

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Marie Jalovecká, Ph.D.

Školitelka – specialistka, konzultantka: Mgr. Pavla Šnebergerová

České Budějovice 2021

Borsodi Š., 2021: Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*. [Development of the *Babesia divergens* fluorescent reporter line. Bc. Thesis, in Czech] – 56 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

B. divergens, a model species of this project, is an agent of economically important bovine babesiosis and life-threatening human babesiosis primarily found in Europe. Despite its importance, key biological processes underlying *B. divergens* parasitism in the host cell are still not well understood, partly due to the absence of *B. divergens*-specific gene-targeting techniques. Therefore, we aim to establish a “gold standard” genetic tool and develop *B. divergens* fluorescent reporter lineage. In this thesis, we set up the necessary background for the construction of episomal *B. divergens*-specific GFP plasmid that will be further used for the parasite *in vivo* imaging. We identified and sequenced *B. divergens*-specific 5' and 3' untranslated regions that will serve for genes-of-interest expression in the desired plasmid. As a selective drug, we will employ blasticidin (BSD) that successfully inhibited the *B. divergens in vitro* multiplication. Effective inhibitory BSD concentrations were determined using the newly established and optimized technique of parasitemia determination by fluorescent DNA labelling analysed by flow cytometry. Using obtained data, we designed the episomal GFP-expressing plasmid and proposed consecutive steps of its construction using the Gibson assembly strategy that we successfully verified by *in silico* cloning.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 5.12. 2021

.....

Šárka Borsodi

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Marii Jalovecké, Ph.D za skvělé vedení mé bakalářské práce a konzultantce Mgr. Pavle Šnebergerové, která mi velmi pomohla nejen při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře za přátelskost a vstřícnost. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	<i>Babesia</i> a babesioza	2
1.1.1	Fylogenetické zařazení	2
1.1.2	Životní cyklus	2
1.1.3	Adaptace na parazitický způsob života	4
1.1.4	Babesioza.....	5
1.1.5	<i>Babesia divergens</i>	7
1.2	Strategie genetického inženýrství u parazitů rodu <i>Babesia</i>	7
1.2.1	Metody genetické manipulace DNA parazita.....	8
1.2.1	Metody genetické manipulace RNA parazita.....	11
2	Cíle práce.....	13
3	Materiál a metody	14
3.1	Kultivace <i>Babesia divergens</i>	14
3.1.1	Parazit	14
3.1.2	Erythrocyty	14
3.1.3	Udržování kultur.....	14
3.1.4	Mikroskopické vyšetření kultur a určení parazitémie	15
3.2	Determinace parazitémie pomocí průtokového cytometru	15
3.2.1	Optimalizace barvení živých buněk pro průtokovou cytometrii	15
3.2.2	Fixace buněk a jejich barvení	16
3.3	Inhibiční efekt blastocidinu a určení hodnoty IC ₅₀	16
3.4	Sekvence UTRs	17
3.4.1	Izolace DNA	18
3.4.2	Design primerů	18
3.4.3	PCR a elektroforéza.....	19
3.4.4	Enzymatické přečištění, odeslání vzorků na sekvenaci.....	20
3.5	Navržení plazmidu pro vývoj fluorescenční reportérové linie <i>B. divergens</i>	21

4	Výsledky	22
4.1	Optimalizace barvení a fixace buněk a určení parazitémie pomocí průtokového cytometru	22
4.2	Inhibiční efekt blasticidinu a určení hodnoty IC ₅₀	23
4.3	Sekvenace <i>B. divergens</i> -specifických 5' a 3' UTRs.....	27
4.4	Design plazmidu pro vývoj fluorescenční reportérové linie <i>B. divergens</i>	28
5	Diskuze	32
6	Závěr.....	36
7	Literatura	37
	Seznam příloh.....	48

Seznam použitých zkratek

act = aktin

AUC = plocha pod křivkou, z angl. area under curve

bp = pár bází

BSD = blasticidin

CAM = kadmodulin

Cas9 = s CRISPR asociovaný protein 9

CRISPR = z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRT = chloroquiní transporter resistance

dNTPs = deoxyribonukleotid trifosfát

DPI = den po infekci

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

FACS = z angl. fluorescent activated cell sorting

GFP = z angl. green fluorescent protein

GlcN6P = glukosamin-6-fosfát

gRNA= z angl. guide RNA

hdhfr = z angl. human dihydrofolate reductase

HSP = z angl. heatshock protein (protein teplotního šoku)

kb = kilo báze

MT = z angl. molecular targets

NK = negativní kontrola

NHEJ = z angl. non-homologous end joining

PBS = fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)

PCR = polymerázová řetězová reakce

RNAi = RNA interference

SAP = z angl. shrimp alkaline phosphatase

SNP = jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single-nucleotide polymorphism),

TRIS = trisaminomethan

UTRs = z angl. untranslated regions

1 Úvod

Babesie jsou klíšťaty přenášení parazité, kteří napadají červené krvinky obratlových hostitelů včetně člověka (Schnittger et al., 2012). Přestože jsou tyto parazité globálně rozšířeny, a jimi způsobené onemocnění babesioza má celosvětový ekonomický a medicínský význam (Haapasalo et al., 2010; Pegram et al., 1991), nejsou studováni tak intenzivně jako jim příbuzní parazité plasmodium a toxoplasma (Jalovecka et al., 2019). Navzdory nespornému významu babesií dosud nebyly kompletně objasněny některé biologické jevy a procesy, které jsou základem parazitismu babesií v hostitelské buňce mezihostitele (obratlovci) i strategie množení v definitivním hostiteli (klíšťata). Protože životní cyklus babesií je velmi specifický v rámci celého kmenu Apicomplexa (Jalovecka et al., 2018a), může podrobné studium těchto biologických procesů vést k determinaci unikátních komponent, na které by v budoucnu mohla být cílena specifická léčba. Ta dosud u babesií neexistuje (Vannier et al., 2015), přestože se babesioza stala jednou z nejčastějších parazitických chorob přenášených krevní transfuzí (Yabsley & Shock, 2013).

Aby mohly být unikátní biologické jevy a procesy vyskytující se v životním cyklu babesií objeveny a popsány, je nezbytné zavést celou škálu různých moderních metod funkční genomiky. Některé metodické postupy i stabilní fluorescenční linie jsou již dostupné u jiných druhů babesií (Hakimi et al., 2016; Silva et al., 2016; Suarez & McElwain, 2009), ne však u *Babesia divergens*, která je typickým evropským druhem (Zintl et al., 2003), a naším modelovým organismem. Dlouhodobým cílem naší laboratoře je proto vyvinutí stabilního transfekčního systému *B. divergens*, který nám umožní funkční analýzu genů včetně mechanismů jejich exprese pomocí metod funkční genomiky.

1.1 *Babesia* a babesioza

1.1.1 Fylogenetické zařazení

Skupina Apicomplexa, do které babesie patří, zahrnuje velké množství významných druhů způsobujících závažná onemocnění člověka i zvířat, např. *Plasmodium* spp. způsobující malárii, *Cryptosporidium* spp. - původce kryptosporidiózy či *Toxoplasma* spp. způsobující toxoplazmózu (White & Suvorova, 2018). Tito parazité jsou charakterističtí svým převážně intracelulární parazitismem (až na některé evolučně původnější druhy např. *Gregarina* spp. či *Cryptosporidium* spp. (Kono et al., 2013)).

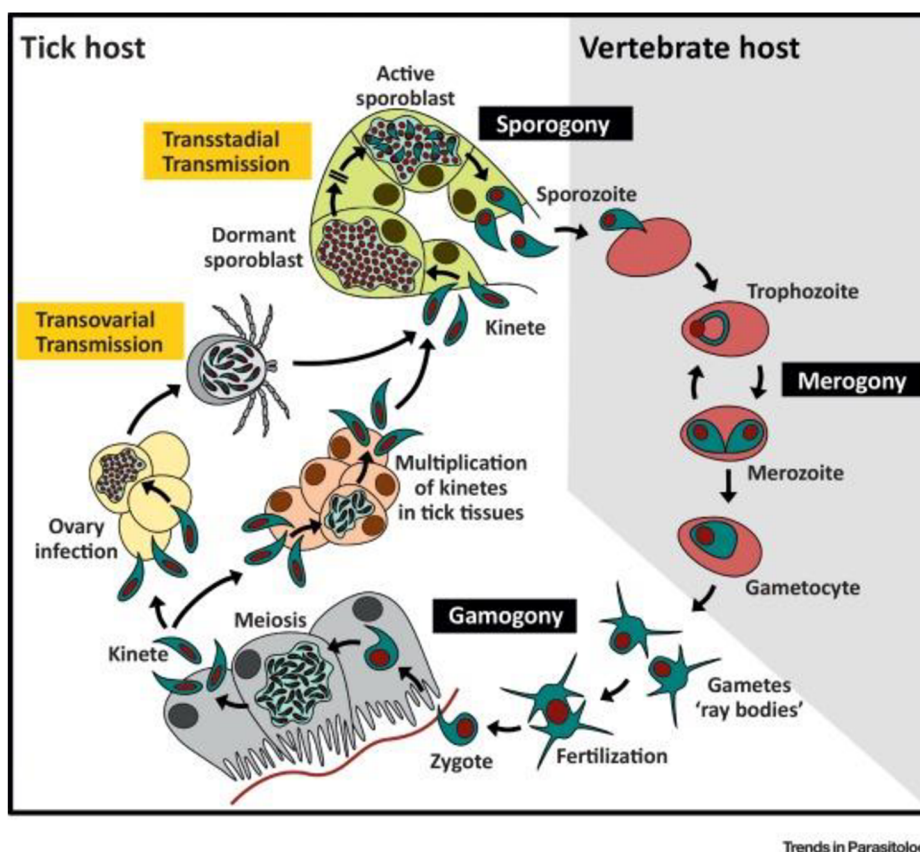
V rámci skupiny Apicomplexa patří rod *Babesia* do skupiny Piroplasmida, do kterého se řadí i rod *Theileria* a rod *Cytauxzoon*. Počet druhů babesii neustále roste s rostoucím počtem analýz parazitů různých druhů savců (Criado-Fornelio et al., 2004); momentálně jich je známo kolem 100 druhů (Schnittger et al., 2012). Fylogeneze této čeledi je založena hlavně na morfologii a nověji i molekulární analýze. Na základě několika charakteristik v životním cyklu se od sebe odlišují rody *Theileria* a *Babesia*, avšak toto dělení pomocí rozdílných charakteristik životního cyklu nekoresponduje s fylogenetickým uspořádáním skupiny Piroplasmida. Z dat získaných molekulární analýzou 18s rRNA podjednotky vyplývá, že rody *Babesia* ani *Theileria* nejsou monofyletickými skupinami, nýbrž polyfyletickým uspořádáním (Jalovecka et al., 2019; Kappmeyer et al., 2012; Lack et al., 2012).

1.1.2 Životní cyklus

Babesie ve svém životním cyklu střídá dva typy hostitelů, kdy mezihostitelem je obratlovec, ve kterém probíhá nepohlavní množení v erythrocytech a definitivním hostitelem klíště, kde v jeho střevech dochází k pohlavnímu množení (Vannier et al., 2015). Během sání infikovaného klíštěte je do krevního oběhu mezihostitele vpraveno velké množství tzv. sporozoitů, infekční stádium parazita. Sporozoity invadují erythrocyty a začíná **merogonie**. Při merogonii nejprve dochází k přeměně sporozoitů uvnitř erythrocytu v trofozoity, které se poté přemění v merozoity. Ti dále invadují další neinfikované erythrocyty (Mehlhorn & Schein, 1985). Merozoity babesii se množí pouze v červených krvinkách, zatímco theilerie vstupují do lymfocytů, kde se vyvíjí ve schizonty (Uilenberg, 2006).

Během asexuálního množení babesiálních merozoitů dochází v krevním řečišti mezihostitele také k tvorbě gametocytů, tzv. pre-sexuálních stádií (Jalovecka et al., 2019). Vývoj gametocytů v gamety probíhá pouze ve střevech klíštěte, kam se dostanou z krve

mezihostitele během sání klišťe. Zde se gametocyty vyvíjí a tvoří gamety s názvem Strahlenkörper nebo spiky-rayed bodies, která nebyla pozorována u žádných jiných parazitů ve skupině Apicomplexa (Antunes et al., 2017). Poté dochází ke splynutí gamet a tvorbě pohyblivé zygoty, která perforuje buněčnou membránu střevních buněk, a uvnitř se pak meioticky dělí. Vzniklé jednobuněčné kinety pak putují hemolymfou do slinných žláz klišťete, ve kterých nastává **sporogonie**. Kinety utvoří dormantní stádium zvané sporoblast, které umožňuje přežít babesii morfogenezi klišťete. Poté, co dojde k sání dalšího instaru klišťete na mezihostiteli, sporoblast dozrává a vznikající sporozoity se uvolňují do krevního řečiště (Guimaraã et al., 1998). Kinety mohou invadovat i další tkáň včetně ovarii, a parazit se takto může přenést na vajíčka a poté larvy (tzv. transovariální přenos – viz kap. 1.13). Zjednodušené schéma životního cyklu babesii zobrazuje Obr. 1. Schéma převzato z (Jalovecka et al., 2019).



Obr. 1: Schéma životního cyklu babesii. Sporozoity infikují erythrocyty obratlovce, kde se mění v trofozoity. Trofozoity uvnitř erythrocytu prochází merogonií a vytváří se merozoity. Část merozoitů se transformuje v gametocyty, které později ve střevech klišťete vytváří gamety, jejichž splynutím vznikne zygota. Ta se uvnitř buněk trávicího traktu meioticky dělí. Tímto dělením vznikají kinety, které putují do dalších orgánů včetně slinných žláz, kde prodělávají sporogonii (Jalovecka et al., 2019).

1.1.3 Adaptace na parazitický způsob života

Jako u ostatních parazitů ze skupiny Apicomplexa, tak i infekční buňka babesii (sporozoit, merozoit a kinety) disponuje apikálním komplexem (soubor organel), který slouží k průniku do hostitelské buňky (Kono et al., 2013). Apikální komplex babesii je redukovaný. Skládá se z rhoptrií, jejichž počet se liší podle druhu, několika mikronem, pouze jednoho polárního kruhu a tzv. spherical body (del Carmen Terrón et al., 2016). Vedle apikálního komplexu infekční buňka babesii obsahuje také vnitřní membránový komplex a tzv. apikoplast, což je čtyřmembránová organela získaná procesem sekundární endosymbiozy (McFadden, 2010).

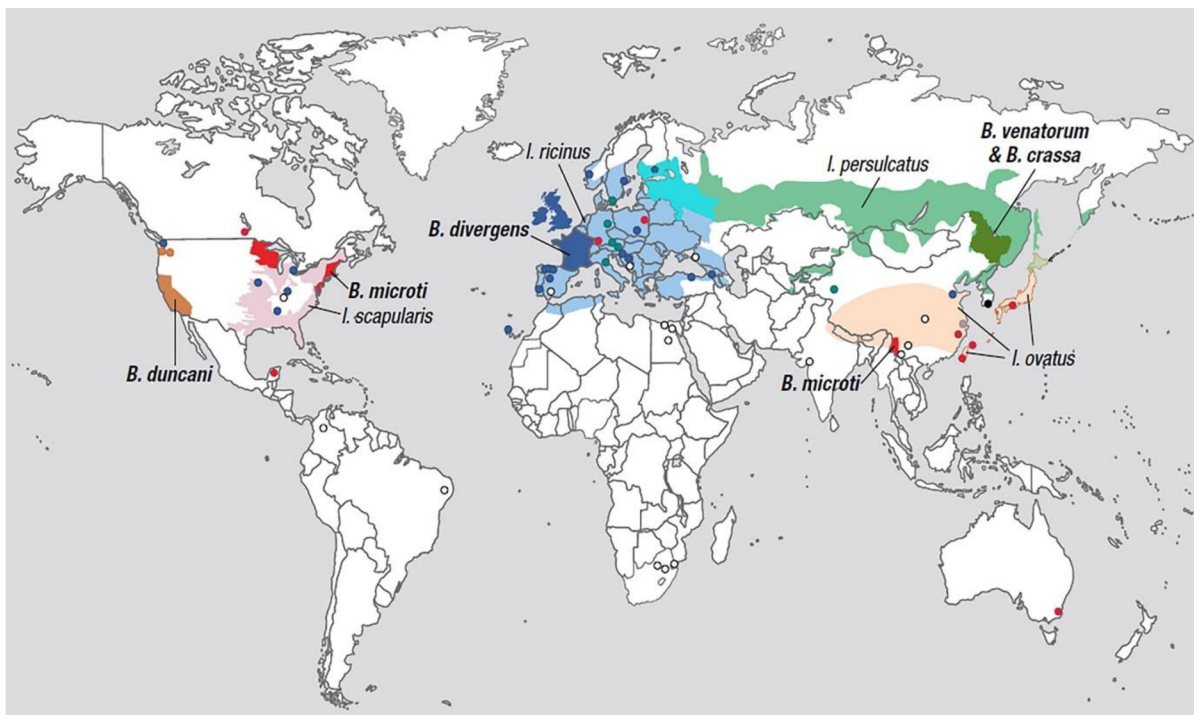
Krevní infekční stádia, merozoity, jsou uzpůsobeny úniku před imunitním systémem hostitele. Infikují červené krvinky a na jejím povrchu také střídavě vystavují několik druhů membránových proteinů – antigenů, což má za úkol ztížit produkci specifických protilátek lymfocyty. Tato adaptace se nazývá antigenní variabilita a vyskytuje se i např. u příbuzného plasmodia, ale i dalších nepříbuzných parazitů jako jsou trypanosomy či giardie, dokonce i u bakteriemi způsobenými nemocemi jako jsou influenza a meningitida atd. (Jackson et al., 2014). Imunosuprese provázející parazitární nákazu se sice více projevuje u malarických pacientů, ale i u pacientů s babesiozou dochází k potlačení adaptivní imunity, což umožňuje rozvinout sekundární bakteriální nákazu (Djokic et al., 2021).

Další zajímavou adaptací, která se objevuje u klíšťaty přenášených parazitů, je transstadiální přenos, tedy přenos z jednoho instaru klíštěte do dalšího. Sporoblasty babesii jsou uloženy v cytoplazmě buněk slinných žláz, a zde přežívají při morfogenezi klíštěte. Při sání dalšího vývojového instaru klíštěte se pak začnou ze sporoblastu uvolňovat sporozoity (Uilenberg, 2006).

Transovariální přenos je další adaptací babesii na parazitický způsob života. Parazit invaduje vajíčka samice klíštěte a následně se přenesou na stovky potomků (Vannier et al., 2015). Tato adaptace slouží k masivnímu rozšíření parazita a k přetrvávání parazita v ekosystému v případě, že se parazit nemůže přenést na meziphostitele (Antunes et al., 2017). Tuto adaptaci nemají všechny druhy babesii (např. *B. microti*), a ani příbuzné theilerie (Bonnet et al., 2007).

1.1.4 Babesioza

Zvýšená interakce mezi lidmi a prostředím, zvýšený počet imunosuprimovaných pacientů a změna klimatu vedly ke zvýšení počtu onemocnění přenášejících klišťaty, včetně babesiozy, která je jednou z nejčastějších parazitických chorob přenášená krevní transfuzí (Yabsley & Shock, 2013). Druhy babesií, které způsobují babesiozu u hovězího dobytka mají velký celosvětový ekonomický význam. Mezi tyto druhy patří např. *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* a *B. major*. (Jacob et al., 2020). Další druhy napadají jiné druhy zvířat, např. *B. caballi* napadá koně, *B. canis* napadá psy, a *B. felis* napadá kočky. U jelenů se vyskytuje *B. odocolei* a *B. venatorum*, a u hlodavců babesiozu způsobuje mimo jiné druh *B. microti* (Cavalier-Smith et al., 1994). Člověk není cíleným mezihostitelem tohoto parazita, ale náhodným. Druhy, které mohou toto onemocnění způsobit u lidí jsou nejčastěji *B. divergens*, *B. microti*, *B. duncani*, *B. venatorum*. Rozšíření těchto parazitů a jejich vektorů – klišťat se nachází na Obr. 2 (Krause, 2019).



Obr. 2: Mapa zobrazující rozšíření babesií infikujících člověka a klišťat, které je přenášejí (Krause, 2019). Babesie schopné infikovat člověka jsou rozšířeny po celém světě napříč všemi kontinenty - v Evropě (Tomassone et al., 2018), Americe - Severní i Jižní (Ingram & Crook, 2020; Young et al., 2019), Africe (Terkawi et al., 2011) a Asii (Wei et al., 2020; Zhang et al., 2019). *B. divergens* je charakteristickým druhem způsobující lidskou babesiozu v Evropě (Lobo et al., 2019), a v USA je to pak *B. microti* (Young et al., 2019).

1.1.4.1 Lidská babesioza

Lidská babesioza se může objevit v lehké i těžké formě, která může končit smrtí jedince. Inkubační doba činí něco kolem 1-4 týdnů po nasátí klíštěte. Poté se začnou objevovat příznaky onemocnění, např. horečka, vyčerpání, pocení či až anémie, hemoglobinurie, žloutenka a splenomegalie. Tyto příznaky jsou důsledkem množení merozoitů v červených krvinkách, které poté lyzují. Merozoity babesii se z červených krvinek uvolňují kontinuálně, a nezpůsobují tak tzv. ataky, typické pro malárii. U plasmodia se merozoity uvolňují z červených krvinek synchronně, a proto se objevují návaly, kdy se střídá zimnice s horečkou (Krause et al., 2007). Těžkou formu babesiozy provází komorbidity, např. plicní edém, diseminovaná intravaskulární koagulace, srdeční selhání, selhání ledvin, kóma, ruptura sleziny. Smrtnost činí něco kolem 10 % u lidí, a u imunosuprimovaných jedinců je mnohem vyšší (Vannier et al., 2015). Zvláštností je, že nákaza *B. microti* probíhá často bezpříznakově, na rozdíl od nákazy způsobené *B. divergens* (Krause, 2019).

1.1.4.2 Současná léčba a potenciální budoucí léčebné terapie

Babesioza se obecně léčí pomocí antibiotik a antimalarik, tato léčba je relativně úspěšná. Standardně se podává buď kombinace atovaquanu a azithromycin anebo kombinace clindamycinu a chininu. V těžších případech nákazy se přistupuje k částečné nebo úplné krevní transfúzi, kdy se červené krvinky pacienta nahradí novými (Krause, 2019; Vannier et al., 2015). Tyto způsoby léčby nejsou ovšem specificky cílené přímo proti babesii, a způsobují mnoho vedlejších účinků (Krause et al., 2000). Proto je zde snaha vyvinout nějaký typ cílené léčby či vakcínu pro člověka a hospodářská či domácí zvířata (Hakimi et al., 2021; Jalovecka et al., 2019).

Jako dobrým cílem selektivních léčiv se jeví např. parazitární proteasom. Inhibice proteasomu se používá např. i při léčbě rakoviny, kdy je buňka nucena postoupit apoptózu kvůli nahromaděným poškozeným proteinům, které nemůže inhibovaný proteasom eliminovat (Cao et al., 2020). Recentně byly vyvinuty selektivní inhibitory parazitárních proteasomů např. pro původce malarie, leishmaniozy, Chagasovy choroby a spavé nemoci (Bibo-Verdugo et al., 2019; Wyllie et al., 2019; Xie et al., 2018). Jalovecka et al., 2018b testovali účinek některých takových látek u babesii a byl prokázán potenciální terapeutický účinek např. u Carfilzomibu.

Dalším terapeutickým cílem by mohly být tzv. kalcium dependentní kinázy. Tyto enzymy regulují důležité procesy, mezi které patří spojení buněk hostitele a parazita, invazi do červených krvinek, pohyb a únik z červené krvinky. Vyskytují se i u jiných Alveolárních parazitárních i neparazitárních organismů, ne však u zvířat (Hortua Triana et al., 2018), což

z nich dělá selektivní terapeutický cíl (Choi et al., 2020). Mnoho z nich není charakterizovaných a jejich regulační role v procesu průniku parazita do hostitelské buňky a přetrvávání v ní nejsou dobře prostudované (Keyloun et al., 2014). O tuto charakterizaci u babesii se snaží momentálně laboratoř Dr. Jalovecké a Dr. Sojky. Mezi další potenciální terapeutické cíle patří např. různé typy tzv. exportomů – proteiny exportované mimo parazita do cytoplazmy erytrocytů a/nebo membrány erytrocytů hostitele (Goodswen et al., 2021) či apikoplast, který by mohl sloužit jako terapeutický cíl i u jiných apikomplex (Uddin et al., 2018).

1.1.5 *Babesia divergens*

Tento druh patří v Evropě mezi důležité patogeny hovězího dobytka. Způsobuje smrtelně nebezpečné onemocnění a vznikají kvůli němu velké ekonomické škody (Zintl et al., 2003). Tento druh také patří mezi hlavní patogeny tzv. lidské babesiozy v rámci Evropy, kde recentně jsou případy hlášeny např. z Británie, Francie, Norska a Finska (Vannier et al., 2015). Infekce způsobené tímto druhem mají sklony být vážné a i smrtelné pokud se adekvátně neléčí (Lobo et al., 2019).

B. divergens patří mezi skupinu babesii zvanou *Babesia sensu stricto* (Jalovecka et al. 2019) a je přenášena klíštětem *Ixodes ricinus*, patřící mezi tzv. „hard ticks“ - čeled' *Ixodidae*. Byla zjištěna velká mezihostitelská variabilita. *B. divergens*. Může nakazit dobytek, muflony, daňky, jeleny, srnce a soby. Ale naopak bylo zjištěno, že ovce a kozy jsou proti *B. divergens* imunní (Zintl et al., 2003). I přes velkou variabilitu mezihostitelů, bylo obtížné najít vhodné laboratorní zvíře pro studium tohoto parazita. Pro studium mechanismů nákazy a infekce se jako laboratorní zvíře nakonec ustanovil pískomil mongolský - *Meriones unguiculatus* (Lewis & Williams, 1979), zde však infekce ukazuje značnou variabilitu komplikující laboratorní experimenty (Jalovecka, 2017). U tohoto druhu babesie se i podařilo vyvinout *in vitro* kulturu, což umožňuje detailní studium krevních stádií (Jalovecka et al., 2016).

1.2 Strategie genetického inženýrství u parazitů rodu *Babesia*

Detailní znalost strategií parazitického životního stylu babesii by mohla v budoucnu vést k nalezení vhodných kandidátů pro vývoj specifických léčiv či vakcíny. Podrobné zkoumání základních biologických principů včetně molekulárních mechanismů podmiňující parazitický styl života babesii se v dnešní době neobejde bez efektivních nástrojů funkční genomiky. Na rozdíl od babesii příbuzných druhů, *Plasmodium* spp. nebo *Toxoplasma gondii* (Mévélec et al., 2020; Su et al., 2019), kde jsou techniky genetické manipulace běžně

využívány, je u babesíí využití podobných nástrojů dosud limitováno. Nicméně detailní studium dosud využívaných metod funkční genomiky u modelových organismů v rámci skupiny Apicomplexa může umožnit aplikaci obdobných technik i na babesie (Hakimi et al., 2021).

1.2.1 Metody genetické manipulace DNA parazita

Vzrůstající počet metod *in vitro* kultivace, transfekce a dostupnost sekvencí genomů různých druhů babesíí umožnil zavést některé metody genetické manipulace. U několika druhů babesíí včetně *B. divergens* je známa sekvence celého genomu (Young et al., 2019), což umožňuje základní výzkum např. životního cyklu, genové regulace, metabolismu a mechanismu invaze do červených krvinek.

U *B. bovis*, *B. ovata*, *B. bigemina* a *B. gibsoni* existuje spolehlivá technika *in vitro* kultivace, a pro tyto druhy se již povedlo zavést stabilní transfekční linie – podrobněji viz kap. 1.2.1.1 (Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018b; Silva et al., 2018; Suarez & McElwain, 2010). U našeho modelového organismu *B. divergens* již také byla zavedena a optimalizována metoda *in vitro* kultivace v bovinních erytrocytech (Jalovecka et al., 2016), dosud však není známa žádná stabilní transfekční linie. U *B. microti* se podařilo transfekční linii vyvinout, i když dosud nebyl nalezen způsob, jak tohoto parazita udržet v *in vitro* kultuře. Všechny transfekční experimenty u *B. microti* byly prováděny *in vivo* převážně v myších (Jaijyan et al., 2020).

Většina studií je prováděna pouze u krevních stádií a zatím není pro babesie k dispozici žádný kondicionální nástroj pro charakterizaci genů důležitých během vývoje babesie v klíštěti. U plasmodia existuje technika DiCre systému (kap. 1.2.1.3) a převedení této techniky pro babesie by mohlo usnadnit výzkum právě klíštěcích stádií (Hakimi et al., 2021).

1.2.1.1 Transfekční linie

Transfekcí je myšleno vložení nukleové kyseliny ve formě plazmidu do eukaryotické buňky. Takto vložená genetická informace buď zůstává volně v jádře jako episom – episomální transfekce, nebo může být inkorporován přímo do genu buňky. Episomální transfekční plazmid obvykle obsahuje reportérový gen a gen pro expresi žádaného produktu. Reportérové geny se často používají jako indikace toho, zda byl určitý gen přijat nebo exprimován v populaci buněk. Tyto geny musí být ohraničeny 5' a 3' UTRs (netranslatovatelné úseky) aby mohly být exprimovány (Suarez et al., 2017). Pro vývoj transfekčních linií je nezbytné využít selektivní inhibici růstu parazita v *in vitro* kultuře či *in vivo* v experimentálním hostiteli. Buňky s episomálním plazmidem tak musí být

pod selekčním tlakem tzv. selekční drogy. V plazmidu musí být gen, který poskytne buňkám selekční výhodu – selekční marker neboli gen rezistence proti selekční droze (Nehlsen et al., 2006). Pro babesii jsou známé dvě funkční selekční drogy: BSD (selekční marker – *blastidicin-S-deamináza*) a WR99210 (selekční marker – *hdhfr*) (Asada et al., 2015).

Pro inkorporaci plazmidu do buňky se užívá buď elektroporace, nukleofekce, mikroinjekce nebo se plazmid dostává do buňky pomocí lipozomu. V případě babesii se dnes nejčastěji využívá nukleofekce (Suarez & McElwain, 2010). Stabilní transfekční linie se může vytvořit z episomální, kdy se tento plazmid nejčastěji pomocí homologní rekombinace inkorporuje přímo do genomu buňky (de Koning-Ward et al., 2015). U babesii se pro intra-genomickou integraci úspěšně využívá zejména transfekce linearizovaného plazmidu, který se rovněž pomocí homologní rekombinace cíleně vloží do genomu parazita (Hakimi et al., 2021). Hlavní výhodou stabilní transfekční linie založené na integraci žádaného genu do genomu buňky je kontrolovaný počet kopií, a tedy získané výsledky jsou lépe reprodukovatelné. Na druhou stranu, u episomálních plazmidů nedochází k vlastnímu zásahu do genomu buňky, a tedy nehrozí, že by exprese žádaného genu byla pod neočekávanou kontrolou nějakého interního promotoru či pod kontrolou dalších případných regulačních faktorů, o kterých zatím nic není známo (van Craenenbroeck et al., 2000).

Progres obou typů transfekčních systémů pomohl vynalézt metodu pro funkční analýzu esenciálních genů, kdy se provede knock-out genu a následně se opět obnoví jeho funkce (tzv. kondicionální neboli podmíněný knock-out systém, viz dále kap. 1.2.1.3 (Asada et al., 2015)). Funkce genu se dá odhalit mimo jiné i pomocí nadměrné exprese daného produktu, což pozmění fenotyp buňky (Suarez et al., 2017). Transfekční systémy také umožňují detailní studium promotorů souvisejících s regulací genové exprese esenciálních i nesenciálních genů. Pomohly identifikovat a definovat různé promotory pro *B. bovis* a pro *B. bigemina* (Silva et al., 2016). Byl objeven i obousměrný promotor *ef-1α* u *B. bigemina* a u *B. bovis* (Silva et al., 2016). To by mohlo znamenat, že se u různých druhů babesii mohou objevit podobné regulační mechanismy, a takové promotory se tudíž dají použít u více druhů (Suarez et al., 2017).

1.2.1.2 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace je proces výměny genetické informace mezi dvěma vlákny DNA, která obsahují podobnou sekvenci nukleotidů. Tento jev se normálně objevuje při meiotickém dělení buněk (Hoshijima et al., 2016). Z hlediska genetické manipulace je tohoto mechanismu hojně využíváno nejen u babesii, ale u všech apikomplex při vkládání žádaného genu přímo do genomu parazitární buňky (Suarez et al., 2017). Homologní

rekombinace slouží jako technika genového targetování, kdy je na cílené místo v genomu vložen námi žádaný gen, či cílená mutace znemožňující následnou funkci genu. Aby mohl být žádaný gen či mutace inkorporovány do genomu buňky, musí být ohraničeny identickou sekvencí jako je v genu v genomu buňky. Buňka pozná tyto konce jako homologní a sekvence je pomocí homologní rekombinace iniciované samotnou buňkou vyměněna z původní na novou. Homologní rekombinace umožňuje tedy provést tzv. knock-in – vložení nové sekvence do genomu, nebo tzv. knock-out – vložení mutace do cíleného genu, a tedy znemožnění jeho funkce (Hoshijima et al., 2016). Suarez & McElwain, 2009 pomocí homologní rekombinace provedli knock-in úseku sestávajícího se z GFP a z BSD rezistence do genomu babesie (*B. bovis*), a vytvořili tak stabilní fluorescenční reportérovou linii.

Genové targetování je jednou z nejlepších metod studování funkce genů i proteinů *in vivo*. U různých zástupců apikomplex včetně babesii byly pomocí homologní rekombinace odhaleny různorodé mechanismy invaze do buněk různými stádii parazita, sexuální diferenciací či např. mechanismus cytoadherence infikovaných červených krvinek (de Koning-Ward et al., 2015).

1.2.1.3 Systém DiCre

Asexuální krevní stadia parazita malárie a babesie jsou snadno přístupná genetické modifikaci prostřednictvím homologní rekombinace, protože jsou haploidní. Což ale neumožňuje studium genů, které jsou esenciální během replikace asexuálního krevního stádia (Hakimi et al., 2021). Esenciální geny vyžadují podmíněnou genetickou modifikaci, a jedním ze způsobů této modifikace je tzv. systém DiCre (Knuepfer et al., 2017). Systém DiCre se skládá z rozděleného proteinu tzv. Cre rekombinázy na dvě podjednotky, které se pod vlivem rapamycinu spojí. Cre rekombináza je specifický typ rekombinázy, která katalyzuje excesi DNA segmentu ohraničeného dvěma krátkými identickými sekvencemi zvané LoxP. Tato metoda představuje techniku podmíněného knock-outu (Jullien et al., 2007).

Systém DiCre se ukázal jako účinný přístup pro podmíněnou genovou delecii různých apikomplex, např. *Toxoplasma gondii* (Andenmatten et al., 2013) a *Plasmodium falciparum* (Collins et al., 2013), i jiných parazitů jako jsou Trypanosomy nebo *Leishmania mexicana* (Wyllie et al., 2019). Dokonce Fernandes et al., 2020 zavedli fluorescenční PbDiCre linii u *Plasmodium berghei* a ukázali, že tato metoda může sloužit k identifikování esenciálních genů nejen krevních stádií, ale i ve stádiích specifických pro komáry (Knuepfer et al., 2017).

Metoda DiCre se dá převést i na babesie (Hakimi et al., 2021), dosud však není známa základní DiCre linie babesii exprimující Cre rekombinázu. Tuto linii v současné chvíli laboratoř Dr. Jalovecké a Dr. Sojky zavádí. Stabilní linie je připravována pomocí integrace

Cre rekombinázy homologní rekombinací do genomu *B. divergens*. Pro testování stabilní DiCre linie pak bude využito mnou vytvořeného GFP plazmidu, kam budou přidány specifické LoxP sekvence. Efektivnost excese bude analyzována pomocí PCR a fluorescenčního mikroskopu.

1.2.1.4 CRISPR/Cas9 linie

Před objevem CRISPR/Cas9 se k cílenému štípání určených sekvencí využívaly dva systémy umožňující specifické dvouvláknové zlomy: zinc finger nukleázy (ZFNs) a tzv. TALENY. Na rozdíl od TALENŮ byly ZFNs úspěšně použity ke genetické úpravě *P. falciparum* a *Plasmodium vivax* (Barros et al., 2015; Straimer et al., 2012). CRISPR/Cas9 využívá pro navigaci nukleázové aktivity vazby RNA-DNA na rozdíl od ZFNs a TALENŮ, které využívají vazby protein-DNA. Výhodou CRISPR/Cas9, ve srovnání s těmito staršími technikami, je mnohem jednodušší design a využití pro široké spektrum sekvencí (Loureiro & da Silva, 2019). Transkripce CRISPR regionu produkuje tzv. gRNA, která navede budoucí komplex k určenému místu. Zformovaný RNA-DNA heteroduplex se pak naváže na nukleázu Cas9, která pak katalyzuje dvou vláknový zlom DNA. Buňka se pak snaží tento zlom opravit pomocí nehomologního spojení konců (v podstatě přímá ligace), což umožňuje zavést cílené mutace znemožňující funkci genu, tedy tzv. knock-out, či vložení nového specifického úseku, tzv. knock-in (Lino et al., 2018).

U babesii je využíváno hlavně techniky homologní rekombinace pro funkční analýzu genů (viz výše). Objev systému CRISPR/Cas9 usnadnil tuto analýzu, nicméně u babesie vyskytuje komplikace v podobě absence tzv. NHEJ (nehomologní spojení konců); babesie mohou provádět pouze homologní opravu, pro kterou potřebují templátovou DNA (Nenarokova et al., 2019). Editování genomu pomocí CRISPR/Cas9 bylo zavedeno u řady apikomplex, např. u plasmodia a toxoplasmy. Hakimi et al., 2019 navrhli CRISPR/Cas9 plazmid pro *B. bovis*, který poté úspěšně použili k epitopovému značení, zavedení bodových mutací a cílenému nahrazení genu. CRISPR/Cas9 systém nevyžaduje, aby měl parazit selekční marker přímo v genomu, což umožňuje mířit na vícero genů v parazitovi, a lze takto studovat multigenové rodiny.

1.2.1 Metody genetické manipulace RNA parazita

Je znám transkriptom několika druhů babesii z normálních či geneticky modifikovaných *in vitro* kultur, i atenuovaných kmenů a klíčících stádií (Hakimi et al., 2021; Ueti et al., 2020). Tato data umožňují charakterizaci genů, které jsou specificky exprimovány v určitém vývojovém stádiu parazita, popis regulačních mechanismů při translaci včetně

alternativního sestřihu, a celkově k lepšímu pochopení výsledného proteomu parazita (Prommana et al., 2013).

Pro studie exprese mRNA a její funkci se běžně užívá RNA interference, ale babesie, jako všechna apikomplexa, nemají geny umožňující využít RNA interferenci ke kontrole translace genů. Je tedy těžké najít nějaké metody funkční genomiky cílené na mRNA (Keroack et al., 2019). RNA interference se ale dá využít u klíštěte, kdy se např. díky této metodě zabránilo šíření *B. bovis* do ovarí u několika druhů klíšťat (Mitchell et al., 2019).

1.2.1.1 GlmS ribozym

Místo RNA interference se dá u apikomplex včetně babesí využít samoštěpícího ribozymu glmS ke kontrole exprese mRNA (Hakimi et al., 2020; Prommana et al., 2013). GlmS ribozym je specifická RNA struktura (enzym) vyskytující se v 5' UTR mRNA transkriptu genu *glmS* kódující GlcN6P (glucosamin-6-fosfát) – sloučenina nezbytná pro biosyntézu buněčné stěny (Cochrane et al., 2007). Tato RNA struktura reguluje vlastní gen *glmS* tím, že reaguje na koncentrace metabolitu GlcN6P. Když je tato látka přítomna ve fyziologické koncentraci, tak se naváže na glmS ribozym a umožní jakožto ko-enzym aktivovat samoštěpící proces, který vede k degradaci mRNA – transkriptu genu *glmS* (Ferré-D'Amaré, 2010). Hakimi et al., 2020 a Prommana et al., 2013 demonstrovali, že glmS ribozym je aktivní v *B. bovis* a *P. falciparum* a může být tedy použit k regulaci genové exprese v transgenních parazitech. Pomocí reverzní genetiky s použitím glmS ribozymu se tak může studovat funkce esenciálních parazitárních genů. Použití tohoto ribozymu např. umožnilo popsat proteinový povrch infikované červené krvinky u *P. falciparum* (Cobb et al., 2017; Prommana et al., 2013). Hakimi et al., 2020 pomocí této techniky charakterizovali některé proteiny, kterými parazit po invazi do červené krvinky modifikuje strukturální a mechanické vlastnosti hostitelské buňky. Přes jejich klíčovou roli ve virulenci a patogenezi nebyly nikdy takové proteiny předtím u *B. bovis* komplexně charakterizovány (Hakimi et al., 2021).

2 Cíle práce

- Stručná literární rešerše na téma "Strategie genetického inženýrství u parazitů rodu *Babesia*".
- Zavést a optimalizovat metodu vyhodnocování parazitémie *B. divergens* v *in vitro* kultuře pomocí průtokového cytometru.
- Ověřit citlivost *B. divergens* na selekční drogu blasticidin a určit jeho efektivní inhibiční koncentraci v *in vitro* kultuře *B. divergens*.
- Vybrat, identifikovat a osekvenovat *B. divergens* specifické 5' a 3' netranslatovatelné úseky vhodné pro přípravu plasmidu.
- Navrhnout plazmid pro episomální expresi GFP v *in vitro* kultuře *B. divergens* a ověřit strategii jeho konstrukce pomocí *in silico* klonování.

3 Materiál a metody

3.1 Kultivace *Babesia divergens*

B. divergens byla kultivována *in vitro* v suspenzi bovinních erytrocytů v inkubátoru (Galaxy 170 S, Eppendorf) při konstantní teplotě 37 °C a atmosféře s obsahem 5 % CO₂. Kultivační techniky byly prováděny v laminárním boxu (Airstream® Class II, BSCO) a při manipulaci s kulturami byly dodržovány základní aseptické techniky práce.

3.1.1 Parazit

Ve všech experimentech byl využíván kmen *Babesia divergens* 2210A G2 (Jalovecka et al., 2016).

3.1.2 Erytrocyty

Erytrocyty použité pro kultivaci byly bovinního původu a získány byly z jatek. Defibrinovaná krev byla 3x promyta promývacím médiem [500ml RPMI 1640 (Lonza), 0,5ml amphotericin B (Sigma, c=250µg/ml), 2,5ml gentamycin sulfát (Sigma, c=10mg/ml)] v centrifuze (Multi Centrifuge 3SR, Heraeus; 2000g, 4 °C, 10 min; Heraeus). Fibrinová vrstva byla po každém promytí odstraněna manuálně pipetou z povrchu peletu. Promyté erytrocyty byly skladovány v promývacím médiu (poměr 1 :2) při 4 °C pod dobu cca jednoho měsíce.

Přečištěné erytrocyty byly pravidelně testovány na možný výskyt kontaminace: na krevní agar (Dulab) bylo napipetováno 10µl erytrocytů s promývacím médiem. Pokud nebyla pozorována kontaminace během pěti dnů, erytrocyty byly využity ke kultivaci *B. divergens*. Druhým způsobem kontroly případné kontaminace byla kultivace pouze samotných erytrocytů (bez parazita), která probíhala dle postupu popsaného v násl. kapitole (3.1.3) po dobu minimálně tří dnů.

3.1.3 Udržování kultur

In vitro kultura *B. divergens* byla udržována v jamkách 24- jamkové destičky (Techno Plastic Products). V jedné z jamek 24- jamkové destičky byla vždy připravena suspenze 2ml kultivačního média [500ml RPMI 1640 (Lonza), 0,5ml amphotericin B (Sigma, c=250µg/ml), 2,5ml gentamycin sulfát (Sigma, c=10mg/ml), 10ml fetální bovinní sérum (Capricorn)], 50µl bovinních erytrocytů promytých dle postupu v kap. 3.1.2. a 10µl sedimentu s erytrocyty

z přechází jamky obsahující parazity. V případě nižší parazitémie (do 2 %) bylo pouze odsáto médium a nahrazeno novým. V opačném případě, při vysoké parazitémii (nad 10 %), bylo do suspenze kultivačního média a neinfikovaných erytrocytů přidáno pouze 5 μ l infikovaných erytrocytů. Kultury byly udržovány pravidelným pasážováním ideálně 3x týdně, kdy se také ve stejném intervalu mikroskopicky pozorovaly kvůli přibližnému určení parazitémie a případnému výskytu kontaminace (viz kap. 3.1.4).

V případě potřeby byla kultura rozmnožena do větších objemů (např. izolace DNA – viz kap. 3.2.1 nebo experiment viz kap. 3.4). Pro kultivační lahve o objemu 25cm³ (VWR) bylo použito 10ml kultivačního média, 250 μ l erytrocytů a celý objem jedné jamky z 24-jamkové destičky, zatímco pro lahve o objemu 75cm³ (VWR) bylo použito 40ml kultivačního média, 1ml erytrocytů a celý objem 25cm³ lahve. Ve všech kultivačních nádobách byl tudíž vždy dodržen 2,5% hematokrit.

3.1.4 Mikroskopické vyšetření kultur a určení parazitémie

Kultury byly pravidelně kontrolovány pomocí barvených krevních roztěrů. Ze sedimentu infikovaných erytrocytů byl zhotoven krevní roztěr, který byl následně obarvený pomocí Diff Quick Staining Setu (Siemens) následujícím postupem: Podložní sklíčko (CapitolBrand) se zaschlým krevním roztěrem bylo 10x vloženo do roztoku Diff-Quik Fix, poté 10x do Diff-Quik I, a naposled bylo na 60 sekund ponořeno do Diff-Quik II. Sklíčko bylo po fixování a obarvení opláchnuto vodou a následně jemně postříkáno 70% ethanolem a ihned opět opláchnuto vodou.

Obarvený preparát byl vyhodnocen pod světelným mikroskopem (Olympus BX53F) při zvětšení 1000 \times . Parazitémie byla počítána jako poměr infikovaných a celkových erytrocytů; množství erytrocytů pro vyhodnocení parazitémie bylo minimálně 1000.

3.2 Determinace parazitémie pomocí průtokového cytometru

3.2.1 Optimalizace barvení živých buněk pro průtokovou cytometrii

K peletu 50 μ l kultury 1 \times promyté 1 \times PBS [8g NaCl, 0,2g KH₂PO₄, 2,9g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0,2g KCl, doplněno do 1l destilovanou vodou] (Centrifuge 5424, Eppendorf; 2000g, 4 °C, 3 minuty) bylo přidáno 50 μ l 0,1% permeabilizačního roztoku Tritonu X100 (Sigma) a vzorky byly inkubovány 8 minut při pokojové teplotě. Po promytí 1 \times PBS bylo k peletu přidáno 50 μ l 0,1% - 0,5% roztok SYBR safe (APExBIO) nebo 50 μ l 0,1% - 0,5%

roztok 2mM Ethidiazin Homodimeru - EthD-1 (Biotium) nebo 50 μ l 0,1% - 0,5% roztok Propidium Jodid – PI (Thermo Fisher) barvy byly ředěny v 1 \times PBS. Vzorek byl inkubován v 37 °C po dobu 30 až 60 minut bez přístupu světla. Poté byl dvakrát promyt v 1 \times PBS a následně rozpuštěn v 1,5ml 1 \times PBS. Obarvené vzorky byly následně analyzovány na průtokovém cytometru (FACS CantoII, BD) v programu Diva.

3.2.2 Fixace buněk a jejich barvení

Pelet 50 μ l kultury (Centrifuge 5424, Eppendorf; 2000g, 4 °C, 3 minuty) byl 1 \times promyt 1 \times PBS a poté smíchán s jedním z testovaných fixačních roztoků [a) 50 μ l 4% paraformaldehyd a 50 μ l 0,025% glutaraldehyd, b) 100 μ l 4% paraformaldehyd, c) 100 μ l 0,025% glutaraldehyd] a inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci byla kultura promyta 1 \times PBS a poté bylo k peletu přidáno 100 μ l 1 \times PBS. Fixované buňky byly uchovány v lednici při 4 °C po dobu maximálně tří týdnů, během této doby byly vzorky obarveny; optimalizace barvení fixovaných buněk probíhala totožným postupem jako u živých buněk (kap. 3.2.1) včetně testování permeabilizace buněk pomocí Tritonu. Následně byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru (FACS CantoII, BD).

3.3 Inhibiční efekt blasticidinu a určení hodnoty IC₅₀

Experiment probíhal v 96- jamkové destičce (TPP) v biologických triplikátech (Tab. I), kdy do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l média s danou koncentrací BSD (výrobce/dodavatel) [výsledné koncentrace v jamce: 16; 8; 4; 1; 0,25; 0,0625; 0,0156 μ g/ml a negativní kontrola (NK) bez BSD] a 5 μ l erytrocytů s parazity (5% hematokrit, 1% parazitémie). Každé dva dny bylo vyměňováno kultivační médium s odpovídající koncentrací BSD. Vzorky erytrocytů byly odebírány po triplikátech ve dvoudenních intervalech a hned poté byly zafixovány (viz kap. 3.3.1). Z každé jamky byl také vyhotoven krevní roztěr. Celý experiment trval 8 dní. Obarvené vzorky byly vyhodnoceny na průtokovém cytometru. Nastavení přístroje bylo stejné jako v případě testování a optimalizování fixace a barvení buněk. Ze získaných dat byly poté v programu Graphpad Prism 8.0.1 určeny hodnoty AUC (plocha pod křivkou) a IC₅₀, a vytvořeny finální grafy. Data byla statisticky vyhodnocena ve stejném programu jednocestnou analýzou variance (ANOVA).

Tab. I: Design experimentu

	2DPI			4DPI			6DPI			8DPI		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16µg/ml											
B	8µg/ml											
C	4µg/ml											
D	1µg/ml											
E	0,25µg/ml											
F	0,0625µg/ml											
G	0,0156µg/ml											
H	NK ¹											

¹ negativní kontrola, DPI = den po infekci.

3.4 Sekvence UTRs

Na základě studia literatury byly vybrány 5' a 3' netranslatovatelné úseky (UTRs), tedy regiony obsahující promotory a terminátory, které vykazují největší aktivitu v transfekčních systémech další druhů *Babesia* (Liu et al., 2018a) a příbuzného parazita *Plasmodium* (Crabb et al., 1996): konkrétně, act – aktin (Bdiv_007890; 5'UTR: 2000bp, 3'UTR: 2000bp), HSP 70 - heatshock protein 70 (Bdiv_029570; 5'UTR: 1500bp, 3'UTR: 1500bp), CAM - kadmodulin (Bdiv_005010c; 5'UTR: 1500bp, 3'UTR: 1500bp) a CRT - chloroquiní transporter resistance (Bdiv_036760; 5'UTR: 2000bp, 3'UTR: 1500bp). Sekvence těchto *B. divergens* specifických promotorů a terminátorů byly získána z databáze PiroplasmaDB a po osekvenování (kapitola 3.4.4) použity při designu GFP plazmidu.

3.4.1 Izolace DNA

DNA *B. divergens* byla vyizolována z kultury o parazitémii 5-10 %. K peletu 50 μ l erytrocytů (Centrifuge 5424, Eppendorf; 2000g, 4 °C, 3 minuty) bylo přidáno 150 μ l 1 \times PBS. Samotná DNA byla pak z této suspenze izolována pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Blood DNA (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce. DNA byla skladována ve 4°C. Úspěšnost izolace DNA byla testována pomocí PCR a následné elektroforézy (detailnější popis těchto metod viz kap. 3.4.3) pomocí v laboratoři již dříve ověřených primerů (viz Tab. II; předpokládaná délka produktu 1405bp).

Tab. II: Primery pro ověření izolace DNA

Název	Interní značení	Sekvence	Tm
BdSub1_pet100_F	PK809	CACCACACTGGACCAGGAGACAC CTTC	60 °C
BdSub1_pet100_R	PK810	CTATGGAAAGAAGTAGACTTGCA ACACCCG	60 °C

3.4.2 Design primerů

Primery byly navrženy v programu SnapGene 5.0.7. Délka sekvence a přibližná teplota nasedání těchto primerů je zobrazena v Tab. III. Všechny tyto primery byly testovány pomocí gradientové PCR (viz kap. 3.4.3).

Tab. III: Primery pro amplifikaci UTRs

Název	Interní značení	Sekvence	Tm
bdiv_hsp70_promoter_f	PK819	GGGTACCAGTAGCCATACACGAC	55 °C
bdiv_hsp70_5utr_seq_r	MJ2	CTCTGGCCATCATCAGTGAAGG	
bdiv_act_promoter_f	PK821	GTTCTCTATGCGCATATTCATAGAAGGC	55 °C
bdiv_act_5utr_seq_r	MJ3	CATAGGTATCCTTCTCGTCCATAC	
bdiv_crt_promoter_f	PK817	CGGGGTTACCTATAATTCCACG	55 °C
bdiv_crt_5utr_seq_r	MJ1	GAGTGGTCCAGATAACACCTTTG	
bdiv_cam_promoter_f	PK823	CCGCGGTAAACCTACGATTGC	55 °C
bdiv_cam_5utr_seq_r	MJ4	GCCTCTGTTGGGTTCTGTCC	

bdiv_hsp70_3utr_seq_f	MJ5	CTCGAAGAGAACCTCAGCG	57 °C
bdiv_hsp70_3utr_r	PK843	GGCCAATGCAGTTCTGTGTTAC	
bdiv_crt_3utr_f	PK840	CTCGAGTCTGATTTCGATATCAGATTTAA TGC	57 °C
bdiv_crt_3utr_r	PK841	CTAAGGGAGTGTGACTTACCTTCTC	
bdiv_cam_3utr_f	PK836	GATCAGATGCCGGTTCGAAC	57 °C
bdiv_cam_3utr_r	PK837	GATTCATTGCTGTGTACTGGACC	
bdiv_act_3utr_seq_f	MJ6	CCAGCACCATGAAGATCAAGGTTG	57 °C
bdiv_actin_3utr_r	PK839	GCCGTGGAAATAAGTGGCAAC	

3.4.3 PCR a elektroforéza

Pro PCR byl použit PPP master mix (Top-Bio). Každá reakce o objemu 25 μ l obsahovala: 12,5 μ l PPP Master Mix, 1 μ l 10 μ M forward primer, 1 μ l 10 μ M reverse primer, 7 μ l Ultra PCR H₂O (Top-Bio) a 1 μ l templátová DNA. Všechny reakce probíhaly v termocykleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) nastaveném podle protokolu v Tab. IV.

Tab. IV: Nastavení teplot termocykleru pro PCR

	Teplota	Doba	Počet opakování
Aktivace polymerázy	94 °C	1min	1×
Denaturace	94 °C	15s	
Nasedání primerů	55-60 °C ¹	15s	30×
Elongace	72 °C	1,5-2min ²	
Finální elongace	72 °C	7 min	1×
Chlazení	15 °C		

¹ teplota nasedání uvedena v Tab. II

² 5' UTRs: 1,5 min, 3' UTRs: 2 min

Pro elektroforézu byl připraven 1% agarózový gel: 50ul 1x TAE [výroba 50x TAE: 242g TRIS, 100μl 0,05M EDTA, 57, 1ml CH₃COOH, dolití do 1l destilovanou vodou], 0,5g agarózy (Bioline) a 2μl barviva GelRed (Biotium).

Pro ověření délky produktů byl použit 1 kb ladder (Thermo scientific). Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (Mupid-One, Advance) při napětí 100V po dobu 30 minut. Gel byl poté vizualizován pod UV světlem pomocí UV transluminátoru (G:BOX F3, Syngene).

3.4.4 Enzymatické přečištění, odeslání vzorků na sekvenaci

Před zasláním na sekvenaci byly PCR produkty enzymaticky přečištěny. Do každé PCR reakce o objemu 20μl (5μl použito na elektroforézu) bylo navíc přidáno 0,5μl Exonukleázy I (Thermo Fisher) a 1μl SAP (Thermo Fisher). Vzorky byly inkubovány v termocykleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) 15 minut při 37 °C a poté 15 minut při 85 °C. Po přečištění byly podle pokynů poskytovatele služeb (Sangerovo sekvenování, SeQme) připraveny a odeslány na sekvenaci vždy tři nezávislé PCR produkty od každého UTRs. Pro tento účel byly využity primery z Tab. III a V. Výsledky sekvenace byly analyzovány v programu Geneious prime 8.1.6, a u 5' UTRs úseků byl zjišťován výskyt promotorů pomocí promotor prediktoru (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Tab. V: Sekvenační primery

Název	Interní značení	Sekvence
bdiv_hsp70_5utr_seq	PK848	TTATACCGCCGTCTCGCTTC
bdiv_act_5utr_seq	PK849	GTCGTGGGTATATTCATTTACC
bdiv_act_5utr_mid	PK855	GTGATATCAATGACCAAATGCCAAAAC
bdiv_crt_5utr_seq	PK847	GTTGAGGCAATGTCGCGATC
bdiv_cam_5utr_seq	PK850	ACCGCCTCGAAACATGGATT
bdiv_hsp70_3utr_seq	PK852	GAGCCTCAGGCTCTGAATC
bdiv_crt_3utr_seq	PK851	GTTAACCTGTTTATTGACAACCAGC
bdiv_cam_3utr_seq	PK854	ATGTGTGCCCGTAAGACAGG
bdiv_act_3utr_seq	PK853	CATGCACAAGGTGGTGAAGC
BdSub1_pet100_R	PK810	CTATGGAAAGAAGTAGACTTGCAACAC CCG

3.5 Navržení plazmidu pro vývoj fluorescenční reportérové linie *B. divergens*

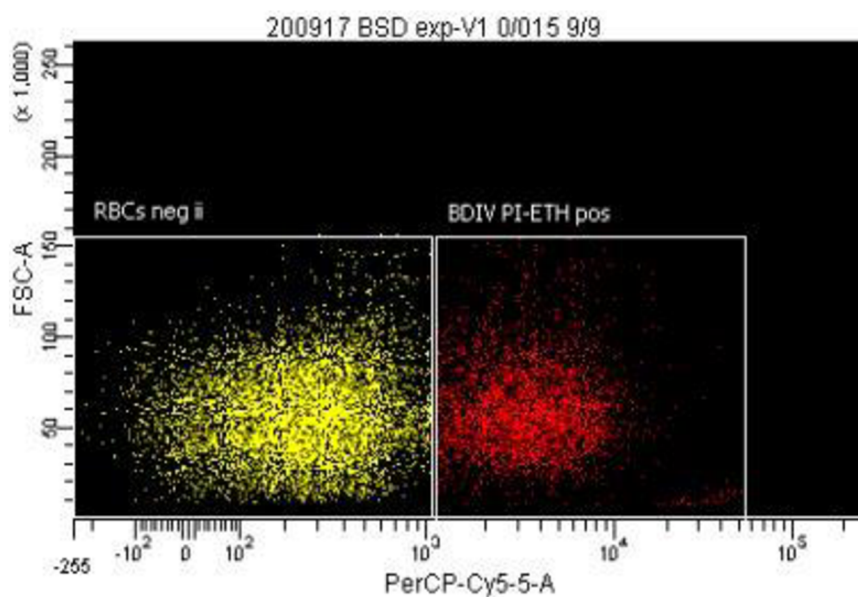
Plazmid pro vývoj fluorescenční reportérové linie *B. divergens* byl navržen v programu SnapGene 5.3.2. Plazmid byl navržen tak, aby obsahoval BSD kazetu (5' UTR, gen rezistence pro BSD, terminátor), GFP kazetu (5' UTR, gen pro GFP, terminátor) a sekvence genů důležitých pro množení plazmidu v kompetentních buňkách (*E. coli*), mezi které například patří gen rezistence proti ampicilinu. Tyto sekvence byly získány z plazmidů použitých pro již zavedené GFP-exprimující linie *B. bovis* a *P. falciparum*, obdržené díky spolupráci Dr. Jalovecké, Dr. Sojky, Dr. Gantera (Heidelberg University, Germany) a Dr. Asady (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan).

4 Výsledky

4.1 Optimalizace barvení a fixace buněk a určení parazitémie pomocí průtokového cytometru

Nejlepších výsledků značení živých buněk bylo dosaženo pomocí barvení SYBR safe ředěním 2500x po dobu barvení 30 minut. EthD-1 a PI nedokázaly obarvit tyto buňky, a analýza na FACS chybně ukazovala nulovou parazitémii (vždy před analýzou na FACS byl zhotoven krevní roztěr a byla určena přesná parazitémie – viz kap. 3.1.4).

Jako nejvhodnější metoda fixace buněk se ukázala inkubace peletu *in vitro* kultury ve směsi s 4% paraformaldehydu a 0,025% glutaraldehydu. Pokud byl k buňkám přidán samotný 4% paraformaldehyd, buňky již pár minut poté začaly lyzovat. Pokud byl přidán pouze 0,025% glutaraldehyd, buňky nebyly stabilně zafixovány a nebylo možné správně určit parazitémii pomocí FACS. Nejefektivněji barvil fixované buňky roztok EthD-1 ředěný 2500x (Obr. 3) při svém působení po dobu 45 minut. Naopak SYBR safe neobarvil buňky v žádné testované koncentraci. PI buňky označil, ale ve srovnání s EthD-1 nebyl signál zcela spolehlivý. Použití Tritonu nemělo na barevné značení žádný vliv, proto nebylo dále používáno.

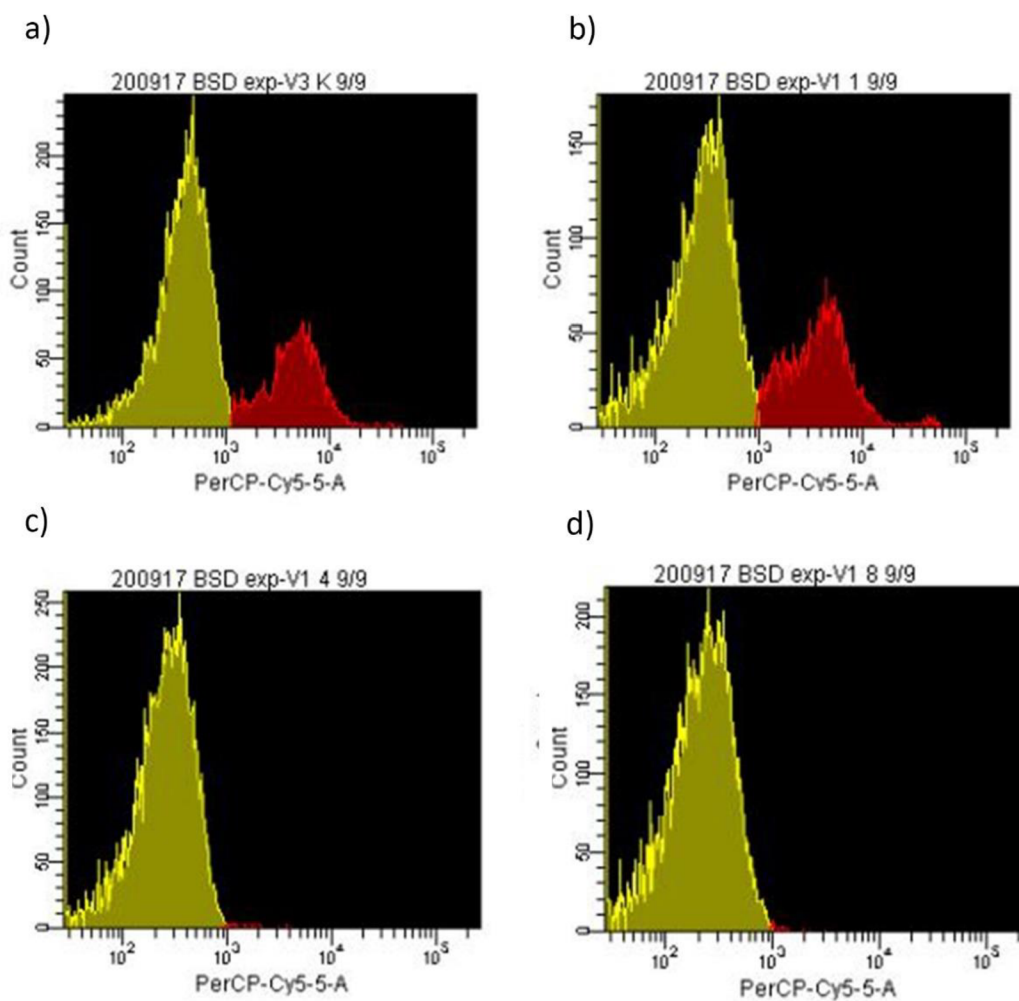


Obr. 3: Optimalizace značení buněk pro průtokovou cytometrii. Kultura byla fixována a poté obarvena pomocí EthD-1 ředěného 2500x. Žlutá populace znázorňuje negativní červené krvinky a červená populace zobrazuje infikované červené krvinky. Parazitémie zde činila 29,7 %. EthD-1 = Ethidium Homodimer.

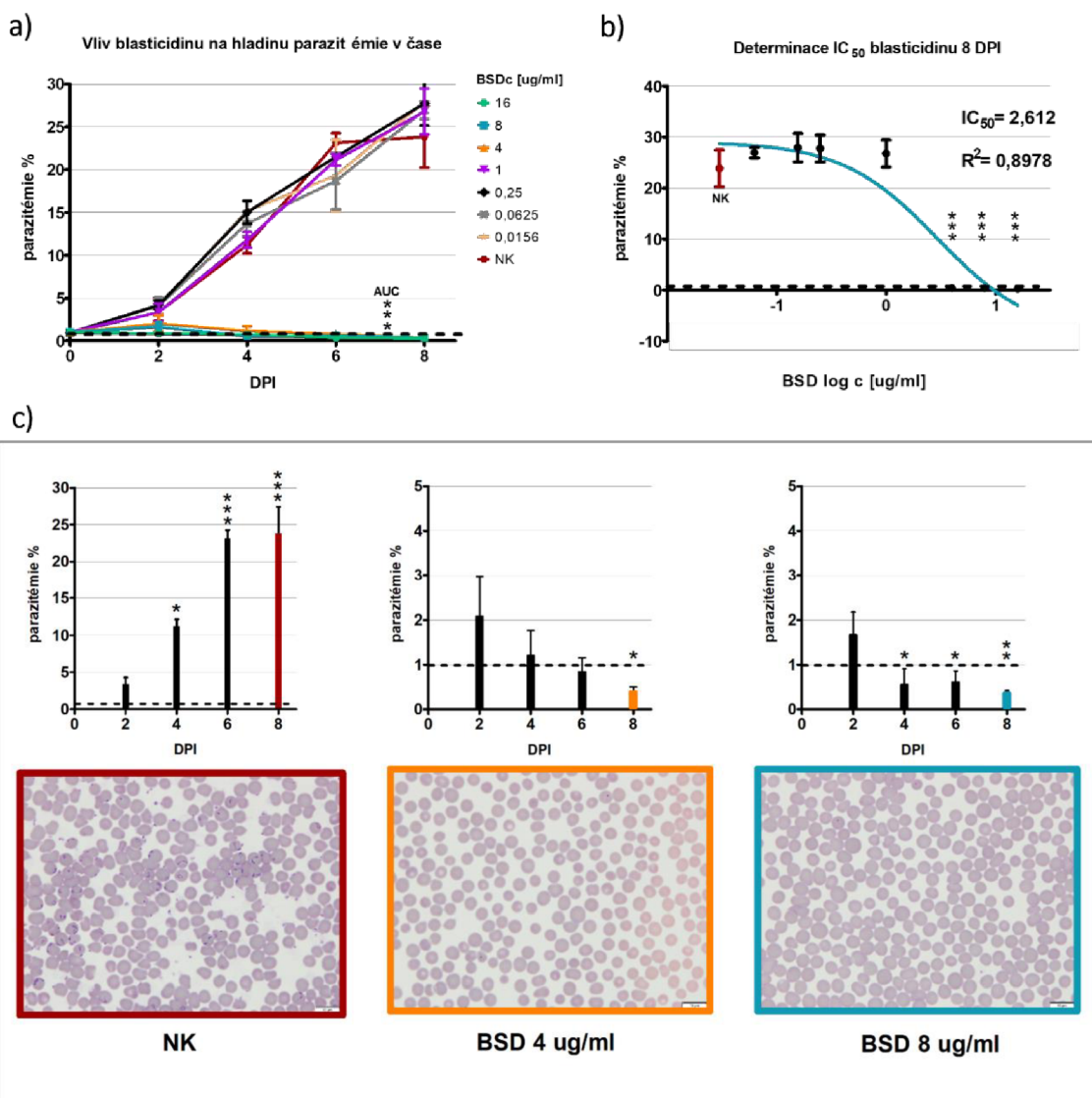
4.2 Inhibiční efekt blasticidinu a určení hodnoty IC₅₀

Stanovením parazitémie pomocí FACS byl potvrzen inhibiční efekt BSD na *in vitro* růst *B. divergens* (Obr. 4). Jednotlivé grafy ukazují naměřené hodnoty parazitémie ze vzorků odebíraných 8 DPI. Oproti kontrole (Obr. 4a), kdy parazitémie zobrazená v grafu činila 26,4%, koncentrace 1 μg/ml neměla ještě na replikaci parazita vliv (naměřená parazitémie 27,2%, Obr. 4b). Ke znatelnému poklesu parazitémie došlo při koncentraci BSD 4 a 8 μg/ml (0,4 % a 0,3 %, Obr. 4c a 4d). Obr. 5a znázorňuje změnu parazitémie v čase pro jednotlivé koncentrace. Inhibiční efekt BSD začal být prokazatelný u koncentrace 4 μg/ml, kdy parazitémie poslední sledovaný den experimentu (8 DPI) činila 0,4 % ± 0,1. Hodnota AUC (6,7 ± 0,6) analyzovaná z celkové křivky růstu parazita při koncentraci BSD 4 μg/ml byla významně snížena (p <0,001) oproti AUC NK (80,9 ± 28,7). Stejný efekt byl prokázán u koncentrace 8 μg/ml, kdy parazitémie totožný sledovaný den experimentu činila 0,4 % ± 0,1, a hodnota AUC (5,0 ± 2,2) se opět významně snížila (p <0,001) ve srovnání s AUC NK. Koncentrace 16 μg/ml byla také prokázána jako inhibiční, parazitémie v tento den dosahovala 0,3 % ± 0,1, a hodnota AUC (3,3 ± 0,9) se opět potvrdila jako průkazně snižená (p <0,001) oproti AUC NK. Další analyzované koncentrace BSD (1; 0,25; 0,0625; 0,0156 μg/ml) byly prokázány jako neefektivní, a hodnoty AUC se statisticky významně nelišily od AUC NK.

Obr. 5b zobrazuje statistické určení hodnoty IC_{50} , kdy byly triplikáty zprůměrovány a určena jejich směrodatná odchylka a data byla normována (logaritmována) a poté zpracována. **Výsledná IC_{50} = 2,612 ug/ml**, při $R^2 = 0,8978$. Obr. 5c porovnáva změny parazitémie pro negativní kontrolu (NK) a pro kultury ošetřené médiem s BSD o koncentraci 4 a 8 μ g/ml včetně zobrazení roztěrů krevních kultur 8DPI. U NK je vidět statisticky průkazný nárůst parazitémie: 2 DPI parazitémie činila 3,4 % \pm 0,8 a 4 DPI se významně zvýšila na 16,2 % \pm 7,1 ($p < 0,05$). 6 DPI pak došlo k průkaznému nárůstu na 23,1 % \pm 0,9 ($p < 0,001$) a 8 DPI již spíše stagnovala s hodnotou 23,9 % \pm 2,55, která ale oproti hodnotě parazitémie ze 2 DPI byla stále významně zvýšená ($p < 0,001$). U efektivních koncentrací BSD 4 a 8 μ g/ml bylo naopak pozorováno snižování parazitémie. 2 DPI parazitémie u vzorků ošetřených BSD 4 μ g/ml činila 2,1 % \pm 0,9 a statistiky průkazně snížení se ukázalo až 8 DPI (0,4 % \pm 0,1, $p < 0,05$). Kultury ošetřené BSD 8 μ g/ml 2 DPI vykazovaly parazitémii 1,7 % \pm 0,5, a statisticky významné snížení parazitémie bylo vidět u všech ostatních analyzovaných intervalů: 4 DPI (0,6 % \pm 0,4, $p < 0,05$), 6 DPI (0,6 % \pm 0,3, $p < 0,05$), a 8 DPI (0,4 % \pm 0,1, $p < 0,01$). K selekci plazmidu v *in vitro* kultuře *B. divergens* lze tedy využít koncentraci BSD 4 μ g/ml. Ani při nejvyšších sledovaných koncentracích nebyl pozorován toxický účinek BSD na červené krvinky.



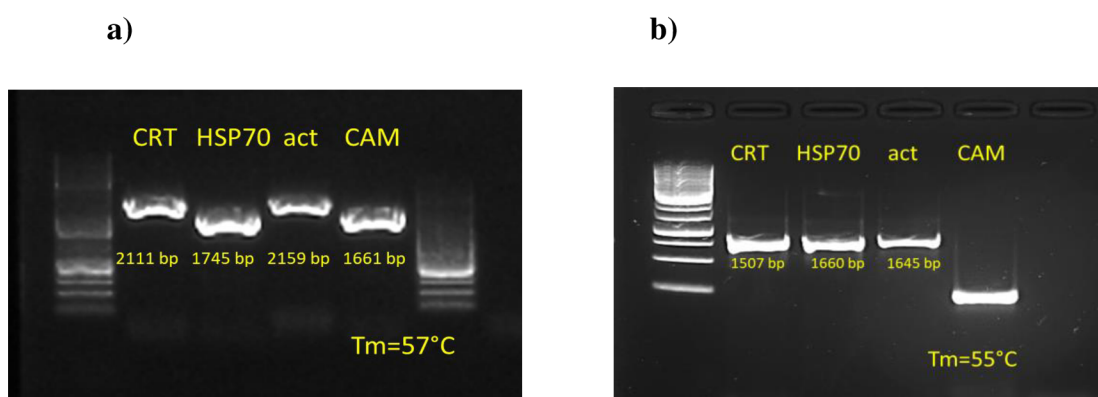
Obr. 4: Vyhodnocení parazitémie pomocí průtokového cytometru pro určení efektivní inhibiční koncentrace blastidicinu. Graf znázorňuje počet buněk v závislosti na světelném signálu a rozlišuje 2 populace: populaci infikovaných (červeně) a neinfikovaných (žlutě) červených krvinek při různých koncentracích BSD analyzovaných 8 DPI. **a)** NK kultura bez obsahu BSD; parazitémie 26,4 %. **b)** Kultura s koncentrací BSD 1 µg/ml, kdy zatím není zřetelný inhibiční efekt; parazitémie 27,2 %. **c)** Kultura s koncentrací BSD 4 µg/ml, při které došlo k efektivní inhibici růstu babesii; parazitémie 0,4 % **d)** Kultura s koncentrací BSD 8 µg/ml kde byla opět potvrzena úplná inhibice růstu babesii; parazitémie 0,3 %. Pro obarvení kultur *B. divergens* byl použit EthD-1. BSD = blastidicin, NK = negativní kontrola, EthD-1 = Ethidium Homodimer, DPI = den po infekci.



Obr. 5: Efekt blasticidinu na multiplikaci *B. divergens* v *in vitro* kultuře. a) Změna parazitémie v čase v *in vitro* kultuře *B. divergens* ošetřené různými koncentracemi BSD. Graf znázorňuje průměr tří nezávislých biologických replikátů a jejich směrodatnou odchylku. Hodnoty parazitémie byly určeny pomocí průtokové cytometrie, pro obarvení kultur *B. divergens* byl použit EthD-1. Statistické porovnání hodnot AUC ukázalo významnou inhibici růstu pro koncentrace 4, 8 a 16 µg/ml. Experimentální podmínky: počáteční parazitémie 1 % (přerušovaná linie). b) Určení BSD IC₅₀. Data byla zlogaritmována a zpracována v programu Graphpad Prism 8.0.1. c) Porovnání změn parazitémie pro NK a pro kultury ošetřené médiem s BSD o koncentraci 4 a 8 µg/ml. Krevní roztěry byly obarveny pomocí DiffQuik staining setu. BSD = blasticidin, NK = negativní kontrola, DPI = den po infekci, EthD-1 = Ethidium Homodimer, AUC = plocha pod křivkou, * = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,001. Použitý statistický test: jednocestná ANOVA.

4.3 Sekvence *B. divergens*-specifických 5' a 3' UTRs

Vyizolovaná DNA *B. divergens* z *in vitro* kultury byla úspěšně otestována pomocí již dříve v laboratoři ověřených primerů (viz Tab. II). Pomocí navržených primerů (Tab. III) byly PCR amplifikovány všechny vybrané 5' a 3' UTRs. Nejprve byla zjištěna optimální teplota nasedání primerů pro amplifikaci 5'UTRs (region obsahující promotory): 57 °C (Obr. 6a), poté optimální teplota nasedání primerů pro amplifikaci 3'UTRs (terminátory): 55 °C (Obr. 6b).

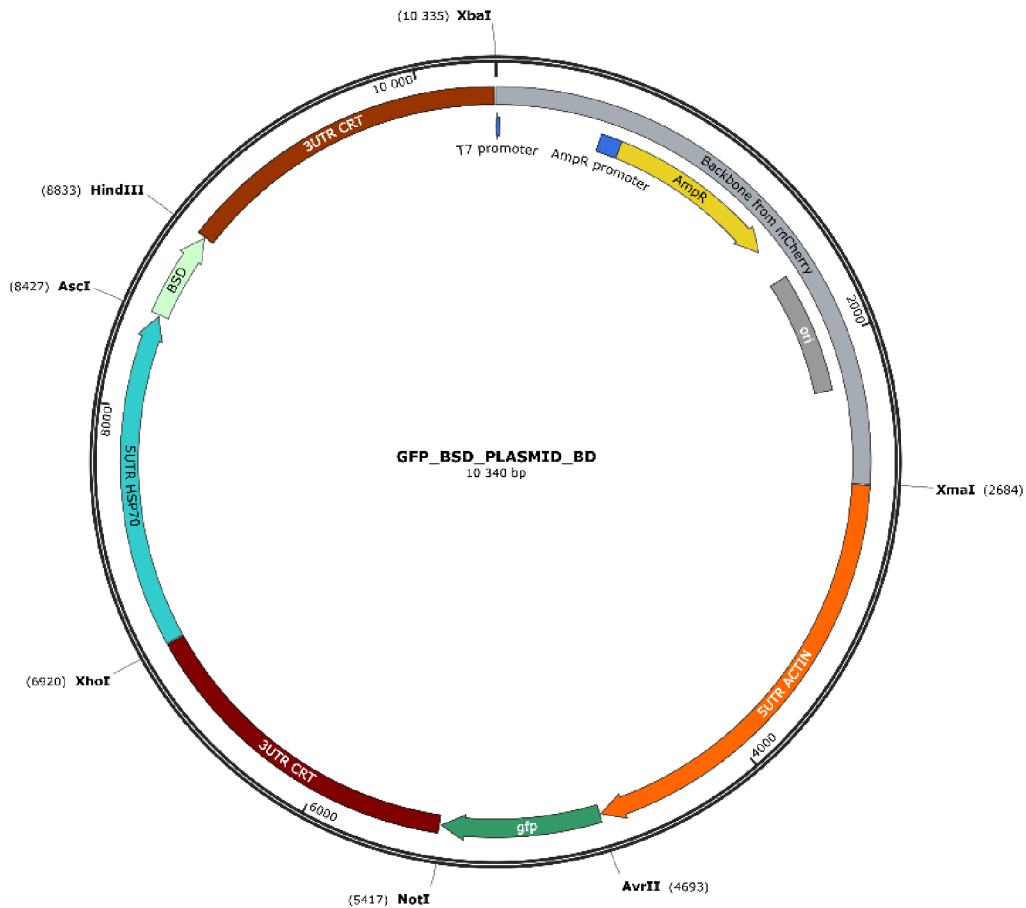


Obr. 6: Agarózový gel zobrazující amplifikované 5' a 3' UTRs. a) Tm = 57 °C, CRT (2111 bp), HSP 70 (1745 bp), act (2159 bp), CAM (1661 bp), 1 kb ladder. b) Tm = 55 °C, CRT (1507 bp), HSP 70 (1660 bp) act (1645 bp), CAM (760 bp), 1 kb ladder. CRT = chloroquiní transporter resistance, HSP = heatshock protein, act = aktin, CAM = kadmodulin.

Získané sekvence vždy tří nezávislých PCR produktů od každého UTRs byly analyzovány pomocí aligmentu v programu Geneious a porovnány s referenčními sekvencemi získanými z PiroplasmaDB. Konzensus výsledných sekvencí včetně detailní analýzy SNP (jednonukleotidový polymorfismus) a u 5' UTR také predikce promotorů, jsou uvedeny v příloze na konci práce (příloha č. 1–8). V sekvenci 5' UTR aktinu bylo detekováno 31 SNP oproti referenční sekvenci, a bylo zde predikováno 5 promotorů. 3' UTR téhož genu neukázala žádný SNP. 5' UTR HSP 70 sekvence ukázala 3 SNP a 3 promotory, jeho 3' UTR sekvence neukázala žádný SNP. V sekvenci 5' UTR CRT bylo možné nalézt 2 SNP, 4 promotory. V sekvenci 3' UTR stejného genu nebyl detekován žádný SNP. U 5' i 3' UTR CAM sekvence nebyl nalezen žádný SNP, a v sekvenci 5' UTR CAM byly predikovány 2 promotory.

4.4 Design plazmidu pro vývoj fluorescenční reportérové linie *B. divergens*

Pro finální design plazmidu byly vybrány námi získané sekvence 5' UTR HSP 70 (Bdiv_029570), 5' UTR act (Bdiv_007890) a 3' UTR CRT (Bdiv_036760). Dané úseky byly vybrány pro jejich optimální délku a absenci CDS (kódující sekvence) jiných hypotetických genů. V programu SnapGene 5.3.2 byly také vyhledány a navrženy unikátní restrikční místa pro celý plazmid. Obr. 7 znázorňuje výslednou mapu plazmidu s navrženými unikátními restrikčními místy. Restrikční místa byla navržena tak, aby se případně sekvence mezi nimi mohla v budoucnu nahradit jinou (např. výměna úseku obsahující promotory).

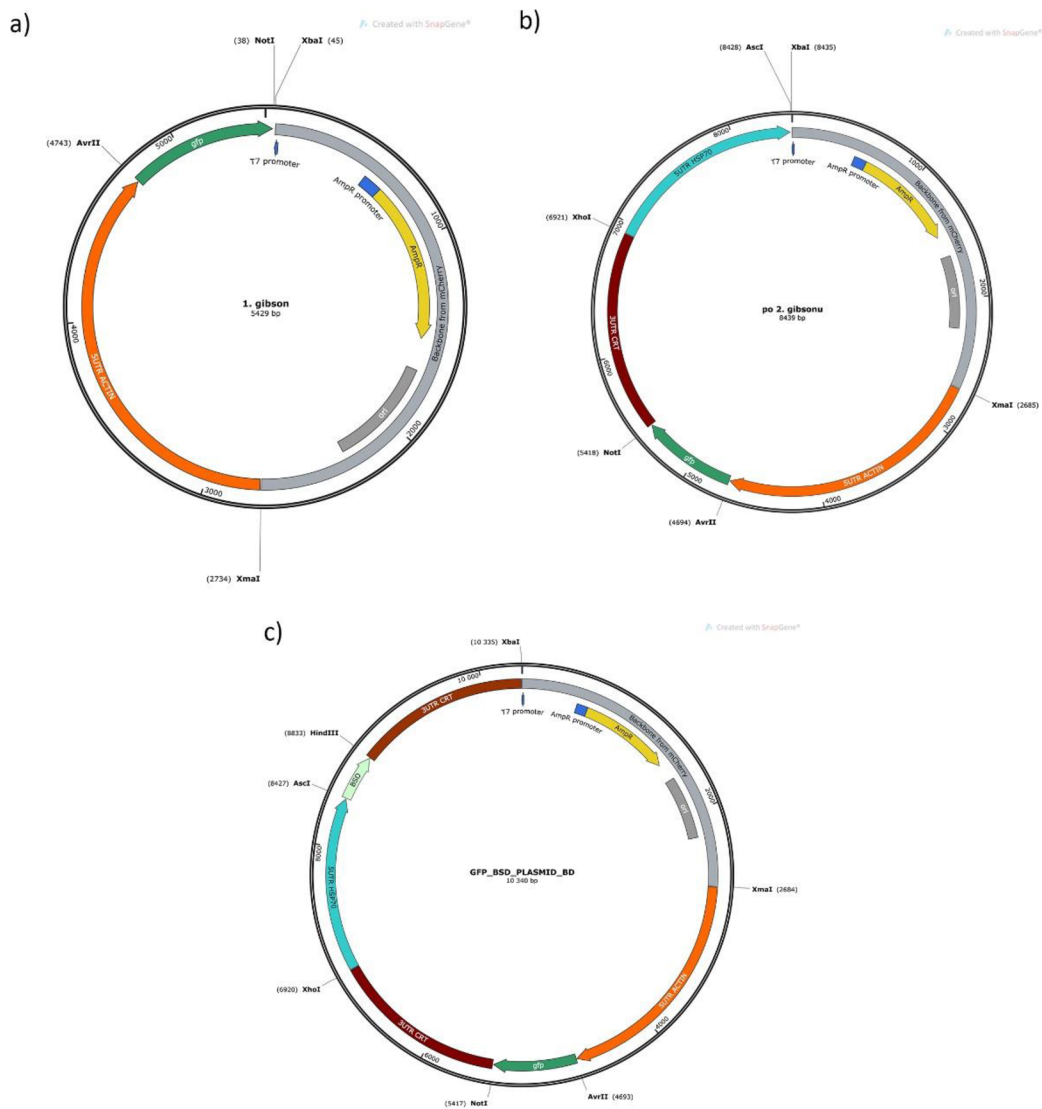


Obr. 7: Mapa finálního plasmidu s vyznačenými úseky a restričními místy. Plasmid obsahuje: 5' UTR HSP 70 (Bdiv_029570), 5' UTR act (Bdiv_007890), 3' UTR CRT (Bdiv_036760) a kódující sekvenec: gen pro GFP a gen pro rezistenci proti BSD; délka plasmidu: 10 340bp. UTR = netranslatovatelný úsek, CRT = chloroquiní transporter resistance, HSP = heatshock protein, act = aktin, CAM = kadmodulin, GFP = z angl. green fluorescent protein, BSD = blasticidin.

Poté bylo navrženo schéma postupného složení celého plasmidu pomocí několika následných Gibson assembly reakcí. Pro každý PCR úsek byly navrženy primery s odpovídajícími přesahy (minimálně 20bp, viz Tab.VI), jejichž funkce již byla ověřena. Přesahy primerů obsahují sekvence unikátních restričních míst, která budeme do plasmidu vkládat. Tento postup byl pak úspěšně ověřen *in silico* v programu SnapGene. Schématický plán sestavování úseků zobrazuje Obr. 8.

Tab. VI: Primery na amplifikaci úseků použitých pro Gibson assembly

Název	Sekvence
Backbone_NotI_XbaI_F	GGTATTACTCACGGAATGGATGAGCTTTATAAATAAGCGGCCGCTCTAG ACTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGC
Backbone_XmaI_R	CTTCTATGAATATGCGCATAGAGAACAAGACCCGGGGAGTATTCTATAGT GTCACCTAAATAGCTTGG
actin_XmaI_F	CCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCCCCGGGTCTTGTTCTCTAT GCGCATATTCATAGAAG
actin_AvrII_R	CCAGTAAACAACCTCTTCTCCCTTACTCATCCTAGGTTTGAAGGGTTATTAT CCTAAAAGTGGATGATATG
GFP_AvrII_F	CATATCATCCACTTTTAGGATAATAACCCTCAAACCTAGGATGAGTAAG GGAGAAGAGTTGTTACTGG
GFP_NotI_XbaI_R	GCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGTCTAGAGCGGCCGCTTATTT ATAAAGCTCATCCATTCCGTGAGTAATACC
CRT_NotI_F	GGTATTACTCACGGAATGGATGAGCTTTATAAATAAGCGGCCGCTTCGAT ATCAGATTTAATGCTAGTTAATTCAAAAAGCC
CRT_XhoI_R	GTCGTGTATGGCTACTGGTACCCCTCGAGCTAAGGGAGTGTGACTTACCT TCTC
HSP70_XhoI_F	GAGAAGGTAAGTCACACTCCCTTAGCTCGAGGGGTACCAGTAGCCATAC ACGAC
HSP70_AscI_XbaI_R	GCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGTCTAGAGGCGCGCCTTTCGG GCGGTCTCACGG



Obr. 8: Schéma postupného sestavování plazmidu. a) Nejprve budou spojeny úseky 5`UTR act, GFP a backbone obsahující mimo jiné gen pro rezistenci na ampicilin. **b)** Poté bude do plazmidu vzniklého v předchozím kroku vložen úsek 3`UTR CRT a 5`UTR HSP 70 (linearizace pomocí restrikčního enzymu XbaI). **c)** Nakonec bude do plazmidu vložen gen resistance proti BSD a 3`UTR CRT (linearizace pomocí restrikčního enzymu XbaI). UTR = netranslatovatelný úsek, CRT = chloroquiní transporter resistance, HSP = heatshock protein 70, act = aktin, CAM = kadmodulin, BSD = blasticidin, GFP = z angl. green fluorescent protein.

5 Diskuze

Babesia divergens je intra-erytrocytární parazit přenášený klíšťaty, který patří do skupiny Apicomplexa. Babesioza způsobená *B. divergens* představuje riziko pro hospodářská zvířata i pro člověka zejména v rámci Evropy, a proto představuje náš modelový organismus (Jalovecka et al., 2019). *B. divergens* patří mezi méně probádané organismy, a to i v rámci skupiny *Babesia*, a řada jevů a procesů v biologii tohoto parazita nebyla dosud objasněna. Metody genetické manipulace představují užitečný nástroj pro studium biologie babesií a jejich interakcí s hostitelem či vektorem. Výzkum strategií, které souvisí s parazitickým způsobem babesií může v budoucnu usnadnit návrh specifických léků a vakcín (Asada et al., 2012). Velká škála metod genetické manipulace je již úspěšně zavedena a využívána pro několik příbuzných parazitů, zejména pro *Plasmodium* spp. a *Toxoplasma gondii*, zatímco pro babesie jich je dosud využíváno pouze omezené množství (Hakimi et al., 2021). Přesto však dostupnost *in vitro* kultivace a recentně publikované kompletní sekvence genomů některých druhů babesií umožnily zavést základní metody genetické manipulace. U babesií se dnes rutinně využívá zavedených stabilních transfekčních systémů např. u druhů *B. bovis* či *B. bigemina* (Suarez & McElwain, 2010). Pro *B. divergens* jsou sice známy metody *in vitro* kultivace (Jalovecka et al., 2016), i je známá sekvence celého genomu (Young et al., 2019), ale není dosud zaveden žádný transfekční systém. Vývoj takového systému *de novo* je proto nezbytný pro náš modelový organismus, a usnadní detailní studium biologie tohoto parazita.

Typický (obecný) plazmid pro vývoj transfekčních linií nejen parazitů většinou obsahuje backbone – sekvence důležité pro množení v bakteriích včetně genu pro rezistenci na antibiotika, kazetu obsahující selekční marker – gen rezistence proti selekční droze úspěšně inhibující růst parazita, a kazetu obsahující cílený gen – třeba fluorescenční signál, nejčastěji GFP nebo mCherry (Day & Davidson, 2009).

U babesií jsou známy dva druhy selekčních systémů: BSD/blastocidin-S-deamináza a WR99210/hdhfr (Asada et al., 2015; Hakimi et al., 2021). Selekční droga slouží k vytvoření selekčního tlaku na buňky: tímto způsobem lze „přinutit“ buňku parazita uchovat si plazmid, který obsahuje selekční marker (Suarez et al., 2017). V našem případě jsme se rozhodli využít BSD, který účinně funguje v kulturách jiných druhů babesií (Asada et al., 2015; Suarez & McElwain, 2009) a plasmodií (ben Mamoun et al., 1999). Abychom věděli, jakou koncentraci použít v budoucím transfekčním systému, bylo nejprve nutné určit jeho efektivní inhibiční koncentraci. Proto jsme navrhli experiment, který ale vyžadoval zpracování a určení parazitémie u velkého množství vzorků. Parazitémie se obecně u babesií, tedy i u *B. divergens*

tradičně získává vyhodnocováním krevních nátěrů barvených pomocí Giemsa-like barvení, což může být velmi časově náročné při analýze vysokého počtu vzorků a výsledky mohou být subjektivní (Lim et al., 2016). Pro rychlejší stanovení parazitémie u námi plánovaných experimentů bylo tedy potřeba zavést a optimalizovat inovativní postup. Pro tyto účely bylo využito metody průtokové cytometrie, která je zavedená již u *P. falciparum* (Jang et al., 2014). Principem stanovení parazitémie pomocí FACS je značení parazitů v červených krvinkách barevným činidlem vázající se na DNA. V *in vitro* kultuře *B. divergens* se vyskytuje jaderná DNA pouze u parazitů, červené krvinky jádro neobsahují. Vhodným barvením DNA lze tedy rozlišit infikované a neinfikované erythrocyty. Bylo testováno několik barevných činidel pro živé buňky (SYBR safe, PI, EthD-1) v různých ředěních (500x, 1000x, 1500x, 2000x, 2500x). Pro dlouhodobé uchování vzorků byla pak optimalizována metoda fixování živých buněk, kdy byly testovány roztoky paraformaldehydu + glutaraldehydu v různých poměrech. Glutaraldehyd se standardně používá pro zachování tvaru červených krvinek (Abay et al., 2019), a paraformaldehyd je běžně využívané činidlo pro fixáž erythrocytů parazitovaných *P. falciparum* (Jang et al., 2014). Fixované buňky byly barveny při stejných podmínkách jako buňky živé. Nejlepších výsledků barvení živých buněk bylo získáno smícháním peletu s 2500x zředěného SYBR safe. Fixace buněk pak probíhala nejlépe při smíchání peletu se směsí 4% paraformaldehydu a 0,0025% glutaraldehydu, a nejlepších výsledků barvení fixovaných buněk bylo prováděno pomocí 2500x ředěného EthD-1 (Obr. 3). U *P. falciparum* se používá spíše SYBR Green I i u fixovaných buněk, běžně se také využívá i barvení pomocí PI (Jang et al., 2014). V našem případě, ale nebyly tyto typy barvení příliš účinné – fixované buňky SYBR neobarvil buňky vůbec, a PI se ve srovnání EthD-1 neměl zcela spolehlivý signál.

Jak je již zmíněno výše, pro naše účely jsme zvolili selekční drogu BSD. Naše kultura *B. divergens* byla podrobena experimentu, při kterém byl testován vliv různých koncentrací BSD na růst parazita (16; 8; 4; 1; 0,25; 0,0625; 0,0156 $\mu\text{g/ml}$). Pomocí optimalizované metody určení parazitémie průtokovou cytometrií (Obr. 4) byla určena parazitémie pro každou koncentraci BSD, a ze získaných dat byla statisticky determinována hodnota IC_{50} , která činila 2,612 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 5b). BSD účinně inhiboval růst babesíí při koncentracích 16, 8 a 4 $\mu\text{g/ml}$, kdy hodnota AUC byla významně ($p < 0,001$) snížena ve srovnání s AUC NK, a ani při nejvyšších sledovaných koncentracích nebyl pozorován toxický účinek BSD na červené krvinky (Obr. 5a a 5c). V budoucím transfekčním systému *B. divergens* plánujeme tedy používat koncentraci BSD 4 $\mu\text{g/ml}$.

Obdobný experiment byl již proveden pro *B. bovis*, kde byla determinována hodnota BSD IC₅₀ 0,4 µg/ml (Suarez & McElwain, 2010), avšak běžně se jako selekční marker v kulturách babesii využívá BSD právě o koncentraci 4 µg/ml (Asada et al., 2015).

Aby mohly být geny v námi navrženém plazmidu (gen pro GFP a gen rezistence proti BSD – selekční marker) exprimovány, musí plazmid obsahovat i UTR sekvence obsahující promotory a terminátory. Na základě studia literatury byly vybrány takové úseky, které vykazují největší aktivitu v transfekčních systémech další druhů *Babesia* (Liu et al., 2018a) a příbuzného parazita *Plasmodium* (Crabb et al., 1996) – CRT, HSP 70, act, CAM (Obr. 6). U všech získaných sekvencí regionů obsahujících promotory a terminátory byly řešeny SNP, a u 5' UTR byly predikovány promotory. Každý úsek obsahoval dle predikce několik promotorů např. 5' UTR act dle predikce ukazuje hodně promotorů (Příloha č. 1), což se shoduje s analýzou provedenou u *B. bovis* a *B. bigemina*, kde 5' UTR aktinu vede k silné expresi žádaného genu (Liu et al., 2018a). Obdobně silný účinek na expresi žádaného genu měl i 5' UTR HSP 70 babesii i plasmodií (Liu et al., 2018a; Thawnashom et al., 2019), který u *B. divergens* obsahuje XX predikovaných promotorů (Příloha č. 2). 5' UTR CAM a CRT jsou běžně využívány k expresi žádaných genů v transfekčních systémech plasmodií (Moraes Barros et al., 2021), a námi osekvenované úseky též dle predikce obsahují promotory (příloha č. 4 a 3). Můžeme tedy předpokládat, že i tyto 5' UTR jsou vhodné do transfekčního systému *B. divergens* k expresi žádaných genů.

Některé námi získaných UTRs obsahovaly hypotetické části CDS neznámých genů, ale i jiné GFP plazmidy pro babesie či plasmodia je běžně obsahují a dosud nebyl zaznamenán vliv na funkci (Asada et al., 2012; Suarez & McElwain, 2009). Pro jistotu jsme však při finálním návrhu plazmidu vybrali úseky bez těchto hypotetických CDS.

V námi navrženém finálním plazmidu (Obr. 7) jsme se rozhodli využít fluorescenčního signálu GFP, který se běžně používá k *in vivo* značení babesii (Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018b; Liu et al., 2020; Silva et al., 2018; Suarez & McElwain, 2009). Ke genu GFP byly pak vybrány námi ověřené sekvence 5' UTR act (Bdiv_007890) a 3' UTR CRT (Bdiv_036760), a ke genu rezistence na BSD sekvence 5' UTR HSP 70 (Bdiv_029570) a 3' UTR CRT (Bdiv_036760). Sekvence GFP byla použita z plazmidu pro *P. falciparum* od spolupracující laboratoře dr. Gantera (Heidelberg University, Germany). Sekvence genu BSD rezistence a backbone byla získána z plazmidu pro *B. bovis* od Dr. Asady (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan). Do plazmidu byla také vložena unikátní restriční místa, která v budoucnu mohou sloužit k výměně žádoucího úseku. Byl navržen postup konstrukce plazmidu, který bude sestaven pomocí několika následných Gibson

assembly reakcí obsahující příslušné PCR produkty s odpovídajícími přesahy (Obr. 8). Gibson assembly je reakce, která umožňuje složení několika segmentů DNA s přesahy a byla použita i k sestavení celého mitochondriálního genomu z malých segmentů DNA (Gibson et al., 2010). Tento systém se také běžně využívá k tvorbě plazmidů pro transfekční systémy plasmodií (Wagner et al., 2013) Gibson assembly je výhodnější než klasické klonování, jehož nevýhody jsou především nekompatibilita restričních enzymů, potřeba ligace a omezená velikost segmentů apod. (McAllaster et al., 2016). Pro PCR produkty s přesahy byly již navrženy a úspěšně ověřeny primery. Celý plánovaný postup *de novo* konstrukce *B. divergens*-specifického GFP-exprimujícího plazmidu byl úspěšně ověřen pomocí *in silico* klonování v programu SnapGene 5.3.2. Vlastní konstrukce navrženého plazmidu a jeho následná transfekce do *B. divergens* bude předmětem mé diplomové práce.

6 Závěr

- Provedla jsem stručnou literární rešerše na téma " Strategie genetického inženýrství u parazitů rodu *Babesia* “.
- Zavedla jsem metodu vyhodnocování parazitémie *B. divergens* v *in vitro* kultuře pomocí průtokového cytometru.
- Ověřila jsem citlivost *B. divergens* na selekční drogu blasticidin a určila jeho efektivní inhibiční koncentraci v *in vitro* kultuře.
- Vybrala, identifikovala a osekvenovala jsem *B. divergens* specifické 5' a 3' UTR (netranslatovatelné úseky) vhodné pro přípravu plazmidu.
- Navrhla jsem GFP plazmid pro episomální expresi GFP v *in vitro* kultuře *B. divergens* a ověřila ho pomocí *in silico* klonování.

7 Literatura

- Abay, A., Simionato, G., Chachanidze, R., Bogdanova, A., Hertz, L., Bianchi, P., van den Akker, E., von Lindern, M., Leonetti, M., Minetti, G., Wagner, C., & Kaestner, L. (2019). Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells. *Frontiers in Physiology*, *10*(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00514>
- Andenmatten, N., Egarter, S., Jackson, A. J., Jullien, N., Herman, J. P., & Meissner, M. (2013). Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nature Methods*, *10*(2), 125. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2301>
- Antunes, S., Rosa, C., Couto, J., Ferrolho, J., & Domingos, A. (2017). Deciphering Babesia-Vector Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(SEP), 429. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00429>
- Asada, M., Tanaka, M., Goto, Y., Yokoyama, N., Inoue, N., & Kawazu, S. I. (2012). Stable expression of green fluorescent protein and targeted disruption of thioredoxin peroxidase-1 gene in *Babesia bovis* with the WR99210/dhfr selection system. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *181*(2). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.11.001>
- Asada, M., Yahata, K., Hakimi, H., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kaneko, O., Suarez, C. E., & Kawazu, S. I. (2015). Transfection of *Babesia bovis* by double selection with WR99210 and blasticidin-S and its application for functional analysis of thioredoxin peroxidase-1. *PLoS ONE*, *10*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125993>
- Barros, R. R. M., Straimer, J., Sa, J. M., Salzman, R. E., Melendez-Muniz, V. A., Mu, J., Fidock, D. A., & Wellems, T. E. (2015). Editing the *Plasmodium vivax* Genome, Using Zinc-Finger Nucleases. *The Journal of Infectious Diseases*, *211*(1), 125. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIU423>
- ben Mamoun, C., Gluzman, I. Y., Goyard, S., Beverley, S. M., & Goldberg, D. E. (1999). A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (Vol. 96). www.pnas.org.
- Bibo-Verdugo, B., Wang, S. C., Almaliti, J., Ta, A. P., Jiang, Z., Wong, D. A., Lietz, C. B., Suzuki, B. M., El-Sakkary, N., Hook, V., Salvesen, G. S., Gerwick, W. H., Caffrey, C. R., & O'Donoghue, A. J. (2019). The proteasome as a drug target in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *ACS Infectious Diseases*, *5*(10), 1802. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.9B00237>

- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'hostis, M., & Chauvin, A. (2007). Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*, *134*(2), 197–207. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001545>
- Cao, Y., Zhu, H., He, R., Kong, L., Shao, J., Zhuang, R., Xi, J., & Zhang, J. (2020). Proteasome, a Promising Therapeutic Target for Multiple Diseases Beyond Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, *14*, 4327. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265793>
- Cavalier-Smith, T., de Waal, D. T., & Allsopp, B. A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, *108* (Pt 2)(2), 147–152. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068232>
- Choi, R., Hulverson, M. A., Huang, W., Vidadala, R. S. R., Whitman, G. R., Barrett, L. K., Schaefer, D. A., Betzer, D. P., Riggs, M. W., Doggett, J. S., Hemphill, A., Ortega-Mora, L. M., McCloskey, M. C., Arnold, S. L. M., Hackman, R. C., Marsh, K. C., Lynch, J. J., Freiberg, G. M., Leroy, B. E., ... van Voorhis, W. C. (2020). Bumped Kinase Inhibitors as therapy for apicomplexan parasitic diseases: lessons learned. *International Journal for Parasitology*, *50*(5), 413. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2020.01.006>
- Cobb, D. W., Florentin, A., Fierro, M. A., Krakowiak, M., Moore, J. M., & Muralidharan, V. (2017). The Exported Chaperone PfHsp70x Is Dispensable for the *Plasmodium falciparum* Intraerythrocytic Life Cycle. *MSphere*, *2*(5). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00363-17>
- Cochrane, J. C., Lipchock, S. v., & Strobel, S. A. (2007). Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chemistry & Biology*, *14*(1), 97. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2006.12.005>
- Collins, C. R., Das, S., Wong, E. H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J. P., Müller, S., Meissner, M., & Blackman, M. J. (2013). Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Molecular Microbiology*, *88*(4), 687–701. <https://doi.org/10.1111/mmi.12206>
- Crabb, B. S., Cowman, A. F., Nossal, G. J. v., & Hall, W. (1996). Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum* (*plasmodium/falciparum/transcription*) Communicated by. In *Medical Sciences* (Vol. 93).

- Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M. A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2004). The “expanding universe” of piroplasms. *Veterinary Parasitology*, *119*(4), 337–345. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2003.11.015>
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, *38*(10), 2887. <https://doi.org/10.1039/B901966A>
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2015). Advances in molecular genetic systems in malaria. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 373–387). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3450>
- del Carmen Terrón, M., González-Camacho, F., González, L. M., Luque, D., & Montero, E. (2016). Ultrastructure of the *Babesia divergens* free merozoite. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *7*(6), 1274–1279. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2016.07.001>
- Djokic, V., Rocha, S. C., & Parveen, N. (2021). Lessons Learned for Pathogenesis, Immunology, and Disease of Erythrocytic Parasites: Plasmodium and Babesia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.685239>
- Fernandes, P., Briquet, S., Patarot, D., Loubens, M., Hoareau-Coudert, B., & Silvie, O. (2020). The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLOS ONE*, *15*(10), e0236616. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0236616>
- Ferré-D’Amaré, A. R. (2010). The glmS ribozyme: use of a small molecule coenzyme by a gene-regulatory RNA. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *43*(4), 423. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000144>
- Gibson, D. G., Smith, H. O., Hutchison, C. A., Venter, J. C., & Merryman, C. (2010). Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature Methods* *2010* *7*:11, *7*(11), 901–903. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1515>
- Goodswen, S. J., Kennedy, P. J., & Ellis, J. T. (2021). Predicting Protein Therapeutic Candidates for Bovine Babesiosis Using Secondary Structure Properties and Machine Learning. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.716132/FULL>
- Guimaraä, A. M., Lima, J. D., & Ribeiro, M. F. B. (1998). Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, *84*, 323–327.
- Haapasalo, K., Suomalainen, P., Sukura, A., Siikamäki, H., & Sakari Jokiranta, T. (2010). Fatal babesiosis in man, Finland, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(7), 1116–1118. <https://doi.org/10.3201/eid1607.091905>

- Hakimi, H., Asada, M., & Kawazu, S. I. (2021). Recent advances in molecular genetic tools for babesia. In *Veterinary Sciences* (Vol. 8, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vetsci8100222>
- Hakimi, H., Ishizaki, T., Kegawa, Y., Kaneko, O., Kawazu, S., & Asada, M. (2019). Genome Editing of *Babesia bovis* Using the CRISPR/Cas9 System. *MSphere*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00109-19>
- Hakimi, H., Templeton, T. J., Sakaguchi, M., Yamagishi, J., Miyazaki, S., Yahata, K., Uchihashi, T., Kawazu, S. I., Kaneko, O., & Asada, M. (2020). Novel *Babesia bovis* exported proteins that modify properties of infected red blood cells. *PLoS Pathogens*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008917>
- Hakimi, H., Yamagishi, J., Kegawa, Y., Kaneko, O., Kawazu, S. I., & Asada, M. (2016). Establishment of transient and stable transfection systems for *Babesia ovata*. *Parasites and Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1439-z>
- Hortua Triana, M. A., Márquez-Nogueras, K. M., Vella, S. A., & Moreno, S. N. J. (2018). Calcium signaling and the lytic cycle of the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(11 Pt B), 1846. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.08.004>
- Hoshijima, K., Jurynek, M. J., & Grunwald, D. J. (2016). Precise genome editing by homologous recombination. *Methods in Cell Biology*, 135, 121. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2016.04.008>
- Ingram, D., & Crook, T. (2020). Rise in Babesiosis Cases, Pennsylvania, USA, 2005–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 26(8), 1703. <https://doi.org/10.3201/EID2608.191293>
- Jackson, A. P., Otto, T. D., Darby, A., Ramaprasad, A., Xia, D., Echaide, I. E., Farber, M., Gahlot, S., Gamble, J., Gupta, D., Gupta, Y., Jackson, L., Malandrin, L., Malas, T. B., Moussa, E., Nair, M., Reid, A. J., Sanders, M., Sharma, J., ... Pain, A. (2014). The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host–parasite interaction. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7113–7131. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU322>
- Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 283, 109136. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2020.109136>

- Jaijyan, D. K., Govindasamy, K., Singh, J., Bhattacharya, S., & Singh, A. P. (2020). Establishment of a stable transfection method in *Babesia microti* and identification of a novel bidirectional promoter of *Babesia microti*. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-72489-3>
- Jalovecka, M. (2017). *Establishment of Babesia laboratory model and its experimental application*.
- Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasites and Vectors*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1731-y>
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018a). The complexity of piroplasms life cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(JUL). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00248>
- Jalovecka, M., Hartmann, D., Miyamoto, Y., Eckmann, L., Hajdusek, O., O'Donoghue, A. J., & Sojka, D. (2018b). Validation of *Babesia* proteasome as a drug target. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *8*(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.08.001>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Jang, J. W., Kim, J. Y., Yoon, J., Yoon, S. Y., Cho, C. H., Han, E. T., An, S. S. A., & Lim, C. S. (2014). Flow Cytometric Enumeration of Parasitemia in Cultures of *Plasmodium falciparum* Stained with SYBR Green I and CD235A. *The Scientific World Journal*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/536723>
- Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J. L., Cremer, H., & Herman, J. P. (2007). Conditional Transgenesis Using Dimerizable Cre (DiCre). *PLoS ONE*, *2*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001355>
- Kappmeyer, L. S., Thiagarajan, M., Herndon, D. R., Ramsay, J. D., Caler, E., Djikeng, A., Gillespie, J. J., Lau, A. O., Roalson, E. H., Silva, J. C., Silva, M. G., Suarez, C. E., Ueti, M. W., Nene, V. M., Mealey, R. H., Knowles, D. P., & Brayton, K. A. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics* *2012 13:1*, *13*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-603>

- Keroack, C. D., Elsworth, B., & Duraisingh, M. T. (2019). To kill a piroplasm: genetic technologies to advance drug discovery and target identification in *Babesia*. *International Journal for Parasitology*, *49*(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2018.09.005>
- Keyloun, K. R., Reid, M. C., Choi, R., Song, Y., Fox, A. M. W., Hillesland, H. K., Zhang, Z., Vidadala, R., Merritt, E. A., Lau, A. O. T., Maly, D. J., Fan, E., Barrett, L. K., van Voorhis, W. C., & Ojo, K. K. (2014). The Gatekeeper Residue and Beyond: Homologous Calcium Dependent Protein Kinases as drug development targets for veterinarian Apicomplexa parasites. *Parasitology*, *141*(11), 1499. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000857>
- Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., & Holder, A. A. (2017). Generating conditional gene knockouts in *Plasmodium* – a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-03984-3>
- Kono, M., Prusty, D., Parkinson, J., & Gilberger, T. W. (2013). The apicomplexan inner membrane complex. *Frontiers in Bioscience*, *18*, 982.
- Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology*, *49*(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2018.11.007>
- Krause, P. J., Daily, J., Telford, S. R., Vannier, E., Lantos, P., & Spielman, A. (2007). Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. *Trends in Parasitology*, *23*(12), 605–610. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2007.09.005>
- Krause, P. J., Lepore, T., Sikand, V. K., Gadbaw, J., Burke, G., Telford, S. R., Brassard, P., Pearl, D., Azlanzadeh, J., Christianson, D., McGrath, D., & Spielman, A. (2000). Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. *The New England Journal of Medicine*, *343*(20), 1454–1458. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011163432004>
- Lack, J. B., Reichard, M. v., & van den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *International Journal for Parasitology*, *42*(4), 353–363. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2012.02.005>
- Lewis, D., & Williams, H. (1979). Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. *Nature*, *278*(5700), 170–171. <https://doi.org/10.1038/278170A0>

- Lim, C., Pereira, L., Shardul, P., Mascarenhas, A., Maki, J., Rixon, J., Shaw-Saliba, K., White, J., Silveira, M., Gomes, E., Chery, L., Rathod, P. K., & Duraisingh, M. T. (2016). Improved light microscopy counting method for accurately counting Plasmodium parasitemia and reticulocytomia. *American Journal of Hematology*, *91*(8), 852–855. <https://doi.org/10.1002/ajh.24383>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, *25*(1), 1234. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liu, M., Adjou Moumouni, P. F., Cao, S., Asada, M., Wang, G., Gao, Y., Guo, H., Li, J., Vudriko, P., Efstratiou, A., Ringo, A. E., Lee, S.-H., Hakimi, H., Masatani, T., Sunaga, F., Kawazu, S., Yamagishi, J., Jia, L., Inoue, N., & Xuan, X. (2018a). Identification and characterization of interchangeable cross-species functional promoters between Babesia gibsoni and Babesia bovis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *9*(2), 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.11.008>
- Liu, M., Adjou Moumouni, Paul Franck, Asada, M., Hakimi, H., Masatani, T., Vudriko, P., Lee, S. H., Kawazu, S. I., Yamagishi, J., & Xuan, X. (2018b). Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of Babesia gibsoni. *Parasites and Vectors*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2853-1>
- Liu, M., Ji, S., Rizk, M. A., Moumouni, P. F. A., Galon, E. M., Li, J., Li, Y., Zheng, W., Benedicto, B., Tumwebaze, M. A., Asada, M., & Xuan, X. (2020). Transient transfection of the zoonotic parasite babesia microti. *Pathogens*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020108>
- Lobo, C. A., Cursino-Santos, J. R., Singh, M., & Rodriguez, M. (2019). Babesia divergens: A Drive to Survive. *Pathogens*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8030095>
- Loureiro, A., & da Silva, G. J. (2019). CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics*, *8*(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8010018>
- McAllaster, M. R., Sinclair-Davis, A. N., Hilton, N. A., & de Graffenried, C. L. (2016). A unified approach towards Trypanosoma brucei functional genomics using Gibson assembly. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *210*(1–2), 13. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2016.08.001>
- McFadden, G. I. (2010). The apicoplast. *Protoplasma* *248*:4, *248*(4), 641–650. <https://doi.org/10.1007/S00709-010-0250-5>

- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1985). The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. *Advances in Parasitology*, 23(C), 37–103. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60285-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60285-7)
- Mévélec, M. N., Lakhri, Z., & Dimier-Poisson, I. (2020). Key Limitations and New Insights Into the *Toxoplasma gondii* Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.607198>
- Mitchell, R. D., Sonenshine, D. E., & Pérez De León, A. A. (2019). Vitellogenin Receptor as a Target for Tick Control: A Mini-Review. *Frontiers in Physiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00618>
- Moraes Barros, R. R., Thawnashom, K., Gibson, T. J., Armistead, J. S., Caleon, R. L., Kaneko, M., Kite, W. A., Mershon, J. P., Brockhurst, J. K., Engels, T., Lambert, L., Orr-Gonzalez, S., Adams, J. H., Sá, J. M., Kaneko, O., & Wellems, T. E. (2021). Activity of *Plasmodium vivax* promoter elements in *Plasmodium knowlesi*, and a centromere-containing plasmid that expresses NanoLuc throughout the parasite life cycle. *Malaria Journal*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12936-021-03773-4/TABLES/2>
- Nehlsen, K., Broll, S., & Bode, J. (2006). Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 10, 233–244.
- Nenarokova, A., Záhonová, K., Krasilnikov, M., Gahura, O., McCulloch, R., Zíková, A., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2019). Causes and Effects of Loss of Classical Nonhomologous End Joining Pathway in Parasitic Eukaryotes. *MBio*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01541-19>
- Pegram, R. G., James, A. D., Oosterwijk, G. P. M., Killorn, K. J., Lemche, J., Ghirotti, M., Tekle, Z., Chizyuka, H. G. B., Mwase, E. T., & Chizhuka, F. (1991). Studies on the economics of ticks in Zambia. *Experimental & Applied Acarology*, 12(1–2), 9–26. <https://doi.org/10.1007/BF01204396>
- Prommana, P., Uthaiyibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A. A., & Shaw, P. J. (2013). Inducible Knockdown of *Plasmodium* Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073783>
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2012.07.004>

- Silva, M. G., Knowles, D. P., Mazuz, M. L., Cooke, B. M., & Suarez, C. E. (2018). Stable transformation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* using a single transfection plasmid. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23010-4>
- Silva, M. G., Knowles, D. P., & Suarez, C. E. (2016). Identification of interchangeable cross-species function of elongation factor-1 alpha promoters in *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1859-9>
- Straimer, J., Lee, M. C. S., Lee, A. H., Zeitler, B., Williams, A. E., Pearl, J. R., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Llinás, M., Urnov, F. D., & Fidock, D. A. (2012). Site-Specific Editing of the *Plasmodium falciparum* Genome Using Engineered Zinc-Finger Nucleases. *Nature Methods*, 9(10), 993. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2143>
- Su, X. Z., Lane, K. D., Xia, L., Sá, J. M., & Wellems, T. E. (2019). *Plasmodium* Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-19>
- Suarez, C. E., Bishop, R. P., Alzan, H. F., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2017). Advances in the application of genetic manipulation methods to apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology*, 47(12), 701–710. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2017.08.002>
- Suarez, C. E., & McElwain, T. F. (2009). Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.006>
- Suarez, C. E., & McElwain, T. F. (2010). Transfection systems for *Babesia bovis*: A review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 167, Issues 2–4, pp. 205–215). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.022>
- Terkawi, M. A., Thekiso, O. M. M., Katsande, C., Latif, A. A., Mans, B. J., Matthee, O., Mkize, N., Mabogoane, N., Marais, F., Yokoyama, N., Xuan, X., & Igarashi, I. (2011). Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 182(2–4), 337–342. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.05.047>

- Thawnashom, K., Kaneko, M., Xangsayarath, P., Chaiyawong, N., Yahata, K., Asada, M., Adams, J. H., & Kaneko, O. (2019). Validation of Plasmodium vivax centromere and promoter activities using Plasmodium yoelii. *PLOS ONE*, *14*(12), e0226884. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0226884>
- Tomassone, L., Berriatua, E., de Sousa, R., Duscher, G. G., Mihalca, A. D., Silaghi, C., Sprong, H., & Zintl, A. (2018). Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. *Veterinary Parasitology*, *251*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.12.018>
- Uddin, T., McFadden, G. I., & Goodman, C. D. (2018). Validation of Putative Apicoplast-Targeting Drugs Using a Chemical Supplementation Assay in Cultured Human Malaria Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01161-17>
- Ueti, M. W., Johnson, W. C., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Mousel, M. R., Reif, K. E., Taus, N. S., Ifeonu, O. O., Silva, J. C., Suarez, C. E., & Brayton, K. A. (2020). Transcriptome dataset of Babesia bovis life stages within vertebrate and invertebrate hosts. *Data in Brief*, *33*, 106533. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2020.106533>
- Uilenberg, G. (2006). Babesia—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.01.035>
- van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P., & Haegeman, G. (2000). Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, *267*(18), 5665–5678. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01645.X>
- Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Mamoun, C. ben, & Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, *29*(2), 357. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2015.02.008>
- Wagner, J. C., Goldfless, S. J., Ganesan, S. M., Lee, M. C. S., Fidock, D. A., & Niles, J. C. (2013). An integrated strategy for efficient vector construction and multi-gene expression in Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, *12*(1), 373. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-373>
- Wei, C.-Y., Wang, X.-M., Wang, Z.-S., Wang, Z.-H., Guan, Z.-Z., Zhang, L.-H., Dou, X.-F., & Wang, H. (2020). High prevalence of Babesia microti in small mammals in Beijing. *Infectious Diseases of Poverty*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/S40249-020-00775-3>
- White, M. W., & Suvorova, E. S. (2018). Apicomplexa Cell Cycles: Something Old, Borrowed, Lost, and New. *Trends in Parasitology*, *34*(9), 759. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2018.07.006>

- Wyllie, S., Brand, S., Thomas, M., de Rycker, M., Chung, C. wa, Pena, I., Bingham, R. P., Bueren-Calabuig, J. A., Cantizani, J., Cebrian, D., Craggs, P. D., Ferguson, L., Goswami, P., Hobrath, J., Howe, J., Jeacock, L., Ko, E. J., Korczynska, J., MacLean, L., ... Wyatt, P. G. (2019). Preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis that acts through proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(19), 9318–9323. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1820175116/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Xie, S. C., Gillett, D. L., Spillman, N. J., Tsu, C., Luth, M. R., Otilie, S., Duffy, S., Gould, A. E., Hales, P., Seager, B. A., Charron, C. L., Bruzzese, F., Yang, X., Zhao, X., Huang, S. C., Hutton, C. A., Burrows, J. N., Winzeler, E. A., Avery, V. M., ... Tilley, L. (2018). Target Validation and Identification of Novel Boronate Inhibitors of the Plasmodium falciparum Proteasome. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(22), 10053–10066. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B01161/SUPPL_FILE/JM8B01161_SI_001.CSV
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *2*, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Young, K. M., Corrin, T., Wilhelm, B., Uhland, C., Greig, J., Mascarenhas, M., & Waddell, L. A. (2019). Zoonotic Babesia: A scoping review of the global evidence. *PLoS ONE*, *14*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0226781>
- Zhang, X.-L., Li, X.-W., Li, W.-J., Huang, H.-L., Huang, S.-J., & Shao, J.-W. (2019). Molecular evidence of Babesia in pet cats in mainland China. *BMC Veterinary Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-019-2214-0>
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M., & Gray, J. S. (2003). Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(4), 622–636. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.622-636.2003>

Seznam příloh

1. sekvence 5' UTR aktinu
2. sekvence 5' UTR proteinu teplotního šoku 70
3. sekvence 5' UTR chloroquiního transporteru resistance
4. sekvence 5' UTR kalmodulinu
5. sekvence 3' UTR aktinu
6. sekvence 3' UTR proteinu teplotního šoku 70
7. sekvence 3' UTR chloroquiního transporteru resistance
8. sekvence 3' UTR kalmodulinu

Vysvětlivky

a SNP

AAA start nebo stop kodon

AAAAAA CDS daného genu

AAAAAA hypotetická predikce CDS neznámých genů v UTR oblasti

Červené šipky značí promotor predikovaný pomocí software Fruitfly (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Příloha č. 1 – sekvence 5' UTR aktinu

TGTTTTAGCGTTAATGTTTCCTCTA**A**AAGCTATATACATTGCACATGTATGGCTTCAT
G**A**ATTTTCAGCATTACAAC**T**GTTATCATATCTGGTATTCACCACTTAATGTCGCACT
TTATGTGCTTTTATTTCTCTTCTCACGTTATAGCAGAGCATT**A**TAGTATC**a**tATATATTC
GTGTGCTTATCTCACCATAAGATTCAAATGCTGGTATTATTAATCC**a**CGTTAATGT**t**TA
TTGTGGCATGAGCTATGTGTTGGCCCTACTTGGCGATTGTATATAATAACAATATC
GATGCATCACATATTTTGAAGTGTTAA**C**AGTTTAT**g**TAGTAATATGCCTGATAACC
CATGATCCTTTACACTTATATTTAGCTACCGGCTGTATCAACATGAAC**T**TTTTATCAA
CCATAATGTTTATTCCTTTACCATTACCCCAGCATTATAAACGGGCT**T**AGTTATAGATT
GATGGCACGACTACTACACGAATTCCTATTTAATCTCTCACATGCGCAGATACTTTG
TACATTTATTCGTGGAATTGAGGACATATGCCATTCGCTTTTATGATGCACCGCCGC
AGATAGTACCTAACAGTGCTAACATGCAGT**C**aTGCATA**t**gTTTATC**a**gCTATGGGATA
TATGCTGCCCGTTGAGTTGCATAAAATGCGAGCAAATTA**A**AAATGAGGCCATGTC
AACAAATCAACAGATCTACAATGTAGCATGATGCTTCAAAGGCAATGCTGACAAGA
ATGTTCAAGATGGCACAAATCATAGGCTATAGATAAGCTCATTTCGGACAA**C**ATTGC
CACATCACAAGACGTGCAATCGATGAATTCATGAATGT**C**ACG**C**tTAGATTCAACAAA
GAATCTATTAGATGACAA**C**ATGTGATATCAATGACCAAATGCCAAAAC**a**AGAAAAC
C**g**ACATAACCACAAACAATA**A**aACATGTAATGGGTATGTT**a**ACATGCC**a**tGTTTGAAC
TAATTGTATACAGAAGATAC**C**CCACAAAATATATTT**T**a**t**GTTACTCGACAATAGTTA
AATTGCTTACTACACAATAACGACAGTAACCTATAAAGGATCATAATATACAGGTGC
AAATAATACACATCGCAGATAATAGTAATAAAGAGGTCACGAAT**C**tTTCATTCAAC
C**g**AGATCTTGCAGATGGATAGAATTTAATGGAAGATACACCAAC**a**ATCACATGGTC
TACACATTACGATATAATGAGACT**t**AATATGTATGTGTGAAA**a**AAATATGAAAAGAG
GTCAGCTGTAGTGGTCTAAAGGCTGTCAGCCTTGTGAGAAATTGGATCTTAAATTT
TCAAAC**T**GTGGCGTGAAATTTAACGGCTAATGTGGAAAAGGTTAGGCCTACGATA
CACATTAGGTACATAATGCGGCATTAGTAAATACACAAGATGCCATTATATCCATG
CATAAGGGCACCA**A**tATTGCCGCGATTAGAGACGGGAGCCCCACGGAATCACCC**T**T
TCAAAC**T**GTGGCCACCTGTGCATTGGAACAATCACAATAACCACTGTAA**T**CTCTCT
GATTACTCAACACCATATCAA**A**AGGCCCAATTTAA**A**ACTCATT**T**CAAGGTACGTAT
GATGATCTACTATATCTGTTTCACATCTTACCTTTCCGATCGACGTGCTGTGACAC
CAGAGTCAGCCCCTTGTTGTCGTGGGTATATTCATTTACCCGGCGCCGTT**C**ACAT
ATTTTGTATATGCACTCAATGCATGAAAGCATAAAACGTATGC**a**CCATTTTCTGTT
GTGTATACTGGTGATTCTGAGGTACTCGGTGGACCGGGCGGCCACTGAAAGAGGT
TTATGTGTCGACTGCGTCAATGTGCACATCCACTAATAAGTTAAATGCTGTTATATC
ATAATTGTTTTTGC**G**CTTATTTTGCCTCCATATCATCCACTTTTAGGATAATAACCC
TTCAA**A**AT**G**TCTGACGAAGAGGCTGTTGCGTTGGTCATTGACAACGGTTCCGGT**A**
ACGTGAAGGCCGGTGTG**C**CGGAGATGATGCTCCCCGTTGTG**T**ATTTCCCGAGCATT
GTTGGT**C**GTCCAAGAACCCAGCTCTTATGGTTGGTATGGACGAGAAGGATACCT**A**
TGTCGGT**G**ATGAAGCACAATCCAAGCGTGGTATTCTCACTCTCAAGTACCCGATT**G**
AGCACGGTATCGT**G**ACTAACTGGGAGGACATGGAGAAGATCTGGC**A**TCACACTTT
CTACAACGA**A**CTGCGTATTGCC**C**CGAGGAGCACCCCTGTTT**G**CTTACCGAGGCT

Příloha č. 2 – sekvence 5' UTR proteinu teplotního šoku 70

TGAAGGCTTGTATCATAGCTACCATCATCAAAAGTTCATCTTAAACGAATGCACATG
ATCAACTGGTGTAGATAAGCGTCCCGTCGACGACGGCCCTACCGCATCCGGCGAC
GGAAAGATCGGGGTTGCTGAAAATAGGTCAACGACAAGGCTTAACACCCTACCTC
TGTAACATAGTATCAATTATATCACATGATGTACATTCAACACGCTTGAAACGCCGA
CCAACCCAGCCGCAACCTGAGGCAAGTCATGAATGTCGCTCAAAGACATACACCT
ACCTATTTGGGGATTGTCGCAGTTGCATTGCTGAACACGATGATATCGCAGAAAAT
CGCCAAATACCTACCTCACAGGCGAGGTTGTTGTTTATCAGTGTGCCCTTGGCATA
AGACGTAAACCGGTTGACACACCCTTCTGTGTAGCCTTGCAACACAGCTGGCAC
ACACTGGCCGTACAAAAGTGTGTATCGGGCAGAGGAATGAAATAGATTGCGATA
AAACAGTAACTGCGAACAGAACTTACGTTAGCGACTTTACACATCGTCGCAAA
ACGACATCAGACGGTAGACATGACTACAGGTGGCGTAGACAACACTCTTAAACCG
CAGCACCCAATATTGTCATATCCGCATTCACAGAAAATATGCTCTCACAAAACAG
AACTACCCAAAAGTGTAAACCACATGGAGCGTTGGACACCGACATGTGTAGGGCC
AAAAGTGCACCCAAAGTCGCAAAAACAAGAGCCTCCGTAAATCGTGTAGTCCGT
AATAAGCCCTCTGTGGTTATGCTAGTGTGTTCTAATGTGTCTACTTGATGACGCTGA
TGAGTGTAATAACAAAATACAGCAAACGCTGAAACACGCAACCTATCACACAAA
CATAACACACCCGTATCTATAGGTGAAGTAAAGAAATAGAACACATGTGTAAATTATA
CCGCCGTCTCGCTTCGGTCAAATACATACTCTGCCCGTACAGCAACCCAAAGAAGT
GGGCAACGCTTATAACAAGAAGCCCGCCCATCACATAAGCAGGACAATAACACGCA
ACGGTATAAGGTTATTATTTGGCACCTTGGAATCCATCATTTTCATATTTGTCCCCTTG
TGCTAGTGTGTAATTTACCTCTTCCCACAATGGCACCAGTGGAAATCCTAGCCA
CGCAGCCGCTGGATAGCAACCATCAACCTTCTCATCCGAAAATACTCACAACCCC
TTCCTAGGAGCAGCTTCCGTGTTATACATTTGTGGAGATCACGCAACGCGTGCTAG
GCTCCTCTTAAATCGTTGTGGTGCCGACGACCTTCGTTTGACGCCAAAGTTGACGT
CTTAGGACCGAAGTTGGCGGACTATATTGGGTGGATCGTCCGCCTAAGTGATTGTT
ACGTTAATTACGAGTTGTGTTGCCGTGAGACCGCCCGAAAATGAACATGCTGGG
TAGGCTCGCATCGCTGGGCTCGTCGTCCTACCGCAACTACGTCGCACACCGGAGA
GTCGCTACCTACGGGCTCTGCGTGCTAAGGTGCATGGAGATGTAGTCGGTATTGA
CCTGGGAACTACAAACAGCTGTGTCGCTGTCATGGAAGGCTCTATGCCGAAGGTT
ATCGAAAACTCGGAGGGCATGAGAACCACCCCTCGGTCGTTGCCTTCACTGATG
ATGGCCAGAGACTGGTGGGCGTAGTTGCAAAGCGGCAGGCTGTGACTAACCCGG
AATATACCGTTTTTCGCAACAAAGCGTTTCATTGGACGCAGGTTTCGACGATGACGTC
ACAAAAAAGGAACAAAAAACACTGCCCTACAAG

Příloha č. 3 - sekvence 5' UTR chloroquinového transporteru resistance

GATCTTCTAACAACTCCTCTTCTGCGTAAGATGIGTTTTGAGTGAAATTTGCGCTAA
CCGATTTTGGATCCTTCTTGCTGTGCTTCGATAATAGCATGGAGAGTGAGAGCTGA
GATATCACGTTCTACAATATCTCCACTCATTCTGTATATGGATATCTATACAAACCTGT
AATTACAGGCGATTTGTGGCACTTTTACCTTGACACGCGTGGACGACCTATTTTC
ATGCATCATGGTGAACCACCTTCTGTTGGCAGGTTTCTCTGCCATTAAATCTGACG
ATACGGACAATACGAGTGAAGCGCAGTGTGCTGCGAGCTCATAAGATTTTCTTGTAC
AGGTTAATGCGGACATTTGTGTGCGCACTGCCTAACATGTACCCTTAGTTTTTCTTGC
GTAATATGAGGGATGATAGGCACGTTTGTATTCAGGACGTAAAATACAAGTCACA
TGCTCCGTGTATAACTCCAATACACTTCTTTGTCTATAGAATTGCTATGATAATTGCAT
AGCCACGAATTGTTCATGCCCAATAATGTTTTATGTTGGAGGCGAGGTCACATCCC
CAGTTCCACCATAGCTTAAAAATCGGGGAATGCAGCACAAATATGAAAACCTCACATG
AATAATTAAGTTTCCCATCTTTGACTTGGACATCTGCGTGTAAATACGTGTGTCTTCC
TGATTCTACTTCGAAATAGTACTTTCCCTGTCCGAGGCAATTGAGCGCCTCATGTAT
CTCTATGATTGCGTCGAACGCATCATGATCATGAAGTCCAGATATGCGATATATGGT
ACCGATACATCCACATCTGAGGGATGTGGTATTTGGAGACGTTCTTAGCGATAATA
GTTGGCGGCGACCATGCCGCAACATCTACGGCACAACAACCCGCGGTTTGGCGG
TCTATAATGAACATATTGTTCAATTAAGCGATCGGCAATTTAGATATGCCAGAATG
TGTCACGCGTCATTGCTTGC GCGTGTGTAGCGGTCCAACCTGGCGAGCGTATAACG
GTGTACCCAGAATGCAACTAGGTGCTGATATAATTGGCGTAACTTTAAATCAGGAC
TCACGCCGTGATCTATAGAACTTGCATTGTTATTATTGTAATAAATCGTATCGCGC
GTTTCCGCTCTCTGCGTTGTGCAAGGCGTAGGAAGCGTGTGTTGTTGCGTATAC
TTTACAGCTTACGCCACAAAACCAGAGCCACCTACATTCAATGGCGTCTGCGCATC
TAGTTTCGGTTCTAGCTGTGTTATATGTTTACCAGCCACATACACCTGGCAGCGTTA
ACATTCTAGAGATGGTTATTGCTACTGTTGAGGCAATGTCGCGATCACACCTTTTCT
GGCCTCCTGTAAAAGTTGACACAAATAGTTTAGTATTATACAGTTCCTGCTGTGA
GTGGACCCTAGTAATCTGTGCTCCACCATTGCGTACGTATGAGGGTCCCATTACGG
ACGCTTCGTGATGTTGTATAATTTGCTATCGGTATGGAAGGCTAATATTTTTTACATT
AAACATGCGCTATCTGAAATGATCTATGCTAATCAACTGATTGTTCAATTTGGAATC
GTTGCTTATATCGAGGTGATGATGCTAATCTGTGATGCTGTTCTCTCTGAGTGCG
GATGGC**a**TGGCGCATTCTGCCAGTACGGGTGGTAATATGCTCAAATGACAACCTT
TGTAAGACAGTGCGTTTCTGCTACTGTTACAATATTTTAAACATCATACTTATTGAA
TATGTTAATTTAGCATCCAGGTGACACTTGTCTTTTTGGTATTTCTTGCACACTTTTG
aGTGCAGGAGATCAATATCACGGTTCACTATCGTCTATTAGACTCGAGTTTACGGA
GGGTAGGATATTTGTATTCTATTGGTATATATGCGGCAAGGATATTACAACCTCCAAT
CAGGTGGAT**ATG**ATTTACCACGGTCAGGATTCGAGGATTCTTCCGTGGTGTGGGG
TCAIGATGGTACAAATGCATTGGCCTCCGATAGTTCGTCTATTTCGTGGAATTATAGG
TGAACCCCGGGATGGTAGCACAGCTGATTGGGGGCTGCCAGTAGGGCAGTTGCA
ATTGCTTCAAATATGGCACATTTCTGAGGAAGAAGCAGCTCATTATCGCATCAGT
AGTATATGTGATTATGGATGTATTTCTTACTGTGTATTACAAGATGGTGTATGGACCAC
ACGAGCAACTATACGTTGGTGACCATGGAAACCTGACAATGTTCAATTTTGT

Příloha č. 4 - sekvence 5' UTR kalmodulinu

AAGTTCCTGAGTTATTATACACAATGACACATGTACCAACATACTTGGCCAAGTGA
AACCTTTTCTCGGTAAAACGGCCAATAATACCATCTCGCTCATATGGCTCATTCTTG
AAAATCTCAATACCGCTCCCATTTTCCATCTCCTGTATACTGGCCTTGGTAACCATG
TACAGTAGGCAGCGATGAAACTCCTGAACGCGCATAAAAGACAGTATTCACAACA
AGTAGACTTACATCCATGCTAAGTGGCAGAGCTATACGGAATTCACAACCTTCAT
TGTACAGGATCATATAAAAACCTCAAGGTGGAAGAAAGCACGTCGCCCCGACCGC
GACGTGCTTCTTGCGATATCTAACAATTACAAGAGCATCCGCTCAAAAAACATAT
GAACCAATACAATCAGATTGCTAATAAACGTAGCTCTAAGAGAAGGGAGCTAAAC
ATTCCCATGCAACATCCTATGCCTACCATAGCGCGTGCAAAATCCCTACAGCAACC
ACATTGGAAATATCACTATTCACACCCAATCAAAAACACAAATTAGTCTGTAAGCG
TGGAAGACGGTTCAGTTATCACATTTTTTATCGTGATTGCCAAAAATGAAATGCTA
CACATAGTTATGGAACATAGAACTTATAGGAGTATCAACCTAGAATCTGCTATGTGA
AGCATTTATGAAATCAGATCGTTATATATTTAGGTATCTTAGAAAAGAACTCCCCTT
GTAAGCGGTGCCATTGTCGGCCATATGTGCAGCCTAGAGGAAACAACCGTCATAT
CTAATAAACCATGTCTCCCAGGTGTGTATTCCTAGATTCCTATCAACCTCGTATGT
TACGTATATCATTATAGTGGAATCTGAAGTTAATGCCTAGGAGCAACAAGAAATATG
ATAATGTTTGGCTCTACACCCAGTAAAATATACCGCCTCGAAACATGGATTGCTGCGC
GCACACAACGCAACTTTTTATTAATTGCAATATATTTCAAGCCATGCGTGTTGATTT
GTAGCCAATAGGTGAAAGCTTGAGCGAAATATAGCCAACAGCACATTCGTACAGTA
TGTAAGACACCTAATATATTCATAAAGGACTAGGGATATTACCCCGCACAGGAAA
CTGTCTATACGTGTGTATAGTAAGGGATAACTATAATACAGGGGAATGATTCAAATT
TTGGAGCTGCGCACCCGCCAATCACACAATATGGGAATGGACCGACGCGACACCT
GATACCTCTGTACGTCCACAACCTTAGATACCCGGAAGAATACGCGTGGCAGTCGA
CGTTTACTACACCTTCGACACTATCAGATCAGGTCAGGATCCGTGCGTAGTGGCAA
CACACGTGAATGTCTTTTGGTCTTACACCCTGCGGAGGCTGTATCATATGTGCTCAT
AGGTTAACATGGCAGACCAGCTGAGCGAGGAGCAGATTGCTGAGTTCAAGGAGG
CATTCTCCCTCTTCGACAGAGACGGCGATGGCAGTATGTCAGACACGACGCAATG
TCAAAATGTGCAGGCATCACGACCAAGGAACTCGGAACCGTCATGAGATCACTCG
GACAGAACCCAACAGAGGCTGAACTTGCCGATATGATCAACGAAATTGACACCAA
TGGAAGCGGTGCCATAGACTTCCCGGAGTTCCTCATACTCATGGCCAGAAAGATG
AAGGAAGGAGATACTGAAGAGGAACTGGTTCAGGCATTCAAAGTATTTGAT

Příloha č. 5 - sekvence 3' UTR aktinu

TGGTATCCACACCACAACCTTCAACTCCATTGCCCGCTGTGATCTCGACATCCGCAAGGACCTCTA
CTCAAACGTCGTGTTGTCTGGAGGTACGACGATGTACGAGGGTATCGGTCAGCGTATGACGAAGG
AGCTGAATGCCTTGGTTCACGACCATGAAGATCAAGGTTGTTGCCCTCCGGAGCGGAAGTAC
TCTGTCTGGATTGGTGGTTCGATTCTATCATCCCTTTCCACCTCCAGCAGATGTGGATCACCAAG
GAGGAGTTCGACGAATCCGGTCCCAACATTGTTACAGGAAGTGTTCTAAACAAAAAGCAATAT
CAACTACGTGTTAATTTTCCCGTATTATAGGAGTTAGATGTGTTAAATTATATAGATTTGTGTTGG
TGGTGATTGTTGATATAGCCGTTCACTAAAGGCAGCTCGGCGTTGATTATTTGTTTAGGAAGTGCC
TAATGCCGTTTGATACGAGCGGCAATAGGAAAGGGAAGACGTCGCACATGAATAATGCGAGGCC
ATGCTCCACGGAGACGACGTTTCTTGCGTAGGTCTCATCGTCCCCCATGGCTTCGAGTGATTGCTT
GAAGGATGTCCGCGCAAGGGACAGCAATTTTCATGTTGCTGAGGAACCTCCCTCCACATCCTTTAC
CGTATAGGCATGATATAGCGTTGTATGACATTCTGATGTTGCCACGGCTCTCTGAAACCCTGC
TCATGAAGCTGAGGGATGACAGCGGCTTACCACCTTGTGCATGTTATCAAGTGATCCCTTGAGA
TACAGACTGTAAAGGGATTCTGCGATTTTCGAGAGTTCGAAGCCATAGAAGGCAACCAGCCCCGG
AGTTGTAAGCCTAATGGTGAACCTCGACATTGGGGGATTTAACCAAGTAGTGGCCGTCTTCAAGCA
CTGTAACCTCGTCCTCTGCCCTCAGAGCTCCATGATGGTATCGGTAAGAGTAGCCGGTAGGTTGT
GCATCTTCTGATATGCGTGACCCACGAGCTCATTAGCGATGCAATGTCACCACTGCTCAAGTGGT
GTTCCGGCATCATGGTCATCTGATGGGCCATTAGTGATAATATGCCGAGTCCCTTTATCATGAAAG
AATCAGTTTTACGCTCCAAAGCCCTGTCGTAGAACCGTAGCTCCTTCTCGGGCACATGGCACATG
AAGGCGAGGCTGTGTCTGTAAATTGAGGAATCCTTTGTGCCAATCTCCACGCTGGAAACACGTTT
TAAGAGGTCAAACATCGTTGCTTCCCTGTTCCCTGGAGGTCTACTATGCTGTGGTCTCCATAGGAAGT
GGGTTTTAGCTTCATGGTATGGGTGAGGTTGGCCCCGAAATGACACGGCTATGGAGATTGATGT
CGTAGAACAGAGACATGGCGTTTTCGATTTTGTGGAAGAAGGGAGCGATAATATCATTCTTGACA
TTCCACTTCACTTCTGCTTGTGCTTATCAGGACAAAATAATGTCAAGTATGGGTGTCAAGCTT
GTGGATGGCATTCCGCCGATTTTGAAAAAGACCCCGTTGATGAGGTCGTATATCTTATCGGGGAC
ATTATCAGATTTTAGTCCCGCTTTAGTGACGTTAATCACCATAGACCTGCCTCCACTCACTACGAC
CTCTAAATCTCCCTTAAATGCGGGCTCCCTTACGTATCGAATCACCACTGAAAACCTCGCGTGTTAT
GTCGA

Příloha č. 6 - sekvence 3' UTR proteinu teplotního šoku 70

ACGGTATCATGAACATCAGTGCAGTAGACAAATCAACGGGCCGCAAGCAAGAAATCACCATCCA
GAGCAGTGGTGGCCTAAGCGATGAGCAGGTCGAACGTATGGTCAAGGATGCCGAGGCTTTCAA
AGGACAGACGAAGAGAGGAAACAACCTGGTGGACGCACGCAACGAAGCCGAGACGCTCTGCTACG
CCGTTGAGAAACAACCTGACCGATTTCAAGGACAAGCTATCTGATGAAGAGAAGAGGGCCTCGA
AGAGAACCTCAGCGAACTCCGTCAGAAGATGACGGAAGAGAACCTTGACGGCCTTAAGGAAACG
CACAAGAAGCTCCAAGAAGTGTATGGAAGGTATCTCAGCAAATGTACCAGAGCAACCCAAACT
CTGAGGGCAAGGAGGAATCTGAGGACGGCTCAGGATCCGAGTCTAAGAACTGATCCAACACGGC
AAACCCCGGCCAATGTAGGCTTAATATAAATACTAATCAGCTAACTAAATTAATACACGCCACAC
TCTAGAACGATAAAACATGCATGAGTTCTGCTCTCATTATAGACAGTTGGTGTGCTGCTTTTCGCA
CCTGAATTTAACCGCGCCGGCGTCTAACGGCGGACTGGCATAGCCCTGGTCATACCGCCGTTTCGT
GTTAGGGCGGCCCAATGGATGTCGACGTAATACGGCCACAGCGAAATTCTGGAACGGGACCT
AAACCGCTTACAATAGCAACCTGCATGACTTGCTTCTGCATTCGTGAGGAACTGAGCCCGGCAGCC
GCGACGTTAGAAGATTCAGAGCCTGAGGCTCGACAGGAGTTTGCCACAAAGGCAAAACCGCCCC
TAAAATGACGCGAAACGAAGTCCTCATAATACTCCACCGCCTCACGGCTGCCGTGAACCAGATTG
TCGACCTCCCGGGAGACACGTGCCACCTCGTCGTGCACTCTAGCGGACGCCTTACGTGGGCCACG
AGCCCGAACATCCGGATATAGCTCATTAGCCTCGTAGAAGTGGGACCAGTTCAGTCTGATCTTGC
TCTTAGGAGGCTTTAATAGGCCTATGCCGGTGCTTCGTAGCCTGGCATCGGAAAACCTGAGCCGT
GTTTGCGCACCCCTCTTGAGATTTGTGTAACGCATAGACGTCAGGAGTGCAGATGAATCGAGGGTC
CAAGTAGTTGGTGTCTGTTCCGTCGGAGGGCCTTCTTGAGACGCGACTCGAACAACTTATCTATGCC
ATACACGGTGCTTTCCGTGTCAACGTCGCTAAACCTACTGGAGAACAATGTGATAACATGGTTCGT
AAACCTTCAGGAAACCTTGGACTGTCTGCAACCCCGCGACAGACAACCCATCATAAAGCACAACA
CTGCCCATGCCACCAAAGTGATGGTACATACAAAGACTGCGATAAACATGCCTCACAACCTTCAG
GAGCTTTGATGCAGACTCACTTGAAGTGGAGTGAGACGTAATGCATCCCTCGGCAG

Příloha č. 7 - sekvence 3' UTR chloroquiního transporteru resistance

GTTGGCATATATCGTGATAATGATGCACGGTGCGGTGACGCTAACGTTTTTGGCTGGGGCCCTAAA
AGTTCCCTTATGTTCAATTGCATTTTCTATTCCCTTTATCAGCGGGGAGAGCGCGTCACAGTTTGAC
ATTACGGATGTATACTGTTTTCTGGGTATAATGTGTTCTCTATTTATTTATGGCATCGGCAGCAGGT
TGCTGACGTCTTCCCATAGTGCCGCTGCAGAGCCCATGCTACAAGAATTTGATAGATCTGACTGTT
CCTTGTTTCGAGAGAAGCACCCAGTCCTCCATTGAAACTCGAGCTGAATTCGATATCAGATTTAATG
CTAGTTAATTCAAAAAGCCTCTTGCAGCGGCTAGCACGGTTACCGATACATATTGGTACAGCTGCT
GTTACGTACTATAGGAGGTAGCACTAAATATTTAGTGGAGATGGAACGCTGCGTGAGTTCTTGCC
TGTTGTGTATACGTGCGACCACTTGCACGGGCATTAGGTAGCATCGTGCTACGGCCAAATACGCTC
ACCATGGCTTTCCTATGTCCCATAGTGCAACGCCACCAAATCGATTATTAAGTAGACGATTCTTA
TATGCTTATGAGTGTTATGTGGTGCCTAGTGTACAATCGCCTTCCTTAGGACGTTGTACAA
CTCCCACGCGTTACCCTGAACCACTCCGGTAAGTCGGCGCTCGACCCTTAGGAAATGTTAAATG
AAAACAGTTTGACGGTTAAGTTGTTCCAATTGTAAGAAAACCGGCTCTTCTTTGTTGCACGTCATG
GCTACGCTACGTGCTGCGTGTGTGTTTGGGTTAACGCTTCTGCTGGTTGTCAATAAACAGGTTAAC
TGTGTATCTGAGGAGGAAGATGATGATCAGTTTACGCGGCATCTCCTGCTTGCTCCATTGATGTA
AGTGTTTCATGGCTGCAGATTATTTGGGCGTTTAAGCCGCGTTGTTTGCACGGGGCTCCTTGGCTAA
CAGTGTCATATGGCTTTCACGCGTTCACATATGAGGATGAAGGTGTTGTTTCAAGTGTGATAAG
CTATTCTGATATCCAGCCCCGTGTTGTATTATTCACGGAGCTCAGCCCTTCTGTGAACATGTTTGGT
TTCATGATAGCCAAACCCTAATGGGGAAATAATATTGTTTTAGACGGAAAGAATGCTTGCTGCAC
TCAATAGCTACCGTGATTTTCATTTCGTCACCACATCTCGAATGGTAGGATGCAACGGTTTCGTTTC
GTGGATCACGATGTTTCAGGAGCAGCAAAGTACGCTCAGACGCTCGCAGGTCAGCGAACGAGGTT
AGCGTTACCAAATCCGTCTTCACTTGTTCGT

Příloha č. 8 - sekvence 3' UTR kalmodulin

ATGGCAGACCAGCTGAGCGAGGAGCAGATTGCTGAGTTCAAGGAGGCATTCTCCCTCTTCGACAG
AGACGGCGATGGCAGTATGTCAGACACGACGCAATGTCAAATGTGCAGGCATCACGACCAAGG
AACTCGGAACCGTCATGAGATCACTCGGACAGAACCCAACAGAGGCTGAACTTGCCGATATGATC
AACGAAATTGACACCAATGGAAGCGGTGCCATAGACTTCCCGGAGTTCCTCATACTCATGGCCAG
AAAGATGAAGGAAGGAGATACTGAAGAGGAACTGGTTCAGGCATTCAAAGTATTTGATAGAGAC
GGGAATGGTAAGTTGGCGTGCAGCTAAATGGTGGGAAAGGCGGTGAAACGGGTTCTGCTTCGTCT
CACTGTCTACATAGTGTCCGTGGCAATGAGATAAACAGTCGCATCAAAAATGTACAGGGTTTATC
AGTGACAAGAGCTCAGGCATGTCATGACGAATCTCGGCGAAAAGCTAACGAACGAAGAAGTCG
AGGAAATGTTACGGGAGGCCGACGTGGATGGTGACGGCAAAAATCAACTACGAAGAATTCGTCAA
ACTTATGCTCTCCAAGTGAATCAGATGCCGGTTCGAACACATTATACGAAATCAAATAGTATTTGGT
TACACAACTATCTCACCGTAGTAAATGTACCCTTAATCCTATCAACCAGCGCCAAAGGCAGACCC
CATAAATAAACACTTGGTCGGCGTTTTTCGCCGTCGCTAGGCGTGATGGTTAAGCATAAATTAAGC
CGCGTGATCAAATACACGTGGCGATGCGCTGAGCTCCCACGCATCGGCGCCTACACACCTGTACA
TTAGCTGCCTGTCTTACGGGCACACATCGCGCAAAATGGAGCCTGAACCGGCAAAAACCGAGTGT
GGGAAGTACACCCTGCTCATAGGACTTGTAAAGGTCGCGGATGAGTACCTAACTGAAGCCAACCG
AGGATGCGATCTCACCTCCATCAAGGAGAGCGTGATGCATAAGGTTTTGAACATCAACAACTATA
TCAAATCGCTATGCGACTACTATGCGCGAGAGAAACGAGAGGGTAAGCCGTATTACGCAAAGTAT
CAGCGCAACAGGGGAAAATGATGACCAGAAGACCAAGGCTACAGAGGCCAACGCGTC