D.R., Buck,G.A., 2001. *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. *Exp. Parasitol.* 97, 196-204.

Werner,A., Sayer,J.A., 2009. Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 343-349.

Wightman,B., Ha,I., Ruvkun,G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.

Wirtz,E., Clayton,C., 1995. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268, 1179-1183.

Wirtz,E., Hoek,M., Cross,G.A., 1998. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 26, 4626-4634.

Wu,Y., Kirkman,L.A., Wellems,T.E., 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1130-1134.

Wu,Y., Sifri,C.D., Lei,H.H., Su,X.Z., Wellems,T.E., 1995. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 973-977.

Wutz,A., Smrzka,O.W., Schweifer,N., Schellander,K., Wagner,E.F., Barlow,D.P., 1997. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389, 745-749.

- Yan,S., Myler,P.J., Stuart,K., 2001. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 112, 61-69.
- Yee,J., Nash,T.E., 1995. Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 5615-5619.
- Yu,D.C., Wang,A.L., Wang,C.C., 1996. Stable coexpression of a drug-resistance gene and a heterologous gene in an ancient parasitic protozoan *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 83, 81-91.
- Yu,D.C., Wang,A.L., Wu,C.H., Wang,C.C., 1995. Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. Mol. Cell Biol. 15, 4867-4872.
- Yu,L., Gao,Y.F., Li,X., Qiao,Z.P., Shen,J.L., 2009. Double-stranded RNA specific to adenosine kinase and hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase retards growth of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 104, 377-383.
- Yu,L., Gao,Y.F., Qiao,Z.P., Li,C.L., Li,X., Shen,J.L., 2008. *Toxoplasma gondii*: siRNA can mediate the suppression of adenosine kinase expression. Exp. Parasitol. 118, 96-102.
- Zhang,H., Ehrenkaufner,G.M., Pompey,J.M., Hackney,J.A., Singh,U., 2008. Small RNAs with 5'-polyphosphate termini associate with a Piwi-related protein and regulate gene expression in the single-celled eukaryote *Entamoeba histolytica*. PLoS. Pathog. 4, e1000219.
- Zhang,J.X., Fu,Y.C., Xu,X.Y., Wu,T.J., Cao,F.L., 2005. [RNA interference to the expression of peroxiredoxin-related genes in *Trichomonas vaginalis*]. Zhongguo Ji. Sheng Chong. Xue. Yu Ji. Sheng Chong. Bing. Za Zhi. 23, 437-440.
- Zhang,W.W., Matlashewski,G., 1997. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 8807-8811.
- Zhang,W.W., Matlashewski,G., 2000. Analysis of antisense and double stranded RNA downregulation of A2 protein expression in *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 107, 315-319.
- Zubacova,Z., Cimburek,Z., Tachezy,J., 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. Mol. Biochem. Parasitol. 161, 49-54.