

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
Katedra parazitologie

**Techniky umlčování genů
a jejich užití u parazitických protistů**

(bakalářská práce)

Jan Pyrih
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Tachezy, PhD.
Praha 2007

Poděkování: Vedoucí práce Doc. RNDr. Jan Tachezy, PhD., poskytl při zpracování práce řadu cenných rad a vytvořil podnětné tvůrčí prostředí zapojením autora práce do řešitelského týmu ve své laboratoři. Děkuji.

Praha 2.5.2007

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracoval sám a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje. Souhlasím se zapůjčováním práce.

Praha 2.5.2007

Abstrakt

Práce mapuje využívané a potenciálně využitelné techniky umlčování genů u parazitických protistů. Důraz je přitom kladen především na nové, rozvíjející se metody, jako je využití RNA interference nebo syntetických antisense oligonukleotidů. Techniky jsou popsány obecně v kapitole o částečném umlčování genů (knockdown) a úplném umlčování genů (knockout). Patří mezi ně homologní integrace, homologní rekombinace, RNA interference, použití antisense oligonukleotidů, ribozymů a DNazymů. Použití technik je demonstrováno na vybraných druzích parazitických protistů: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*.

Směrem záběru tato práce doplňuje a aktualizuje informace v pracích o této tématice doposud napsaných. Zpracovávané téma je velmi široké. Bylo tedy pojato spíše jako zevrubné ohlednutí nad konkrétně využívanými technikami, s cílem inspirovat další výzkum.

Klíčová slova: parazitické protisté, umlčování genu, knock-down, knock-out.

Abstract

Presented are gene silencing techniques which are used or could be used in parasitic protists systems. The goal is to focus to new and developing methods like RNA interference or syntetic antisense oligonucleotids schemes. Techniques are described in general in the chapter about the partial gene silencing (knockdown) and full gene silencing (knockout). The most important techniques are homolog integration, homolog recombination, RNA interference, using antisense oligonucleotides, ribozymes and DNAzymes. The usage of such techniques is demonstrated in cases of parasitic protists: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*.

The work complements and refreshes information from the results written about the subject up to now. The topic is wide. The work presents a rough overview on the techniques used and inspires the future research.

Key words: parasitic protists, gene silencing, knock-down, knock-out

Obsah

1	Studium parazitických protistů.....	8
2	Úplné a částečné umlčování genů.....	8
2.1	Rozdíly mezi částečným a úplným umlčováním.....	8
2.1.1	Umlčované molekuly.....	8
2.1.2	Umlčování esenciálních genů.....	9
2.1.2.1	Inducibilní regulace exprese.....	9
2.1.2.1.1	Represor/operátorový systém [repressor/operator system].....	9
2.1.2.1.2	Systém založený na trans-aktivátorem regulované transkripci.....	9
2.2	Úplné umlčování genů - knockout.....	10
2.2.1	Homologní integrace.....	11
2.2.2	Homologní rekombinace.....	11
2.2.2.1	Kombinace pozitivní a negativní selekce.....	11
2.2.2.2	Místně specifické rekombinázy.....	12
2.3	Částečné umlčování genu - knockdown.....	13
2.3.1	RNA interference.....	13
2.3.1.1	Charakteristika RNA interference.....	13
2.3.1.1.1	Typy krátkých dsRNA.....	15
2.3.1.2	Post-transkripční regulace exprese mRNA a obrana proti virům.....	15
2.3.1.3	Evoluce RNA interferenčních mechanismů.....	17
2.3.1.4	Využití RNA interference při umlčování genů.....	17
2.3.2	Regulace genové exprese pomocí syntetických antisense oligonukleotidů 18	
2.3.2.1	Záporně nabitě oligonukleotidy.....	19
2.3.2.2	Nenabitě oligonukleotidy.....	19
2.3.2.2.1	Morpholinové oligomery.....	20
2.3.3	Tlumení exprese pomocí ribozymů a DNAzymů.....	22
2.3.3.1	Ribozymy.....	22
2.3.3.2	DNAzymy.....	23
2.3.4	Antisense RNA techniky.....	24
3	Umlčování genů u vybraných druhů parazitických protistů.....	25
3.1	Trypanosoma brucei.....	25
3.1.1	Regulace genové exprese u čeledi trypanosomatidae.....	25
3.1.2	Transfekční systémy u Trypanosomy brucei.....	25
3.1.3	Inducibilní systémy.....	26
3.1.4	Knockout.....	26
3.1.5	RNA interference.....	26
3.1.6	Techniky antisense RNA.....	27
3.2	Leishmania donovani.....	28
3.2.1	Transfekce a inducibilní systémy.....	28
3.2.2	Knockout.....	28
3.2.3	Techniky antisense RNA.....	28
3.2.4	RNA interference.....	28

3.2.5	Antisense DNA oligonukleotidy.....	28
3.3	Plasmodium falciparum	29
3.3.1	Transfekce	29
3.3.2	Inducibilní systémy	29
3.3.3	Knockout	29
3.3.4	Antisense RNA techniky	30
3.3.5	RNA interference	31
3.3.6	Užití S-DNA antisense oligonukleotidů	31
3.4	Toxoplasma gondii	31
3.4.1	Transfekce	31
3.4.2	Inducibilní systémy	31
3.4.3	Knockout	32
3.4.4	RNA interference	32
3.4.5	Ribozymy a antisense RNA techniky	32
3.5	Giardia intestinalis.....	32
3.5.1	Transfekční techniky	32
3.5.2	Inducibilní systémy	33
3.5.3	Knockout	33
3.5.4	Ribozymy a Antisense RNA techniky	33
3.5.5	RNA interference	34
3.6	Entamoeba histolytica.....	34
3.6.1	Transfekční a inducibilní systémy	34
3.6.2	Knockout	34
3.6.3	Antisense RNA techniky.....	34
3.6.4	Inhibice PNA antisense oligomery	35
3.6.5	RNA interference	35
3.6.6	Inhibice transkripce	35
3.7	Trichomonas vaginalis.....	36
4	Závěr a hodnocení.....	36
5	Použitá literatura.....	37

1 Studium parazitických protistů

Parazitičtí protisté jsou jednobuněčné eukaryotní organismy, žijí na úkor svých hostitelů. Některé druhy patří mezi významné lidské patogeny.

Dnešní doba bývá někdy označována jako postgenomická (Achenbach *et al.*, 2003). V rámci studia skupiny parazitických protistních organismů již bylo započato více jak 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 asi u 100 genů. Sekvence genomu jich ale predikuje kolem 5200, přičemž 60% z nich není podobných genům o známé funkci 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. K tomu slouží “knockdown“ či “knockout“ genů.

2 Úplné a částečné umlčování genů

Knockout genu (úplné umlčování genu, úplná inaktivace genu) je způsob, jak úplně zamezit tvorbě produktů tohoto genu v živém organismu (Muller, 1999). Knockdown (částečné umlčování genu, částečná inaktivace genu) je způsob, kdy se tvorbě produktů genu zamezí pouze částečně (Scherer and Rossi, 2003).

2.1 Rozdíly mezi částečným a úplným umlčováním

2.1.1 Umlčované molekuly

Knockout musí 100%-ně eliminovat tvorbu produktu genu (expresi genu). Toho se dá dosáhnout eliminací DNA, která tento gen kóduje, či znemožněním její transkripce. Knockdown naproti tomu působí na RNA. Ta je buď degradována, nebo je blokována její interakce s určitými molekulami v buňce. Náročnost aplikace metod úplné eliminace exprese (knockout) je tedy závislá na počtu kopií genu v genomu. Pro knockdown je tento fakt irelevantní. Příkladem může být bičíkatý prvok *Giardia intestinalis*, který má hodně genů v genomu ve více kopiích, a proto se u něj knockout nepoužívá (vis-Hayman and Nash, 2002).

2.1.2 Umlčování esenciálních genů

Problémem při úplném umlčování genu může být jeho esencialita. V případě, že cílený gen je pro organismus nepostradatelný, nebude možné vyselektovat kulturu, která by jej neměla (Carvalho and Menard, 2005).

Při částečném umlčování genu je jeho esencialita menší problém. Míra inaktivace je menší a navíc se dá zčásti ovlivnit použitím inducibilních systémů.

2.1.2.1 Inducibilní regulace exprese

Důležitým nástrojem technik neúplného umlčování genů je inducibilní regulace exprese. Koncentrací chemických látek (induktorů) regulujeme iniciaci transkripce. Indukce exprese lze také dosáhnout užitím stádiově specifických promotorů [stage specific promoters]. Tento systém se používá např. u prvoka *Giardia intestinalis*, který začne při encystaci silně exprimovat proteiny cwp1 [cyst wall protein 1] (Hehl *et al.*, 2000).

Při umlčování genů regulujeme expresi ribozymů, antisense RNA, nebo RNA pro indukci RNA interference (Scherer and Rossi, 2003). Indukční regulace exprese má také své využití při technikách úplného umlčování genů, kde se indukuje transkripce rekombináz (Meissner *et al.*, 2007).

U parazitických protistů se nejčastěji používají následující systémy:

2.1.2.1.1 Represor/operátorový systém [repressor/operator system]

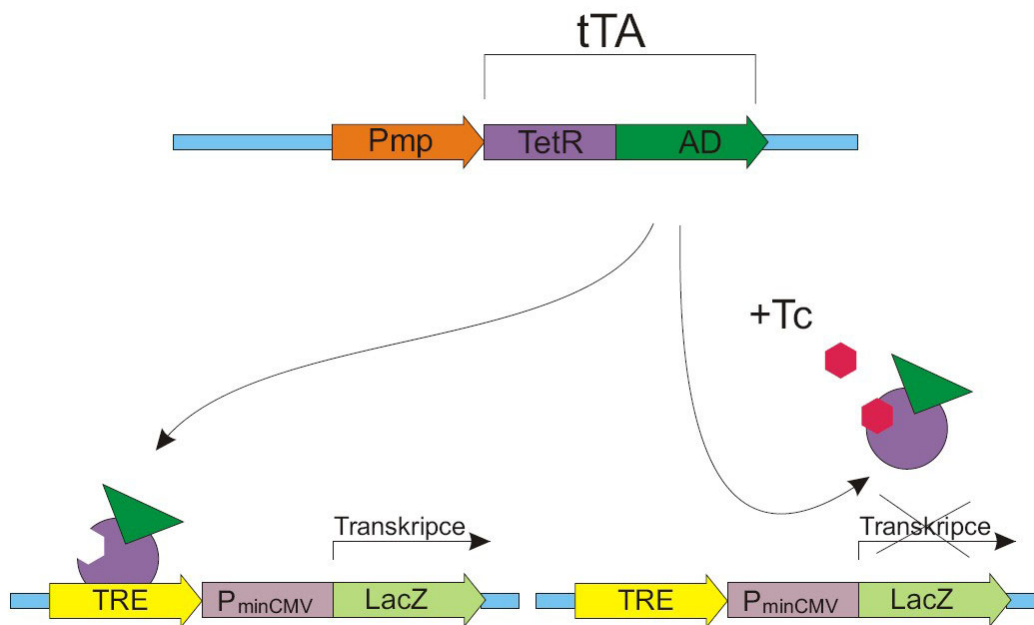
V tomto systému se využívá bakteriálních represorů, což jsou DNA vázící proteiny. Na DNA se váží ve specifické oblasti nazývané “operátor“. Tento operátor se při konstrukci vektoru umístí do oblasti promotoru, aby navázaný represor bránil transkripci. Přidáním induktorů jsme schopni vazbě těchto represorů na DNA zabránit. Změnou koncentrace přidané látky, jež inaktivuje tyto represory, jsme schopni ovlivnit míru iniciace transkripce.

Při studiu parazitických protistů se nejčastěji používá “Tet-represor/operátorový systém“ [Tet – repressor/operator system] (Meissner *et al.*, 2007).

2.1.2.1.2 Systém založený na trans-aktivátorem regulované transkripci

Druhý způsob není tak často používán, ale vyznačuje se lepšími indukčními vlastnostmi (Meissner *et al.*, 2007). Je to systém založený na trans-aktivátorem regulované transkripci [Trans-activator based system] (Obrázek 1). Sestává se z tetracyklinového represoru, který je zfúzován s transkripčním aktivátorem. Fúzovaný protein dosedá na místo tetracyklinového operátoru, který je na vláknu před speciálním promotorem. Tento promotor musí být kompatibilní s transkripčním aktivátorem, který iniciuje

počátek transkripce. Za absence tetracyklinu je fúzní protein navázán na DNA a transkripce probíhá. Po přidání tetracyklinu se z DNA odváže a transkripce se zastaví. U parazitických prvoků není tento systém příliš rozšířen. U ostatních eukaryot se často používá trans-aktivační doména (AD) z VP16 (protein z *Herpes simplex*) a minimální promotor odvozený z cytomegaloviru (pCMV), (Obrázek 1). Tato kombinace nefungovala u *T. gondii* (Meissner *et al.*, 2001b). Tento systém se u *T. gondii* podařilo úspěšně zavést nalezením vhodného trans-aktivátoru (Meissner *et al.*, 2002). Nově nalezené trans-aktivátory se nazývají TATi-1 a TATi-2. Tento systém funguje i u prvoků druhu *Plasmodium falciparum* (Meissner *et al.*, 2005).



Obrázek 1:

Schéma Trans-aktivátorového systému: Pmp promotor (Pmp) kontroluje expresi tetracyklinového trans-aktivátoru (tTA), který indukuje transkripci LacZ genu navázáním na operátor TRE [tetracycline responsive element]. Exprese genu může být blokována tetracyklinem (Tc). Vysvětlivky: AD, VP16 aktivační doména herpes simplex viru; LacZ, LacZ gen kódující β -galactosidázu; PminCMV, minimální CMV promotor; Prnp, promotor PrP genu; Tc, Tetracyklin; TetR, Tet represorový protein; tTA, tetracyklinový trans-aktivátor; TRE, tetracyklinový operátor. Převzato z Internetu [online]: Název webové stránky: The rodent brain WorkBench, dostupné na adrese: <http://ocelot.uio.no/zoomgen/prp/gene.do>; 15.4.2007.

2.2 Úplné umlčování genů - knockout

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 námi vnášená DNA navrhuje tak, aby odstranila cílený gen, či znemožnila jeho transkripci.

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.

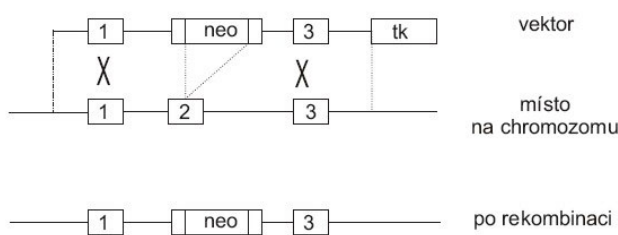
2.2.1 Homologní integrace

Inserce nezpůsobí eliminaci původní DNA, ale pouze oddálí některé její úseky, např. části jednoho genu. Tento gen je tímto inaktivován. K inserci používané vektory [insertion vectors] mají jedno místo homologie s místem v gemonu a gen pro selekci.

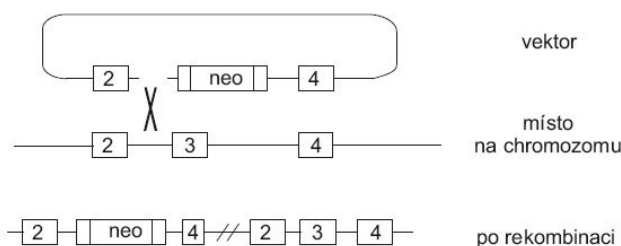
2.2.2 Homologní rekombinace

Výměnné vektory [replacement vectors] způsobují reciprokou výměnu cílové sekvence za exogenní. Dochází k dvojitému crossing overu. Na vektoru musí být 2 místa homologie, mezi které je vložena nehomologní sekvence. Tato nehomologní sekvence obsahuje selekční gen.

A : Vektor výměnného typu



B : Vektor inserčního typu



Převzato a upraveno; (Muller, 1999)

Obrázek 2:

- A) Vektor výměnného typu: Druhý exon cíleného genu je nahrazen pozitivním selekčním genem pro neomycinovou rezistenci (neo) procesem homologní rekombinace. Výměnný vektor je linearizovaný. Negativní selekční gen - Gen pro HVS tymidinovou kinázu [HVS thymidin kinase] (na obrázku tk) je procesem homologní rekombinace ztracen.
- B) Vektor inserčního typu: vektor je linearizován uvnitř oblasti homologie, mezi exonem 2 a 3. Exon 3 v sobě nese gen pro neomycinovou rezistenci. Tenká čára znázorňuje sekvenci plasmidu.

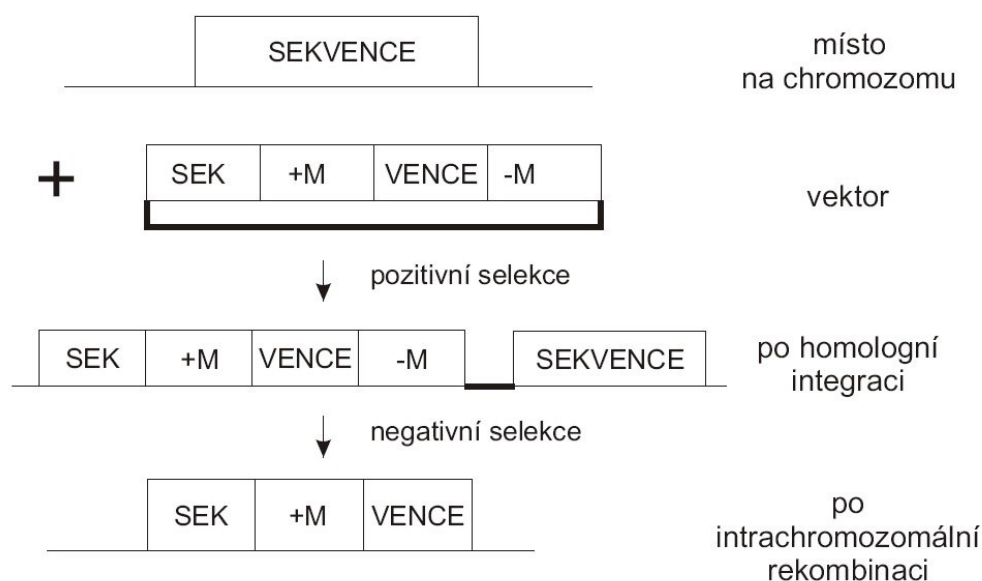
Vysvětlivky: exony jsou znázorněny čísly.

2.2.2.1 Kombinace pozitivní a negativní selekce

Pozitivní selekce zvyhodňuje buňky, které exprimují pozitivní selekční gen, negativní selekce znevýhodňuje buňky, které exprimují negativní selekční gen.

Kombinace těchto technik se používá pro selekci buněk, u kterých došlo k homologní rekombinaci a umožní eliminovat buňky, u nichž došlo pouze k integraci (Carvalho and Menard, 2005). Postupuje se buď jednostupňově (Obrázek 2A), anebo ve dvou krocích (nejprve se pozitivní selekcí vyselektují buňky u nichž došlo k homologní integraci a poté se z nich selektují negativní selekcí buňky, u nichž došlo ke spontánní rekombinaci na chromozomu) (Obrázek 3).

V případě transfekce cirkulárním plasmidem může negativní selekce působit i na buňky, které by plasmid replikovaly episomálně (Obrázek 2A).



Obrázek 3:

Pozitivní a následná negativní selekce:

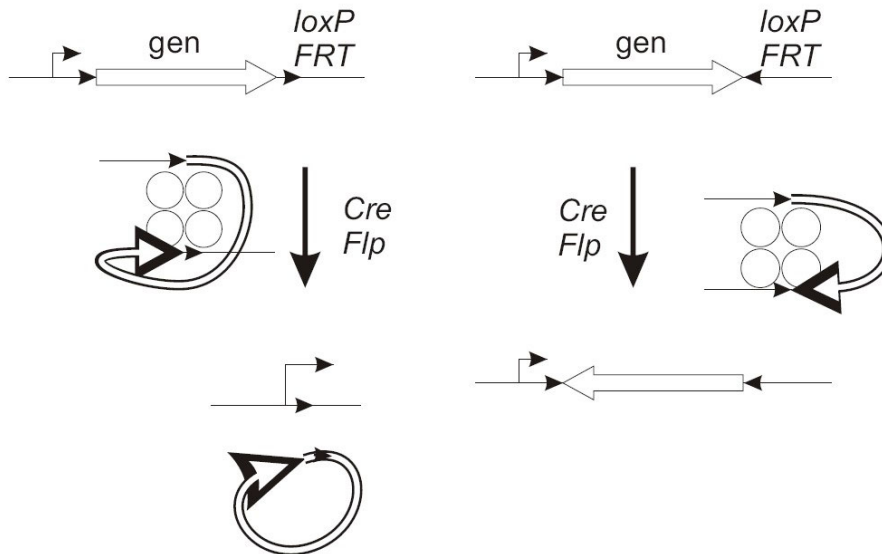
Pozitivní selekcí došlo k vyselektování jedinců, u nichž došlo k homologní integraci. Negativní selekcí se selektovaly buňky, u nichž došlo k intrachromosomální rekombinaci a vyštěpení části sekvence.

Vysvětlivky: +M, pozitivní selekční gen; -M, negativní selekční gen; písmena SEKVENCE znázorňují konkrétní sekvence DNA, silná čára znázorňuje plasmidovou DNA.

Převzato a upraveno, (Carvalho and Menard, 2005).

2.2.2.2 Místně specifické rekombinázy

V těchto systémech se využívá speciálních enzymů, rekombináz, které jsou schopny katalyzovat intrachromosomální rekombinaci specifických DNA sekvencí (Obrázek 4). Když je exprese těchto enzymů řízena, používá se rekombináz k indukci genové delece. Tyto techniky jsou podmíněny předchozím vnesením míst, které rekombinázy rozeznávají (Meissner *et al.*, 2007).



Obrázek 4: Cre-lox systém nebo FLP/Frt systém
 FRT je místo rozeznávané FLP rekombinázou. Alternativně, loxP je místo rozeznávané Cre rekombinázou. Rekombinázy vyšťepí sekvenci mezi dvěma rozeznávanými místy, popřípadě tuto sekvenci obrátí. Vysvětlivky: \blacktriangle loxP nebo FRT; \odot Cre nebo FLP rekombináza; \curvearrowright promotor
 Převzato a upraveno, (Meissner *et al.*, 2007).

2.3 Částečné umlčování genu - knockdown

K neúplnému umlčování genů se používají antisense RNA molekuly (či jejich analogy) ke komplementárnímu navázání na cílenou RNA (Scherer and Rossi, 2003). Toto navázání může mít za následek degradaci cílené RNA (na RNáze H závislé antisense oligonukleotidy, dsRNA, ribozymy a DNazymy), nebo pouze blokadu interakcí RNA s jinými molekulami (na RNáze H nezávislé antisense oligonukleotidy, antisense RNA). Efektory v degračních drahách mohou být RNáza H, RISC komplex v případě RNA interference nebo samotné ribozymy a DNazymy. Blokační typ antisense molekul znemožňuje sestřih [splicing], transport z jádra nebo translaci (Scherer and Rossi, 2003). K částečnému umlčování exprese se používá i výměna původního promotoru genu na chromozomu za indukibilní promotor pomocí homologní rekombinace (Meissner *et al.*, 2007).

2.3.1 RNA interference

2.3.1.1 Charakteristika RNA interference

RNA interference (RNAi) je přirozená regulační dráha. Buňka při ní využívá specifického párování krátkých oligonukleotidů RNA [sRNA, short RNA] k různým RNA, jež se v buňce mohou vyskytovat. Někteří autoři dokonce poukazují na možnost přímé vazby sRNA molekul na DNA (Baulcombe, 2005; Matzke and Birchler, 2005b).

Ústředním prvkem RNA interference je dvouvláknová RNA [dsRNA, double strain RNA]. Tato dsRNA se štěpí pomocí enzymu zvaného Dicer. Výsledkem jsou 21-28 nukleotidů dlouhé dsRNA, jež mají dva nukleotidy dlouhé přesahy na 3' koncích. Dvouvláknová RNA je poté za pomoci helikáz rozvolněna. Jedno její vlákno slouží k navádění efektorového komplexu, na který se váže prostřednictvím RNA vázícího proteinu Argonaut (Ago). Toto vlákno pak tento komplex zacílí na komplementární RNA, jež je potom v závislosti na druhu komplexu upravena (Baulcombe, 2005).

Role dsRNA při tlumení mRNA byla poprvé popsána roku 1998 u hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). RNA interference byla poté objevena u mnoha dalších eukaryontních organismů a dnes víme o její existenci u prvoků i u člověka (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Nález tohoto buněčného procesu dopomohl odhalení mnoha dsRNA závislých regulačních mechanismů na úrovni buňky (Matzke and Birchler, 2005a) i celého organismu (Baulcombe, 2004; Fire *et al.*, 1998).

RNAi se uplatňuje jako obrana proti virové infekci nebo šíření mobilních elementů v genomu (Baulcombe, 2004). Dokáže pretranskripčně (Schramke and Allshire, 2003) i postranskripčně (Chu and Rana, 2006) regulovat genovou expresi. Remodeluje chromatin, především metylaci histonů (Baulcombe, 2005; Lippman and Martienssen, 2004; Matzke and Birchler, 2005c; Sugiyama *et al.*, 2005) a je nezbytná pro mitotickou segregaci chromozomů (Sugiyama *et al.*, 2005). RNAi umlčuje expresi nespárovaných genů při meióze (Shiu *et al.*, 2001). Zajímavý fenomén je i popsaná DNA eliminace u *Tetrahymena thermophila* (Mochizuki and Gorovsky, 2004). Tato dráha navíc umožňuje epigenetický přenos informace díky přenosu RNA do dceřiných buněk (Sugiyama *et al.*, 2005; Vagin *et al.*, 2006). RNA interference má velký význam při ontogenetickém vývoji (Ambros, 2004; Wienholds and Plasterk, 2005).

Genom kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* obsahuje pouze jednu kopii každého z genů, které kódují klíčové proteiny RNAi (Dicer, RNA-dependentní RNA polymeráza a Argonaut). U jiných organismů se však často vyskytuje více paralogů těchto genů (Tabulka 1). Jejich počet indikuje možnou rozrůzněnost rolí těchto proteinů v různých RNA interferenčních procesech (Matzke and Birchler, 2005a).

Protein	Organismus					
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>
Dicer	4	2	1	1	2	1
RdRp	6	3	1	4	0	0
Argonaut	10	2	1	27	5	8

Tabulka 1

Tabulka shrnující počet jednotlivých klíčových proteinů RNA interferenční dráhy u vybraných druhů. Vysvětlivky: RdRp, RNA dependentní RNA; data převzaty z (Matzke and Birchler, 2005d).

2.3.1.1.1 Typy krátkých dsRNA

Známe několik typů krátkých dsRNA. Liší se především délkou, procesem vzniku a také sekvencí, jež je velmi důležitá právě pro asociaci dsRNA s Ago proteinem (Aigner, 2006; Baulcombe, 2004; Reynolds *et al.*, 2004).

Nejčastěji zmiňovanými krátkými dsRNA jsou miRNA [micro RNA] a siRNA [small interfering RNA].

miRNA

miRNA jsou endogenního původu (z jádra buňky). Vznikají transkripcí RNA polymerázou II. Jejich prekurzory jsou dlouhé jednovláknové RNA vlásenky (pri-miRNA). Tyto vlásenky jsou štěpeny jadernou RNázou "Drosha" na kratší vlásenky (pre-miRNA). Pre-miRNA jsou poté exportovány z jádra a v cytoplasmě štěpeny enzymem Dicer na krátké dsRNA. Slouží především k translační represi mRNA, méně pak i jako mediátory štěpení (Baulcombe, 2005; Wienholds and Plasterk, 2005). Vyskytují se hojně u živočichů a u rostlin, ale chybí např. u *Trypanosoma brucei* (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). U živočichů se vyznačují nepřesným párováním s cílovou mRNA. Odhaduje se, že jedna miRNA molekula může zprostředkovávat represi sta různých mRNA (Baulcombe, 2005). Počet různých miRNA se u člověka odhaduje na 200-250 (Lim *et al.*, 2003). Komplexy mRNA s RISC, vázícím miRNA, jsou v buňkách lokalizované. Tato místa v buňce se nazývají P-tělíska [P-bodies] (Liu *et al.*, 2005).

siRNA

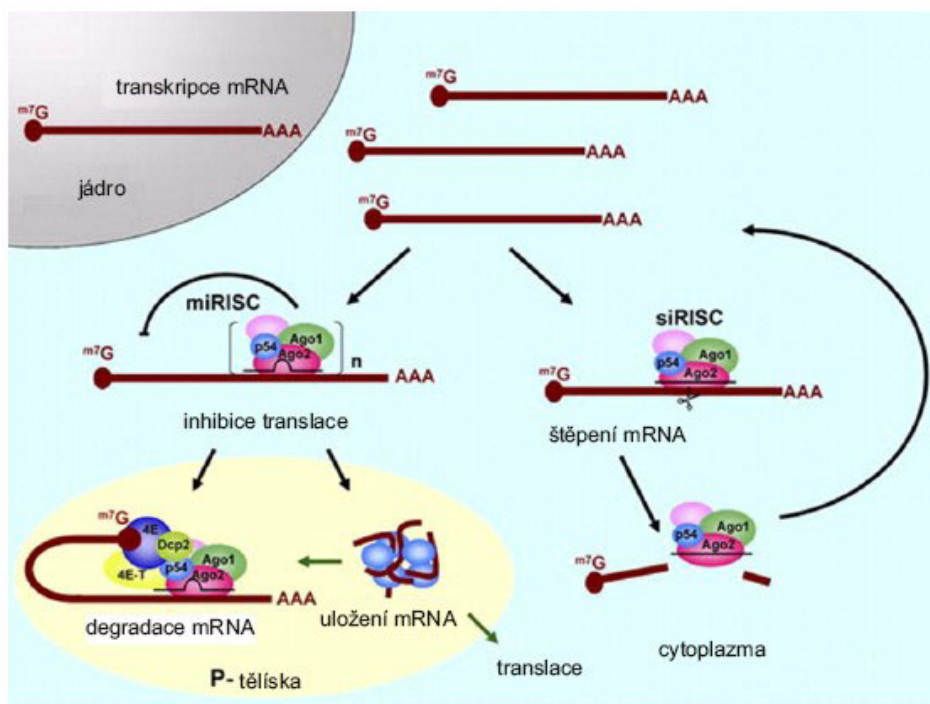
siRNA jsou buď exogenního, nebo endogenního původu. Vyznačují se přesným párováním a slouží ke štěpení mRNA či jiné RNA (např. virového původu).

2.3.1.2 Post-transkripční regulace exprese mRNA a obrana proti virům

Pro knockdown jsou důležité RNAi mechanismy probíhající v cytoplasmě. Je to regulace exprese vlastní RNA (post-transkripční umlčování genů) [posttranscriptional gene silencing, PTGS] a obrana proti cizí virové RNA. Expresi mRNA většinou regulují miRNA. Exogenní dsRNA dává vznik siRNA.

Obou drah inhibice mRNA se účastní efektorový komplex RISC.

Komplex RISC s navázanou miRNA pouze zamezí translaci mRNA. mRNA je s celým komplexem skladována v P-tělískách a později může být buď degradována, nebo uvolněna z tohoto komplexu (Chu and Rana, 2006; Liu *et al.*, 2005). V případě komplexu RISC s navázanou siRNA dojde ke štěpení cílové RNA (Obrázek 5).

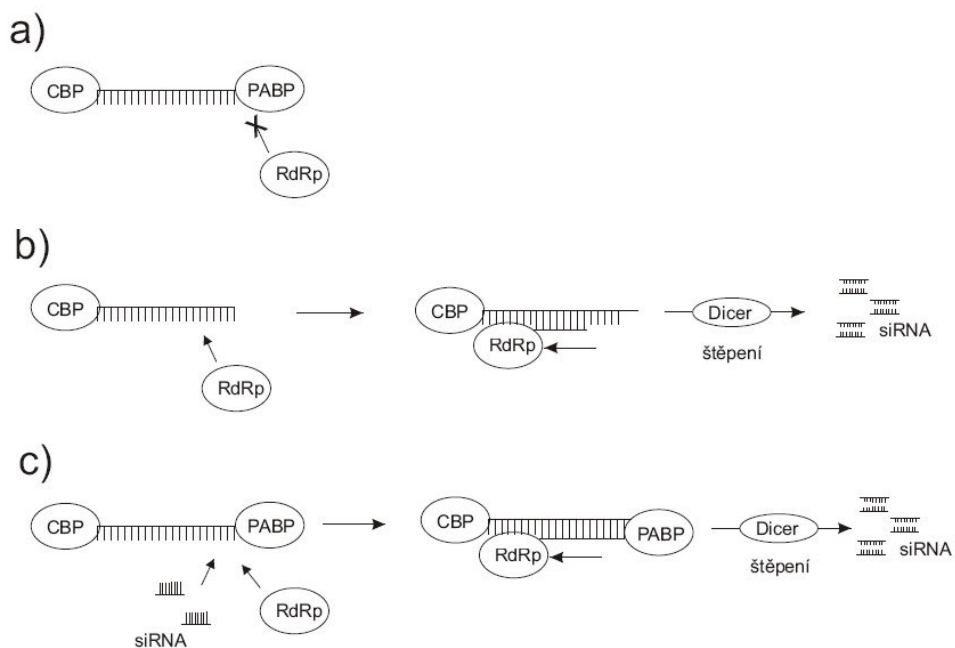


Obrázek 5: Post-transkripční umlčování exprese mRNA komplexem RISC v lidských buňkách; RISC komplex s navázanou siRNA (siRISC) vyžaduje přesné párování nukleotidových bází siRNA s cílenou mRNA. Po rozštěpení se komplex recykluje. Štěpení nevyžaduje přítomnost P-tělísk. RISC komplex s navázanou miRNA (miRISC) na rozdíl od siRISC nevyžaduje přesné párování s cílovou RNA. miRNA vytváří sekundární strukturu, jež znemožňuje štěpení. Tyto komplexy se akumulují v P-tělískách a zde dochází k inhibici jejich translace. Inhibované mRNA jsou zde skladovány nebo dochází k jejich destrukci. V závislosti na kondici buňky může mRNA skladovaná v P-tělískách opět vstoupit do translačního procesu. Vysvětlivky: miRISC, komplex RISC s navázanou miRNA; siRISC, komplex RISC s navázanou siRNA. Převzato a upraveno, (Chu and Rana, 2006).

Velmi důležitou modifikací RNA degradačního mechanismu je řetězová amplifikace tvorby dsRNA pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp). Ta nasedá na rozštěpené RNA, které nemají polyA konec, a dosyntetizuje druhý řetězec, čímž z nich udělá opět dsRNA (na primerech nezávislá syntéza). Iniciaci polymerace mohou umožnit i nasednuté fragmenty rozštěpených RNA molekul, které slouží jako primery (Obrázek 6).

RdRp se vyskytuje například u *C. elegans*, rostlin a mnoha dalších organismů (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). U *C. elegans* stačily v průměru jen 2 molekuly dsRNA na buňku, aby došlo k úspěšnému utlumení tvorby “Unce 22“ proteinu (Fire *et al.*, 1998). RNAi efekt se u některých organismů přenáší i mezi buňkami, nejspíše jako odpověď na virovou infekci. RdRp při tom hraje významnou roli. U *C. elegans* přetrvál RNAi efekt po vpravení dsRNA do střeva až do F2 generace (Fire *et al.*, 1998).

RdRp ani její homology nebyly nalezeny u savců (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Sugiyama *et al.*, 2005).



Obrázek 6:

Mechanismus Akce RdRp v rostlinách.

- a) Molekuly RNA nejsou templátem pro RdRp (RDR). "Cap-binding protein" (CBP) a "poly-adenosine-binding protein" (PABP) pravděpodobně zabraňují přístupu RdRp k RNA.
- b) Na fragmentu RNA chybí PABP protein, probíhá tvorba dsRNA.
- c) siRNA slouží jako primery, umožňující přepis RNA molekul a tvorbu dsRNA.

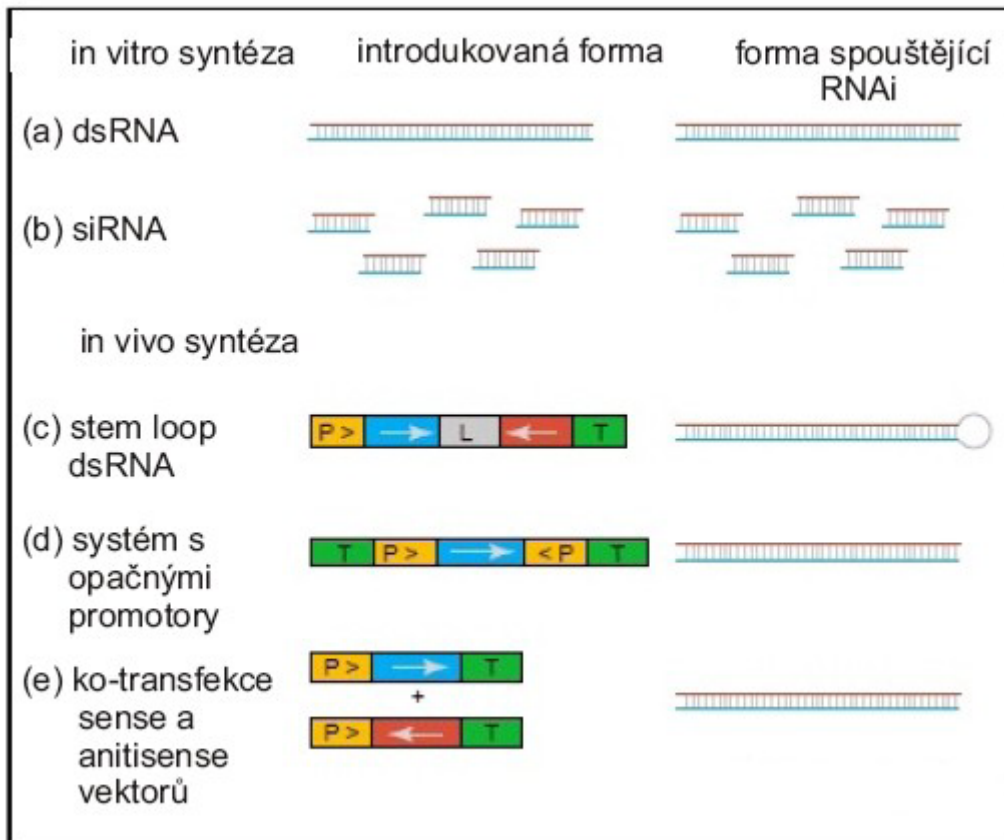
Obrázek přejat a upraven; (Baulcombe, 2004).

2.3.1.3 Evoluce RNA interferenčních mechanismů

RNA interference se vyskytuje ve všech hlavních eukaryotických liniích (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). U jednotlivých skupin se však liší zastoupením jednotlivých komponent a jejich uplatněním. Analogická dráha byla nalezena i v prokaryotické říši (Bagasra and Prilliman, 2004; Franch *et al.*, 1999; Kemmer and Neubauer, 2006). Bylo ukázáno, že v buňce zastává mnoho funkcí. Je evidentní, že se mezi sebou organismy v zastoupení mnohých RNA interferenčních drah liší (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Meister and Tuschl, 2004). Tato rozdílnost může nastat i u velmi příbuzných druhů jako je např. *Trypanosoma brucei* a *Leishmania donovani* (Teixeira and daRocha, 2003).

2.3.1.4 Využití RNA interference při umlčování genů

Při umlčování genů se užívají dsRNA molekuly, které fungují jako prostředník ke štěpení cílové mRNA. dsRNA se syntetizuje in vitro a poté je vpravena do buněk, nebo se tvoří v buňce transkripcí na vložených plasmidech (Scherer and Rossi, 2003) (Obrázek 7).



Obrázek 7: Zdroje dsRNA pro RNA interferenci dsRNA může v organismu vzniknout transkripcí vložených konstruktů, nebo může být vytvořena in vitro a teprve pak dopravena do buňky. Vysvětlivky: P, promotor (šipka ukazuje směr transkripce); T, terminátor; L, sekvence smyčky; modrá a červená pole jsou oblasti DNA identické s umlčovaným genem, modré a červené oblasti mají stejnou sekvenci, odlišná barva znázorňuje sense a antisense směr, převzato a upraveno; (Cottrell and Doering, 2003).

2.3.2 Regulace genové exprese pomocí syntetických antisense oligonukleotidů

Syntetické antisense oligonukleotidy jsou krátké modifikované jednovláknové molekuly DNA. Obvykle mají jen 13-25 nukleotidů. Jsou komplementární k cílené RNA molekule a inaktivují ji degradačními nebo stericky blokujícími mechanismy (Dias and Stein, 2002). Tyto antisense oligonukleotidy dělíme na nabitě (záporně) a na nenabitě molekuly (Obrázek 8).

2.3.2.1 Záporně nabitě oligonukleotidy

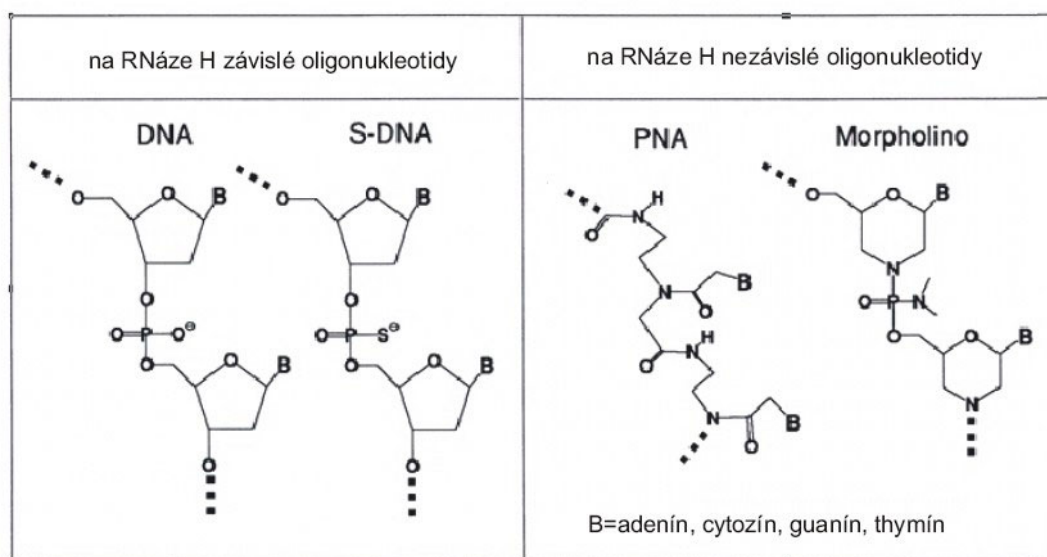
Záporně nabitě syntetické oligonukleotidy jsou po navázání na komplementární vlákno RNA rozeznávány buněčným enzymem "RNáza H", který je nedokáže odlišit od DNA. RNáza H poté degraduje vlákno RNA a syntetické oligonukleotidy se recyklují. RNáza H je jaderný enzym nacházející se u většiny eukaryontních buněk (Achenbach *et al.*, 2003). Slouží jako protivirová ochrana a štěpí vlákno RNA v duplexu vláken RNA/DNA. Mezi velmi často používané oligonukleotidy patří S-DNA. V jejich struktuře tvoří síra (S) náhradu za jeden kyslík u fosfátů. S-DNA byly použity např. pro inhibici růstu prvoka *Plasmodium falciparum* (Noonpakdee *et al.*, 2003).

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

2.3.2.2 Nenabitě oligonukleotidy

Druhá skupina oligomerů nemá záporný náboj a je na RNáze H nezávislá. Nenabitě oligomery jsou hůře rozpustné ve fyziologickém prostředí, ale jsou stabilnější vůči enzymatické degradaci. S tím souvisí i menší výskyt nespecifických efektů (inhibice jiných mRNA) než u nabitých molekul. Mechanismem jejich účinku je sterické blokování RNA. PNA oligomery [PNA, peptide nucleic acids] (viz níže) dokonce dokáží tvořit triplexy PNA/DNA/DNA a tak bránit transkripci genů DNA dependentní RNA polymeráze (Boffa *et al.*, 1996; Karkare and Bhatnagar, 2006).

Užívané oligonukleotidy jsou PNA, morpholinové oligomery, LNA [LNA, locked nucleic acids], 2'-O-metyl či 2'-O-allyl oligonukleotidy, metylfosfonáty atd. (Dias and Stein, 2002; Karkare and Bhatnagar, 2006; Summerton, 1999). Nenabitě oligomery bývají vysoce specifické. Nejsou degradovány buněčnými enzymy a ani nejsou pro buňku toxické. Navíc jsou velmi stabilní a váží se silně na mRNA (Karkare and Bhatnagar, 2006).



Obrázek 8: Vybrané na RNáze H dependentní a na RNáze H independentní oligonukleotidy (Summerton, 1999).

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

Syntetické antisense oligonukleotidy se nejčastěji používají ve vývojové biologii. Zygoty často neprovádějí transkripci až do dosažení mnohobuněčného stádia (Heasman, 2002). Např. při vývinu vajíčka drápatky *Xenopus leavis* dochází k transkripci až ve stádiu 4000 buněk (Heasman, 2002). V tomto případě nemůže dojít k odpovědi na knockdown mechanismem zpětné vazby (zvyšování transkripce daného genu). Navíc se degradovaná mRNA nedoplňuje.

2.3.2.2.1 Morpholinové oligomery

Morpholinové oligomery (morpholina) patří do skupiny stericky blokujících oligonukleotidů a na jejich příkladu se dají dobře demonstrovat některé znaky této skupiny. Morpholina dokáží specificky blokovat translaci či splicing mRNA.

- **Struktura**

Jsou to obvykle 25 bází dlouhé oligomery, jež se párují s komplementárními RNA. Morpholino má klasické báze (adenín, thymín, cytosín a guanín). Tyto báze se však namísto ribózy či deoxyribózy váží k morpholinovým kruhům a namísto fosfátů jsou propojeny fosfordiamidátovými skupinami. Díky takto upravené struktuře jsou morpholinové oligomery za fyziologických podmínek bez náboje.

- **Vlastnosti**

Morpholina nezpůsobují degradaci cílené RNA. Místo toho se na ni pevně vážou a vytěsňují z této vazby ostatní molekuly. Morpholino se váže na RNA silněji než samotná RNA. To mu dává jedinečnou schopnost rozvolňovat případné sekundární struktury cílených RNA (Summerton, 1999) (Obrázek 9). Tato vlastnost usnadňuje přípravu morpholinových oligomerů a posouvá odhad úspěšnosti represe zvolené oligonukleotidy až k 80% (Gene Tools, LLC: Choosing the Optimal Target, [online] <http://www.gene-tools.com/node/18>; 15.4.2007). V jedné studii bylo kupříkladu úspěšných devět z devíti testovaných morpholinových oligomerů (Nasevicius and Ekker, 2000).

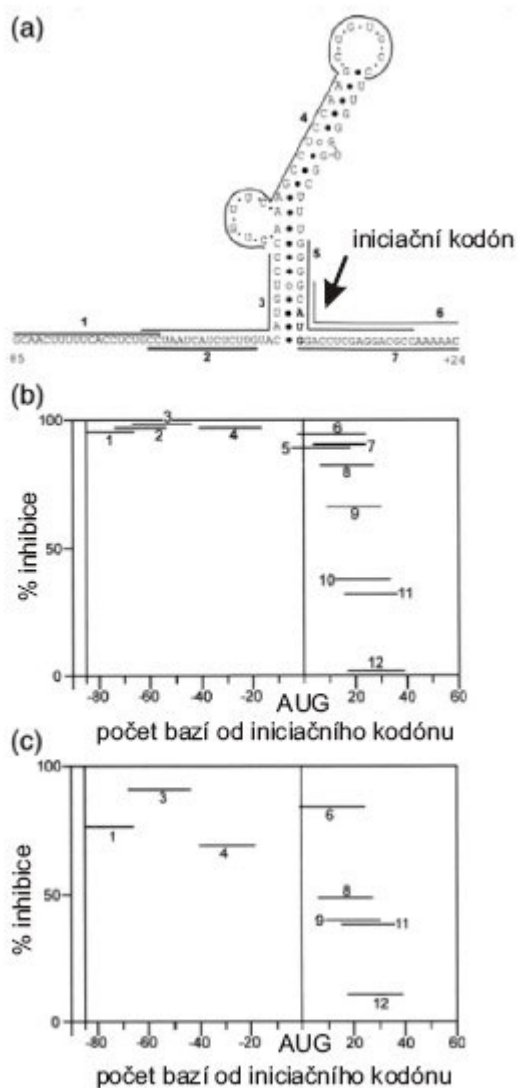
Pevnost vazby morpholina na cílenou RNA je větší než u některých RNA vázajících proteinů, a proto může vazbou na RNA efektivně blokovat iniciaci translace, splicing RNA či procesování miRNA. V případě blokace translace jsou úspěšná morpholina zacílená do oblasti iniciačního kodónu (Summerton, 1999) (Obrázek 9).

Morpholiny jsou za fyziologických podmínek dobře rozpustné. Jejich rozpustnost výrazně klesá při obsahu guaninu nad 36% a při výskytu více jak 3 guaninových bází vedle sebe (Heasman, 2002).

Vlastnosti morpholiny jsou velká stabilita vůči enzymatické degradaci (Hudziak *et al.*, 1996) či stabilita ve fyziologických podmínkách (Youngblood *et al.*, 2007).

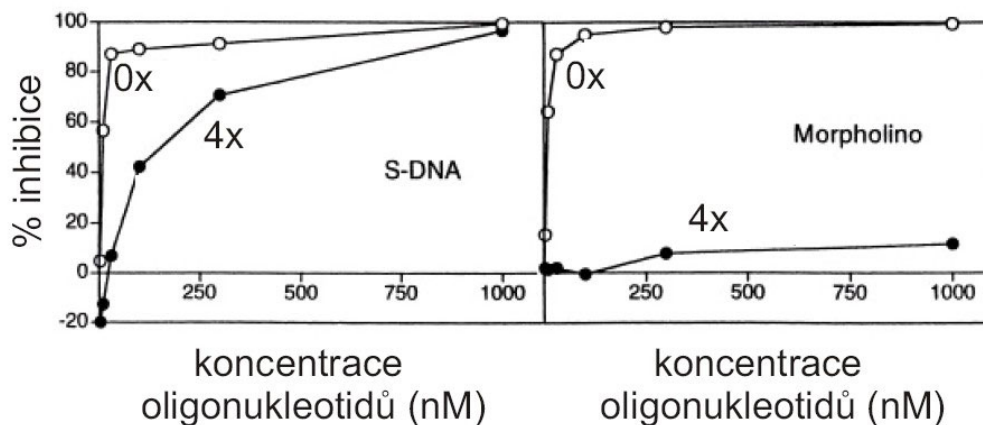
Morpholino není buněčnými enzymy rozeznáváno a nemůže vyvolat buněčnou imunitní odpověď. Přesto se však mohou vyskytnout případy nespecifických účinků. To bylo pozorováno při studiu nervového systému u ryby *Danio rerio*, kde morpholino aktivovalo apoptózu ve 3-18 % případech v závislosti na zvolené koncentraci (Ekker and Larson, 2001).

Morpholino je vysoce specifické a tuto specifitu si udržuje i při vysokých koncentracích (Summerton, 1999) (Obrázek 10).



Obrázek 9: Inhibice translace mRNA. Závislost inhibice mRNA na pozici morpholinového oligomeru.

- a) mRNA se znázorněným zacílením prvních 7 oligomerů (silné čáry).
 - b) Percentuální inhibice translace *in vitro* translačním systémem. Na ose x je počet nukleotidových bází od iniciačního kodónu. Na ose y je naměřená inhibice exprese mRNA v %. Čísly 1-12 jsou znázorněny jednotlivé oligonukleotidy.
 - c) Inhibice translace v kultuře HELa buněk exprimující mRNA HBV/luciferázy.
- Převzato a upraveno dle (Summerton, 1999).



Obrázek 10: Sekvenčně specifická inhibice mRNA globin/luciferázy *in vitro* translačním systémem. Byla srovnávána specifita inhibice mezi S-DNA oligomery a morpholinovými oligomery při jejich různých koncentracích.

Prázdné kroužky znázorňují inhibici 100% se párujících oligonukleotidů. Vyplněné kroužky znázorňují inhibici oligonukleotidů se čtyřmi nepárujícími se bázemi. Oba oligonukleotidy byly 25 bp dlouhé. Levý graf znázorňuje inhibici S-DNA oligonukleotidem. Pravý graf inhibici morpholinem. Na ose x grafů je koncentrace oligomerů a na ose y procenta inhibice.

Převzato a upraveno; (Summerton, 1999).

- **Využití**

Morpholína se využívají při výzkumu procesování miRNA (Flynt *et al.*, 2007), mRNA splicingu (Draper *et al.*, 2001) (Obrázek 11), a především jako blokačního činidla translace.

Morpholino již bylo vpraveno do vajíčka ježovky, dáňka, drápatky, kuřete i octomilky. Morpholino je využitelné i při studiu buněčných kultur (Morcos, 2001; Summerton, 1999).

2.3.3 Tlumení exprese pomocí ribozymů a DNAzymů

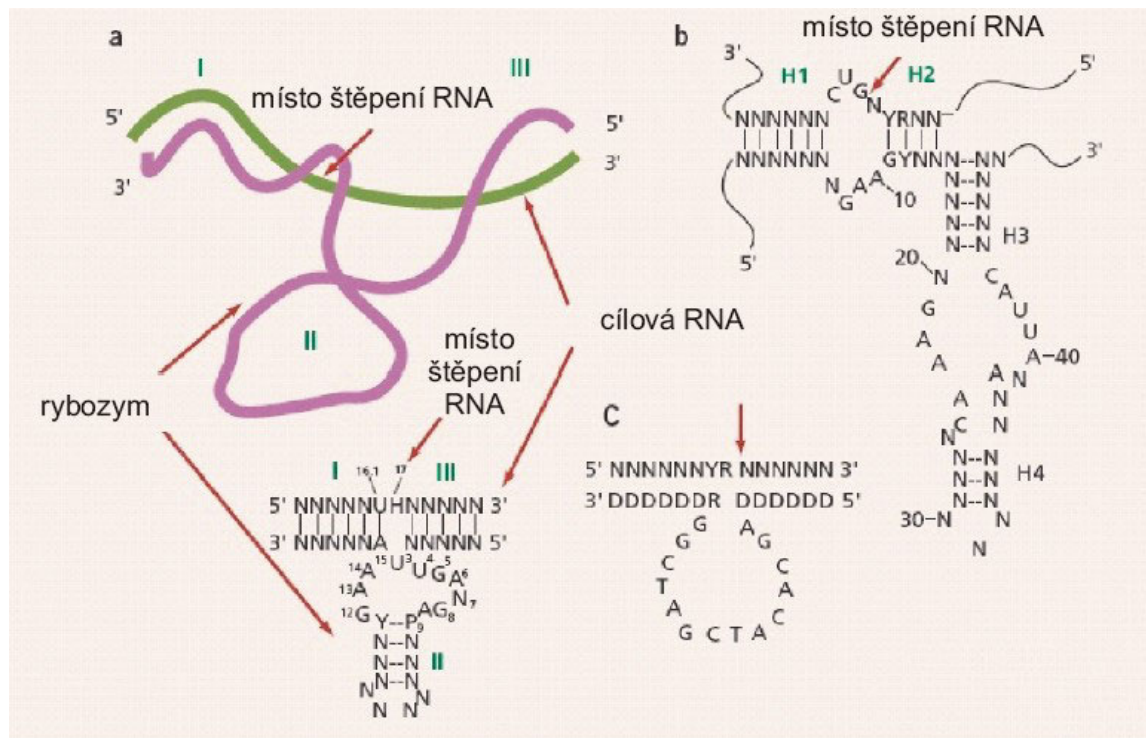
2.3.3.1 Ribozymy

Ribozymy jsou RNA molekuly s enzymatickou aktivitou. Pro knockdown se využívají ribozymy s RNA endonukleázovou aktivitou. Rozeznáváme 2 typy, oba jsou odvozeny od malých patogenních rostlinných RNA molekul (Scherer and Rossi, 2003). Prvním je hammerhead ribozym a druhým hairpin ribozym (nebo také paper clip ribozym) (Haseloff and Gerlach, 1992). Schematické nákresy obou těchto ribozymů včetně znázornění místa štěpení cílové mRNA jsou na Obrázku 11. Tyto ribozymy mají katalytické jádro a 2 ramena, jež slouží k vysoce specifickému zacílení na antisense vlákno mRNA (Scherer and Rossi, 2003).

Při inhibici ADHE proteinu prvoka *Giardia intestinalis* byly 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).

2.3.3.2 DNazymy

Mezi katalyticky účinné nukleové kyseliny patří i DNazymy. Jsou umělého původu, v přírodě zatím nebyly nalezeny (Santoro and Joyce, 1997). Mají obdobnou strukturu a mechanismus štěpícího účinku jako ribozymy. Specificky štěpí cílovou mRNA. Mají dobré katalytické vlastnosti (Cairns *et al.*, 2002) a již byly úspěšně použity v in vivo systémech (Scherer and Rossi, 2003). Na rozdíl od ribozymů nemohou být vytvářeny v buňce a musí se do buňky vpravit. Schéma DNazymu je na Obrázku 11.



Obrázek 11: Zobecněné schéma hammerhead ribozymu, hairpin ribozymu a DNazymu.

- Hammerhead ribozyme vážící vlákno cílené RNA.
- Hairpin ribozyme vážící RNA.
- DNazyme vážící RNA.

Vysvětlivky: N je A,C,G nebo U; H je A,C nebo U; šipka znamená místo štěpení, D znamená DNA (A,G, C, T); Y pirimidiny, R puriny.

Převzato a upraveno z (Scherer and Rossi, 2003) .

2.3.4 Antisense RNA techniky

Tato technika umlčování genů tkví v produkci dlouhé antisense RNA, která je komplementární k cílené mRNA. Mechanismus snižování exprese není zcela objasněn (Carvalho and Menard, 2005; Gardiner *et al.*, 2000a). Za pozorované snižování exprese může být zodpovědná jak RNA interference, tak i potenciální hybridizace sense a antisense vlákn. Tato hybridizace by mohla zapříčinit konformační změnu mRNA a tím i změnu její stability, schopnosti podstoupit procesování mRNA, transport nebo translaci (Carvalho and Menard, 2005). Možnost, že tento mechanismus je na RNAi nezávislý, je důvodem, proč je zde tato metoda umlčování genů uváděna zvlášť.

Zajímavá je situace u prvoka *Trypanosoma brucei*. U tohoto druhu je RNA interference běžným nástrojem pro knockdown (Motyka and Englund, 2004). Naproti tomu pokusy o snížení hladiny mRNA pomocí antisense vlákna často končí nezdarem (Bastin *et al.*, 1998; Drozd *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2000).

Drozd (2002) provedl pokus, v němž porovnával vliv exprese sense a antisense vlákna na hladinu mRNA cíleného genu u *T. brucei*. Transfekce samotných plasmidů exprimující sense nebo antisense vlákna nevedla k žádné inhibici (v případě sense vlákna) anebo velmi malé inhibici (v případě antisense vlákna). Překvapivě při kotransfekci plasmidů byla pozorována silná inhibice. Autoři studie předkládají vysvětlení, a sice že při kotransfekci došlo k rekombinaci mezi plasmidy před začleněním do DNA parazita. Transkribované sense a antisense vlákna poté vznikala blízko sebe a byla větší šance vzniku dsRNA (Drozd *et al.*, 2002).

To znamená, že úspěšnost antisense RNA technik výrazně závisí na prostorové vzdálenosti míst, kde se sense a antisense vlákna transkribují. U *Trypanosoma brucei* tak mohla RNA interferenční technika nefungovat jen proto, že se v těchto studiích integrační vektory konstruovaly pro inserci do oblastí rDNA (DNA kódující ribozomální RNA) (názor autora).

3 Umlčování genů u vybraných druhů parazitických protistů

3.1 Trypanosoma brucei

Trypanosoma brucei patří do čeledi *Trypanosomatidae*. Je původce spavé nemoci lidí a dobytka. K tomuto druhu náleží 3 morfologicky nerozlišitelné poddruhy, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* a *T. b. brucei*, které se navzájem liší infekčností pro různé savčí hostitele. Jejich přenašeči jsou bodalky z čeledi *Glossinidae*.

T. brucei je výhradně extracelulární parazit. Procyklické 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 u procyklických forem; VSG, povrchové glykoproteiny u krevních forem) (Teixeira and daRocha, 2003).

3.1.1 Regulace genové exprese u čeledi trypanosomatidae

Pro čeleď *Trypanosomatidae* je typická polycistronická transkripce. Po přepisu se vlákno RNA štěpí na mRNA kódující jednotlivé geny. Při vyštěpování těchto mRNA z dlouhého vlákna dojde k přidání 5' CAP struktury a 3' polyA sekvence na konce každé mRNA. Tento proces se nazývá trans-splicing.

Regulace exprese se u většiny genů odehrává na post-transkripční úrovni (Teixeira and daRocha, 2003). Velmi důležité pro regulaci jsou především 3' UTR oblasti transkriptů (Clayton, 1999).

Byly vyvinuty různé vektory pro expresi cizích genů. Tyto vektory musí obsahovat SL přidavná místa [splice leader additional sites] (pro trans-splicing) na obou stranách vloženého genu. Jsou používány různé sekvence odvozené od řady genů pro zajištění efektivního trans-splicingu. Je ale relativně málo známých promotorů. Není znám žádný, který by zajišťoval silnou iniciaci transkripce polymerázou II. Používá se omezené množství promotorů přepisovaných polymerázou I: EP procyklinové a VSG promotory v případě afrických trypanosom a promotory pro ribozomální RNA u všech zástupců čeledi *Trypanosomatidae* (Clayton, 1999; Teixeira and daRocha, 2003). Bylo ukázáno, že pro efektivní transkripci u *T. cruzi* a *L. enrietti* nemusí být promotorová sekvence dokonce vůbec přítomna (Laban and Wirth, 1989; Teixeira *et al.*, 1995).

3.1.2 Transfekční systémy u Trypanosomy brucei

Elektroporací DNA bylo dosaženo transientní (přechodné) transfekce (Eid and Sollner-Webb, 1987) i stabilní transfekce (ten Asbroek *et al.*, 1993). Transfekce pomocí lineární DNA je vysoce účinná. Naproti tomu transfekce cirkulárním plasmidem vede k vyselektování rezistentních klonů jen zřídka (Clayton, 1999). Aby k tomu došlo, musí se v buňce

trypanosom vytvořit episóm sestávající se ze zřetězených plasmidů, nebo musí dojít k rekombinaci plasmidu do genomu (ten Asbroek *et al.*, 1993).

3.1.3 Inducibilní systémy

Stádiově specifická exprese

Přidáním 3'UTR oblastí EP1a EP2 genů (jsou to geny pro povrchové proteiny v procyklických stádiích) k vkládanému genu se dá zajistit silná exprese tohoto genu u procyklických 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 EP-procyklinového promotoru (Wirtz and Clayton, 1995) a v druhém transkripce promotoru pro T7 polymerázu (Wirtz *et al.*, 1998). Oba systémy se používají u transgenních linií trypanosom, které stabilně vytvářejí T7 polymerázu a Tet-represor.

Oba systémy mají své výhody. T7 promotor je nezávislý na stádiu parazita a zajišťuje efektivnější transkripci. I za absence tetracyklinu je ale 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 typů těchto systémů se používají např. pro indukci tvorby dsRNA (Motyka and Englund, 2004).

Řízená rekombinace

Pro řízenou rekombinaci se využívá Cre-lox systém (Barrett *et al.*, 2004). Indukce tvorby rekombinázy se v tomto systému řídí hladinou koncentrace tetracyklinu. Problémem je residuální tvorba rekombinázy i za absence tetracyklinu (Meissner *et al.*, 2007).

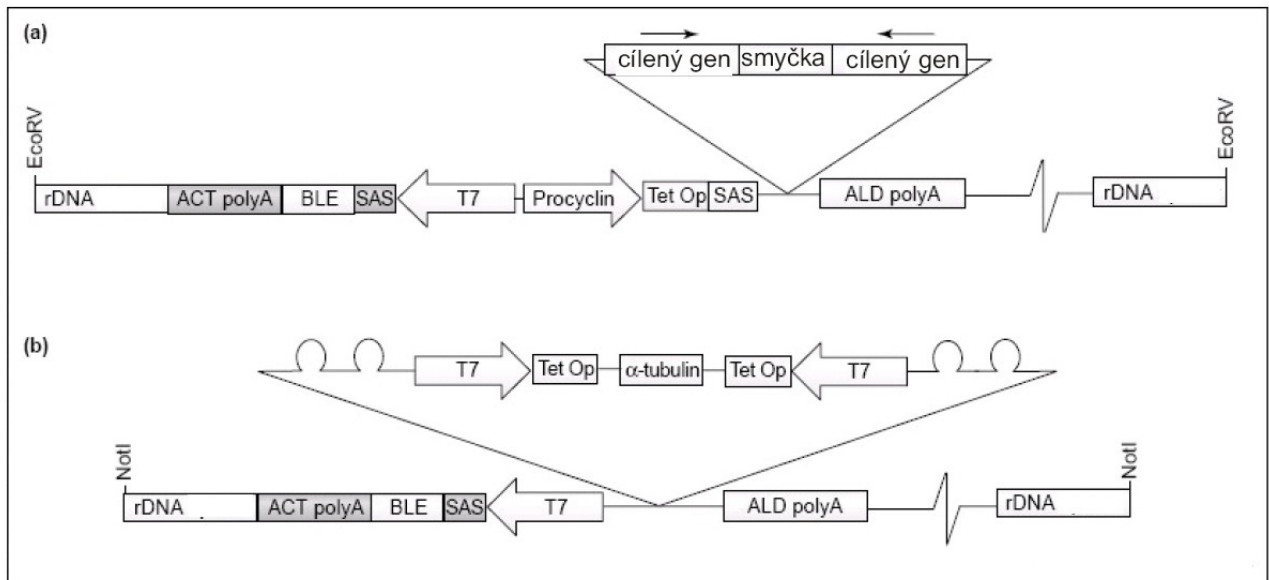
3.1.4 Knockout

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 se dá eliminace obou genů dosáhnout delecí pouze jednoho z nich a následným zvyšováním koncentrace selekčního činidla. Tento technika se nazývá selekce pro ztrátu heterozygótnosti [selection for loss of heterozygosity] (Clayton, 1999).

3.1.5 RNA interference

RNAi byla u *T. brucei* popsána již v roce 1998 (Ngo *et al.*, 1998). Jak užití elektroporované dsRNA, tak v buňce tvořené dsRNA tehdy úspěšně vedlo ke snížení hladiny cílové mRNA. V dnešní době se RNA knockdown genů na bázi RNAi dociluje především s použitím dvou

inducibilních vektorů (Motyka and Englund, 2004) (Obrázek 12). První typ produkuje vlásečkovou dsRNA a druhý pomocí opačných promotorů sense a antisense vlákně 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 i projektem na RNAi knockdown 210 genů na chromozomu I. Výsledkem této studie byl pozorovaný fenotyp u 30% genů (Subramaniam *et al.*, 2006).



Obrázek 12:

Vektory pro RNAi u *T. brucei*

A) Vlásačkový vektor [stem-loop vector] – směr od 5' k 3' konci genu pro zacílení RNA interference ukazují šipky.

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

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

Vysvětlivky: Procyclin, EP promotor; Tet Op, tetracyklinový operátor; ΩΩ, dvojitý T7 terminátor; T7, promotor pro T7 polymerázu; rDNA, rDNA; 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.

Obrázek přejat a upraven; (Wang *et al.*, 2000)

3.1.6 Techniky antisense RNA

Antisense RNA techniky u *T. brucei* většinou nefungují (Bastin *et al.*, 1998; Drozd *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2000). Drozd a kolektiv (2002) dokázal, že pravděpodobnost setkání sense a antisense vláken v genomu *T. brucei* je závislá na prostorové vzdálenosti míst jejich vzniku (Drozd *et al.*, 2002). Je možné, že antisense RNA technika nefungovala kvůli špatně zvoleným vektorům (Viz kapitola 2.3.4. Antisense RNA techniky)(názor autora).

3.2 Leishmania donovani

Leishmania donovani patří do čeledi *Trypanosomatidae*. Je původcem viscerální leishmaniózy Starého světa u savců včetně člověka. Jejím přenašečem jsou komáři rodu *Phlebotomus*. Má extracelulární promastigótní stádia žijící ve střevě komára a amastigótní intracelulární stádia, které napadají savčí makrofágy.

3.2.1 Transfekce a inducibilní systémy

U *L. donovani* se využívá jak integračních, tak episomálních vektorů. Na rozdíl od *T. brucei* je transfekce a následná selekce v případě stabilních episomálních plasmidů bezproblémová (Clayton, 1999). Tyto plasmidy se zřetězují a vytvářejí větší kruhy (Kelly *et al.*, 1992). Využívaným promotorem je promotor pro rRNA (Clayton, 1999; Teixeira and daRocha, 2003). Byl zaveden Tet-represor/operátorový inducibilní systém s řízeným rRNA promotorem (Yan *et al.*, 2001).

3.2.2 Knockout

Metody genové eliminace jsou obdobné jako u *T. brucei*. (Clayton, 1999). Využívá se dvoustupňové selekce (Clayton, 1999) i selekce na ztrátu heterozygótnosti (Liu *et al.*, 2006).

3.2.3 Techniky antisense RNA

U *L. donovani* antisense RNA inhibice narozdíl od *T. brucei* funguje (Pandey *et al.*, 2004; Zhang and Matlashewski, 1997; Zhang and Matlashewski, 2000). Ve všech třech těchto studiích byla antisense RNA exprimována z episomálního plasmidu.

3.2.4 RNA interference

Redukce mRNA pomocí dsRNA u *L. donovani* zatím pozorována nebyla (Robinson and Beverley, 2003; Zhang and Matlashewski, 2000). Zhang (2000) se snažil rozlišit případný efekt RNA interference od produkce čisté antisense RNA. Udělal sérii pokusů vnášením plasmidů produkujících antisense RNA vlákna, sense RNA vlákna a vlásenky tvořící RNA. Redukce hladiny mRNA byla pozorována pouze v případě plasmidů exprimujících antisense RNA (Zhang and Matlashewski, 2000). RNA interference nebyla pozorována ani elektroporací krátkých siRNA (Robinson and Beverley, 2003).

3.2.5 Antisense DNA oligonukleotidy

Byly provedeny pokusy s cílem zmapovat potenciální využití antisense DNA oligonukleotidů v léčbě proti leishmanióze způsobované *L. donovani*. Pokusy byly prováděny na tkáňových kulturách infikovaných makrofágů. Do média byly přidány DNA oligonukleotidy v různých koncentracích a v kombinaci s různými dopravními systémy (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 parazita (Dasgupta *et al.*, 2002).

3.3 Plasmodium falciparum

Plasmodium falciparum patří mezi *Apicomplexa*. Je původce nejpatogennější lidské formy malárie. Přenašečem je komár *Anopheles*.

Sporozoit 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.

3.3.1 Transfekce

V roce 1995 byla popsána transientní transfekce plasmodií uvnitř erytrocytů (Wu *et al.*, 1995) a další rok byl zaveden i selekční systém (Wu *et al.*, 1996).

Při transfekci episomálních plasmidů dochází k jejich zřetězení, patrně rekombinací mezi plasmidy navzájem (Kadekoppala *et al.*, 2001). Tato zřetěžená struktura se navíc v čase mění. Zpočátku malé molekuly se vlivem nerovnoměrné segregace při dělení buňky stanou větší a stabilní i při absenci selekčního činidla (O'Donnell *et al.*, 2001).

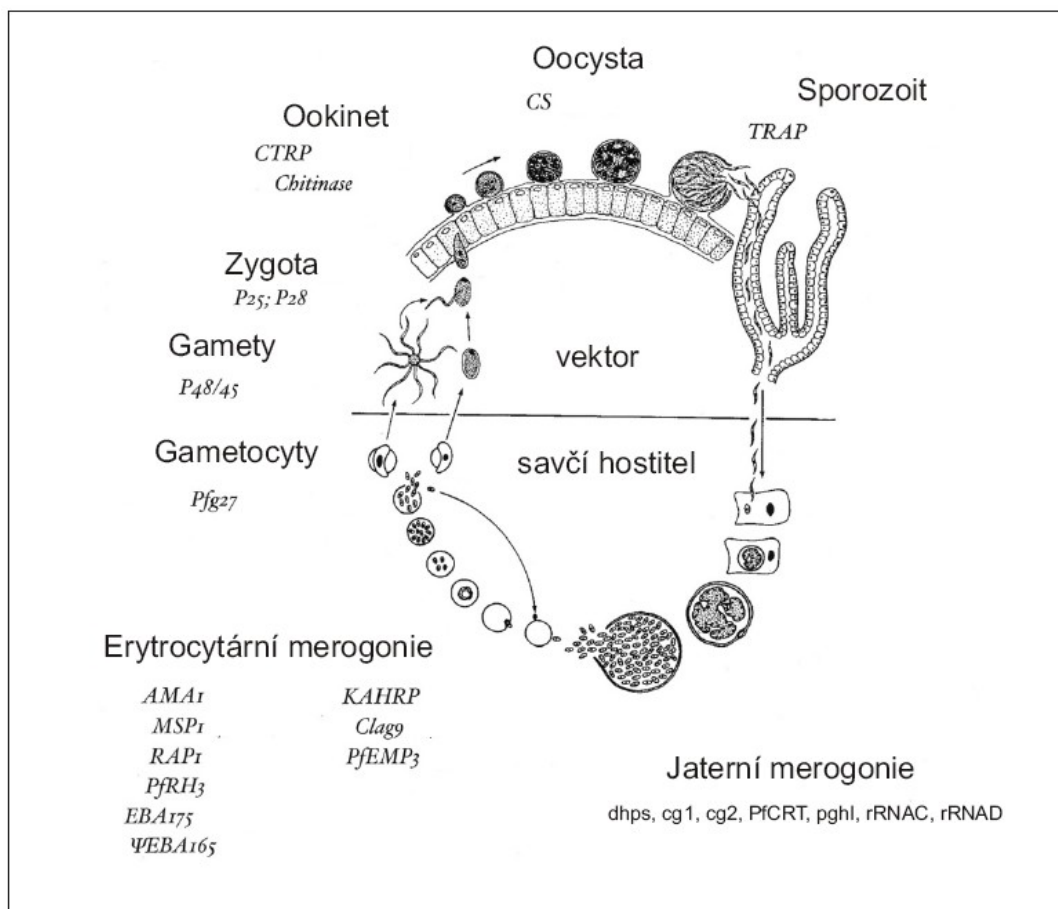
3.3.2 Inducibilní systémy

U *Plasmodium falciparum* byl zaveden trans-aktivátorový systém regulované transkripce. Tento systém je odvozený od systému u *T. gondii* (Meissner *et al.*, 2002). Trans-aktivátory se zde nazývají TATi-1 a TATi-2 (Meissner *et al.*, 2005) (viz kapitola 2.1.2.1.2 Systém založený na trans-aktivátorem regulované transkripce).

3.3.3 Knockout

P. falciparum má haploidní genom, knockout je proto často využívanou technikou (Carvalho and Menard, 2005). U *P. falciparum* je lineární DNA rychle degradována, pro transfekci se tedy užívá cirkulárních plasmidů. Ty se ale do genomové DNA včleňují především procesem homologní integrace, a proto je v některých případech vhodné užití kombinace pozitivní a negativní selekce (Carvalho and Menard, 2005).

Carvalho a Menard uvádějí 30 prací, které použily těchto technik při studiu genů v různých stádiích cyklu parazita (Carvalho and Menard, 2005) (Obrázek 13).



Obrázek 13:

Přehled genů inaktivovaných metodou knockout u *P. falciparum*

Obrázek znázorňuje, které geny byly zkoumány a v jakých stádiích cyklu parazita. Čísla v závorkách znázorňují jednotlivé publikace (publikace jsou citovány v originální práci).

Převzato a upraveno, (Carvalho and Menard, 2005).

3.3.4 Antisense RNA techniky

Redukce mRNA pomocí antisense RNA technik u *P. falciparum* funguje (Crooke *et al.*, 2006; Gardiner *et al.*, 2000b).

Kupříkladu Crooke a kolektiv (2006) inhibovali mRNA genu pro glukózu-6-fosfát dehydrogenázu-6-fosfátglukonolaktonázu, aby zmapovali vliv její absence na expresi antioxidantních genů. Tlumení bylo dosaženo pomocí stabilní transfekce plasmidů produkujících antisense RNA anebo elektroporací dsRNA oligonukleotidů (21 bp). V případě antisense RNA došlo k největší redukci cílové mRNA (kolem 50%) v čase 48 hodin po transfekci. V případě dsRNA oligonukleotidů byla pozorována 86% redukce již v čase 3 hodiny po elektroporaci (Crooke *et al.*, 2006). Tato práce tedy svědčí nejen o funkčnosti antisense RNA technik, ale i o funkčnosti RNA interference.

3.3.5 RNA interference

U *P. falciparum* nebyl nalezen Dicer protein ani Ago protein (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). RNA interferencí zprostředkovaný knockdown je u tohoto organismu i přesto nejspíše funkční. Dokládají to pokusy, kde došlo po elektroporaci dsRNA oligonukleotidů k výraznému snížení hladiny mRNA cílového proteinu (Crooke *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004).

3.3.6 Užití S-DNA antisense oligonukleotidů

U *P. falciparum* byla testována schopnost antisense S-DNA oligomerů inhibovat růst. V prvním pokusu byla S-DNA volně přidána 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. Inhibovaná byla mRNA genu pro topoisomerasu II.

3.4 Toxoplasma gondii

Tento parazit patří mezi *Apicomplexa*. Jeho definitivním hostitelem jsou kočkovité šelmy a mezi možnými mezihosteli je velká škála teplokrevných savců včetně člověka. U lidí způsobuje v případě transplacentárního přenosu potraty a neurologické defekty u novorozenců. Pro člověka jsou infekční jak tkáňové cesty v mase jiných mezihostitelů, tak kontaminativně přenosné oocysty ve výkalech koček.

Haploidní sporozoiti a bradyzoiti se po vstupu do hostitele diferencují na rapidně 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, dojde k sexuálnímu rozmnožování a vzniku diploidní zygoty. Ta se následně přemění v oocystu obsahující sporocysty se sporozoity.

3.4.1 Transfekce

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

3.4.2 Inducibilní systémy

U *T. gondii* byl zaveden Tet-represor/operátorový inducibilní systém (Meissner *et al.*, 2001a)

Jeho využití je ale omezené, neboť při řízení exprese esenciálních genů rychle ztrácí indukční schopnost (Meissner *et al.*, 2007). Druhý inducibilní systém je založen na trans-aktivátorem

řízené transkripci (Meissner et al., 2002) (viz kapitola 2.1.2.1.2 Systém založený na transaktivátorem regulované transkripci).

3.4.3 Knockout

T. gondii je haploidní organismus. Eliminace jeho genů procesem homologní rekombinace se děje užitím linearizovaných plasmidů (Kim et al., 1993; Soldati et al., 1995). Často se využívá kombinace pozitivní a negativní selekce (Donald and Roos, 1998).

3.4.4 RNA interference

U *T. gondii* byl charakterizován Ago protein. Dicer prozatím nalezen nebyl (Al et al., 2006). RNA interferenční knockdown se indukuje elektroporací krátkých dsRNA oligonukleotidů (Al-Anouti et al., 2004; Ananvoranich et al., 2006). Ananvoranich a kolektiv (2006) provedl úspěšný knockdown u 14 genů účastnících se glykolytické dráhy (Ananvoranich et al., 2006).

3.4.5 Ribozymy a antisense RNA techniky

K tlumení exprese genů u *T. gondii* se používají rovněž ribozymy (Al-Anouti and Ananvoranich, 2002; Nakaar et al., 1999; Nakaar et al., 2003; Sheng et al., 2004).

3.5 Giardia intestinalis

Giardia intestinalis je dvoujaderný bičíkovec, který se asexuálně množí v tenkém střevě člověka. V jeho cyklu se střídá stádium cysty a vegetativního trofozoita. Člověk se může nakazit požitím cyst z kontaminované vody či potravin.

G. intestinalis je ke stěně střeva přichycena pomocí adhezivního disku. Způsobuje průjemová onemocnění.

3.5.1 Transfekční techniky

Transfekční techniky byly zpočátku založeny na přechodné transfekci (Yee and Nash, 1995). Neomycin transferáza (Sun et al., 1998), puromycin N-acetyltransferáza (Singer et al., 1998), a hygromycin phosphotransferáza (Dan and Wang, 2000) se používají pro stabilní transfekce. Pro transfekci se využívá cirkulárních episomálních a lineárních integrativních plasmidů u kmenu WB. U GS kmenu i transfekce cirkulárních plasmidů vede k integraci do vlastní DNA (Singer et al., 1998).

Transfekce založená na dsRNA viru

Další transfekční metoda je založená na infekci trofozoitů dsRNA virem (GLV, giardiavirus) (Yu *et al.*, 1995). Jeho genom kóduje gen pro virovou RNA dependentní RNA polymerázu a gen kapsidový protein. Virová polymeráza specificky přepisuje jednovláknové 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 chimérické molekuly RNA. Na obou koncích těchto transfekovaných RNA molekul jsou sekvence odvozené od giardiaviru. Mezi těmito úseky je pak vložena exogenní RNA. Virová sekvence na obou koncích RNA zajišťuje dosyntetizování druhého vlákna a balení do virových partikulí. Infekce virem tedy chimérickou RNA namnožuje a umožňuje její horizontální šíření mezi trofozoity v kultuře.

Tyto transfekce jsou i bez přítomnosti selekčního činidla stabilní (Yu *et al.*, 1996). Nevýhoda použitého systému je rezistence vůči nákaze virem u většiny trofozoitů v kultuře. Proto byla do sekvence chimérické RNA přidána ještě sekvence genu pro neomycinovou rezistenci (Yu *et al.*, 1996). Selekcí jsou zvýhodňováni trofozoiti vnímaví pro virus.

Nevýhoda systému je nutnost pracovat *in vitro* s RNA.

3.5.2 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 Neomycin transferázu a Tetracyklinový represor (Sun and Tai, 2000). V tomto inducibilním plasmidu se často užívá alfa giardinového promotoru (Touz *et al.*, 2005) pro jeho dobrou regulovatelnost (Sun and Tai, 2000).

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

3.5.3 Knockout

G. intestinalis má většinu genů ve více kopiích. Proto se u tohoto organismu knockout nevyužívá (Meissner *et al.*, 2007; vis-Hayman and Nash, 2002).

3.5.4 Ribozymy a Antisense RNA techniky

Pro cílené umlčování genů se u *Giardia intestinalis* dá využívat antisense RNA technik (Lauwaet *et al.*, 2007; Touz *et al.*, 2005). Také se užívá hammerhead ribozomů. Tato inhibice se používá v systémech užívajících vektory odvozené od giardiaviru (Dan *et al.*, 2000; Dan and Wang, 2000). Nejprve se *in vitro* musí nasyntetizovat RNA a ta se potom 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 bází byla hladina mRNA snížena o 85% (Dan and Wang, 2000).

3.5.5 RNA interference

U *Giardia intestinalis* byl identifikován Dicer, Ago protein i RdRp (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). U enzymu Dicer byla dokonce zdokumentována jeho katalytická účinnost (Macrae *et al.*, 2006). V buňkách trofozoitů bylo nalezeno značné množství nekódující antisense RNA, které se patrně podílí na RNA interferenčních mechanismech zahrnujících tlumení retrovirozů (Ullu *et al.*, 2005).

Existence dsRNA viru u *G. intestinalis* je v rozporu s existencí RNA interferenčních drah v cytosolu. Zatím také nebyla publikována práce, kde by RNAi knockdown fungoval. Je možné, že se u *G. intestinalis* cytosolická RNA interferenční dráha nevyskytuje.

3.6 Entamoeba histolytica

Měňavka *E. histolytica* je významný patogen člověka. Způsobuje krvavé průjmy. Rozlišujeme u ní stádium infekční cysty, která je pozřena s potravou, a trofozoita, který se poté z cysty uvolní a kolonizuje střevo.

3.6.1 Transfekční a inducibilní systémy

Transientní transfekce (Nickel and Tannich, 1994) a stabilní transfekce (Hamann *et al.*, 1995) položily základ vývinu inducibilních systémů. Byly zavedeny dva, oba založené na Tet-represor/operátorovém mechanismu. První se vyznačuje jen jedním zaváděným plasmidem (Hamann *et al.*, 1997), v druhém systému jsou zapotřebí dva plasmidy (Ramakrishnan *et al.*, 1997).

3.6.2 Knockout

Knockout se u *E. histolytica* nepoužívá pro vysoký počet kopií jednotlivých genů (Meissner *et al.*, 2007).

3.6.3 Antisense RNA techniky

Pro RNA antisense techniky byl u *E. histolytica* zaveden systém produkující atypickou antisense RNA. Tato RNA má 5'UTR oblast odvozenou od transkriptu genu L21 (gen pro ribozomální protein). Tato 5' UTR oblast na mRNA se neváže na polyribosomy 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 se sense vlákny (Moshitch-Moshkovitch *et al.*, 1997). Užití tohoto systému vedlo k významnému snížení exprese u řady genů (Ankri *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 1999).

Druhý novější systém pro produkci antisense RNA molekul je indukibilní (Sahoo *et al.*, 2003; Vats *et al.*, 2005).

3.6.4 Inhibice PNA antisense oligomery

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

3.6.5 RNA interference

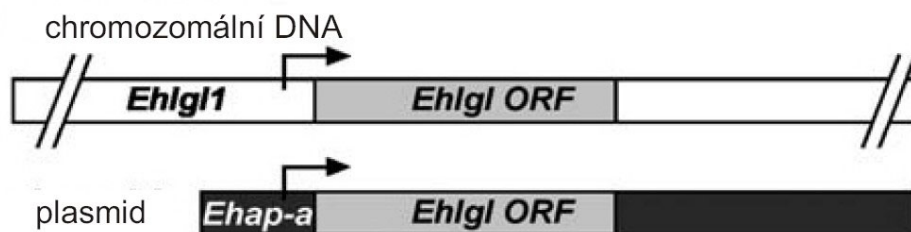
U *E. histolytica* jsou známy homology klíčových enzymů RNA interferenční dráhy (Abed and Ankri, 2005) a RNA interference již byla použita v řadě studií (Kaur and Lohia, 2004; Vayssie *et al.*, 2004).

3.6.6 Inhibice transkripce

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

Prvně bylo transkripční umlčení pozorováno transfekcí plasmidu, který měl DNA sekvenci homologní k sekvenci genu pro amoebapór A (EhAP-a) a také obsahoval 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).

Bylo ukázáno, že tímto způsobem lze transkripčně umlčovat i další geny (Bracha *et al.*, 2006) (Obrázek 14). 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-vlákenné RNA o délce cca 140 nukleotidů (Mirelman *et al.*, 2006).



Obrázek 14:

Schéma vektoru pro transkripční inhibici a inhibované místo na chromosomu.

Inhibován je *Ehlgl* gen, plasmid je zřizovaný ze sekvence *Ehlgl* genu a *Ehap-a* UTR oblasti, která obsahuje SINE element (není znázorněn).

Vysvětlivky: *Ehlgl* ORF, sekvence DNA kódující *Ehlgl* protein; *Ehlgl1* je 5'UTR oblast *Ehlgl* genu; *Ehap-a*, 5'UTR oblast *Ehap-a* genu obsahující SINE (Bracha *et al.*, 2006).

3.7 *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis je sexuálně přenosný bičíkatý parazit urogenitálního traktu člověka.

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

Techniky umlčování genů jsou u *T. vaginalis* málo rozvinuté. Byl publikován článek, kde bylo použito homologní rekombinace pro knockout ferredoxinu (Land *et al.*, 2004). V tomto článku byla použita jednostupňová selekce. K výměně byl použit linearizovaný plasmid s konci komplementárními k UTR oblastem ferredoxinu.

Další použitá technika je antisense RNA (Mundodi *et al.*, 2004). V této práci došlo až k 62% redukci cílené mRNA.

4 Závěr a hodnocení

Práce dokumentuje současný stav poznatků o umlčování genů a jejich užití u parazitických protistů. Tato problematika je aktuální a její další studium slibuje nové důležité poznatky. V tomto oboru hodlám pokračovat v rámci své diplomové práce, kde budu zkoušet inhibici genů u *Giardia intestinalis* a *Trichomonas vaginalis* pomocí morpholinových oligomerů.

5 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.
- Aigner, A., 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J. Biotechnol.* 124, 12-25.
- Al, R.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., 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.
- Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- 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.
- Bagasra, O., Prilliman, K.R., 2004. RNA interference: the molecular immune system. *J. Mol. Histol.* 35, 545-553.
- Barrett, B., LaCount, D.J., Donelson, J.E., 2004. *Trypanosoma brucei*: a first-generation CRE-loxP site-specific recombination system. *Exp. Parasitol.* 106, 37-44.
- Bastin, P., Sherwin, T., Gull, K., 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391, 548.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baulcombe, D., 2005. RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290-293.

Berriman,M., Ghedin,E., Hertz-Fowler,C., Blandin,G., Renauld,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.

Boffa,L.C., Morris,P.L., Carpaneto,E.M., Louissaint,M., Allfrey,V.G., 1996. Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 13228-13233.

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.

Cairns,M.J., Saravolac,E.G., Sun,L.Q., 2002. Catalytic DNA: a novel tool for gene suppression. *Curr. Drug Targets.* 3, 269-279.

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.

Chu,C.Y., Rana,T.M., 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 4, e210.

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.
- 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 supsession] of intracellular *L. donovani* parasites in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 23-27.
- 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.
- 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.
- Drozdz,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.
- 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.
- 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.
- Franch,T., Petersen,M., Wagner,E.G., Jacobsen,J.P., Gerdes,K., 1999. Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure. *J. Mol. Biol.* 294, 1115-1125.
- Gardiner,D.L., Holt,D.C., Thomas,E.A., Kemp,D.J., Trenholme,K.R., 2000b. Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 33-41.
- Gardiner,D.L., Holt,D.C., Thomas,E.A., Kemp,D.J., Trenholme,K.R., 2000a. Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 33-41.
- 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.

- Hudziak,R.M., Barofsky,E., Barofsky,D.F., Weller,D.L., Huang,S.B., Weller,D.D., 1996. Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 267-272.
- 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.
- Kadekoppala,M., Cheresch,P., Catron,D., Ji,D.D., Deitsch,K., Wellems,T.E., Seifert,H.S., Haldar,K., 2001. Rapid recombination among transfected plasmids, chimeric episome formation and trans gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 211-218.
- 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.
- Kelly,J.M., Ward,H.M., Miles,M.A., Kendall,G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3963-3969.
- Kemmer,C., Neubauer,P., 2006. Antisense RNA based down-regulation of RNaseE in *E.coli*. *Microb. Cell Fact.* 5, 38.
- Kim,K., Soldati,D., Boothroyd,J.C., 1993. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 262, 911-914.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lim,L.P., Glasner,M.E., Yekta,S., Burge,C.B., Bartel,D.P., 2003. Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.

- Lippman,Z., Martienssen,R., 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370.
- 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.
- 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.
- Matzke,M.A., Birchler,J.A., 2005b. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- Matzke,M.A., Birchler,J.A., 2005c. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- Matzke,M.A., Birchler,J.A., 2005a. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- Matzke,M.A., Birchler,J.A., 2005d. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- Meissner,M., Brecht,S., Bujard,H., Soldati,D., 2001b. Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 29, E115.
- Meissner,M., Brecht,S., Bujard,H., Soldati,D., 2001a. 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., 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. U. S. A* 102, 2980-2985.
- 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.
- Meister,G., Tuschl,T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mirelman,D., Anbar,M., Nuchamowitz,Y., Bracha,R., 2006. Epigenetic silencing of gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 37, 226-233.
- Mochizuki,K., Gorovsky,M.A., 2004. Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 181-187.

- 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.
- 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 rhoptry 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.
- O'Donnell,R.A., Preiser,P.R., Williamson,D.H., Moore,P.W., Cowman,A.F., Crabb,B.S., 2001. An alteration in concatameric structure is associated with efficient segregation of plasmids in transfected *Plasmodium falciparum* parasites. *Nucleic Acids Res.* 29, 716-724.
- 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.
- 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.

- Reynolds,A., Leake,D., Boese,Q., Scaringe,S., Marshall,W.S., Khvorova,A., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-330.
- 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 sec61 alpha subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids. *Exp. Parasitol.* 109, 241-251.
- Santoro,S.W., Joyce,G.F., 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4262-4266.
- Scherer,L.J., Rossi,J.J., 2003. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* 21, 1457-1465.
- Schramke,V., Allshire,R., 2003. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science* 301, 1069-1074.
- 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.
- Shiu,P.K., Raju,N.B., Zickler,D., Metzenberg,R.L., 2001. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 107, 905-916.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313, 320-324.
- 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.
- vis-Hayman, S.R., Nash, T.E., 2002. Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 1-7.
- Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., Englund, P.T., 2000. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* 275, 40174-40179.
- Wienholds, E., Plasterk, R.H., 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5911-5922.

- 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.
- 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.
- Youngblood,D.S., Hatlevig,S.A., Hassinger,J.N., Iversen,P.L., Moulton,H.M., 2007. Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells. *Bioconjug. Chem.* 18, 50-60.
- 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.
- 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.