

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

***Značení *Babesia divergens* kalcium-dependentní
proteinkinázy 5 (BdCDPK5) metodou knock-in***

Bakalářská práce

Tereza Žirovnická

Školitelka: RNDr. Marie Jalovecká, Ph.D.

Školitelka – specialistka: Eliana Fernanda Galindo Cubillos, Ph.D.

České Budějovice 2024

Žirovnická T., 2023: Značení *Babesia divergens* kalcium-dependentní proteinkinázy 5 (BdCDPK5) metodou knock-in. [Knock-in targeting of *Babesia divergens* Calcium-Dependent Protein Kinase 5 (BdCDPK5). Bc. Thesis, in Czech] – 97 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Babesia divergens is a tick-borne parasite that infects both bovines and humans, causing babesiosis. Despite its increasing impact, there are considerable limitations in understanding the key life cycle strategies of this parasite and the molecules orchestrating them. One of the crucial signaling molecules is the class of Calcium Dependent Protein Kinases (CDPKs), expected to be involved in regulating the *B. divergens* complex life cycle in both vertebrate and tick hosts. This thesis aims to create transgenic parasites with targeted BdCDPK5 signaling molecule using knock-in technology. In this study, we designed and successfully assembled a plasmid for knock-in targeting BdCDPK5 fused with selected reporter genes. We transfected the plasmid into *B. divergens in vitro* culture using nucleofection to generate transgenic parasites, with WR99210 used as a selective drug. The resulting transgenic line will serve for a detailed characterization of BdCDPK5 function throughout the *B. divergens* life cycle and the localization of this enzyme in the parasite cell using various microscopy techniques.

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 12. 4. 2024

.....

Tereza Žirovnická

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Marii Jalovecké, Ph.D za vedení mé bakalářské práce a konzultantce Elianě Fernando Galindo Cubillos, Ph.D. za její cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Ľubici Makušové za pomoc při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala členům laboratoře za ochotu a vstřícnost. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Apicomplexa	2
1.1.1	Vybraní zástupci	2
1.2	<i>Babesia</i> a babezióza	3
1.2.1	Životní cyklus	4
1.2.2	Unikátní strategie	6
1.2.3	<i>Babesia divergens</i>	7
1.3	Vápníková buněčná signalizace	7
1.3.1	Vápníková buněčná signalizace u kmene Apicomplexa	8
1.3.2	Kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs)	9
1.3.2.1	CDPKs u parazitů ze skupiny Apicomplexa	10
1.4	Genetické manipulace parazitů kmene Apicomplexa	14
1.4.1	Zavedení plasmidu do cílové buňky: episomální a intragenomický přístup	14
1.4.2	Příprava plasmidu pro genetické manipulace	15
1.4.3	Metody transfekce	16
1.4.4	Homologní rekombinace	17
1.4.5	Způsoby genetických manipulací na úrovni DNA	18
1.4.5.1	CRISPR/Cas9 systém	18
1.4.5.2	Systém DiCre	19
1.4.6	Způsoby genetických manipulací na úrovni RNA	20
1.4.6.1	RNA interference	20
1.4.6.2	GlmS ribozym	20
1.4.7	Způsoby genetických manipulací na úrovni proteinu	22
1.4.7.1	Destabilizační doména	22
2	Cíle práce	23

3	Materiál a metody	24
3.1	Kultivace <i>B. divergens</i>	24
3.1.1	Pasážování a udržování kultur.....	24
3.1.2	Mikroskopická analýza	24
3.2	Příprava inzertů a vektoru pro klonování	25
3.2.1	Příprava inzertů	25
3.2.2	Příprava vektoru	26
3.2.3	Elektroforéza a přečištění produktů z gelu.....	26
3.3	Sestavení kruhové molekuly plasmidu	27
3.3.1	Gibson Assembly a transformace plasmidu do kompetentních bakteriálních buněk.....	27
3.3.2	Příprava LB AMP agarových ploten	28
3.3.3	PCR z kolonií	28
3.3.4	Izolace plasmidu a sekvenace	29
3.4	Transfekce <i>B. divergens</i>	30
3.4.1	Přečištění a transfekce plasmidu do <i>B. divergens in vitro</i> kultury	30
3.4.1.1	Příprava pracovního roztoku WR99210 hydrochloridu	31
3.4.2	Izolace DNA.....	31
3.4.3	PCR a elektroforéza izolované DNA z transfekované <i>in vitro</i> kultury	31
4	Výsledky.....	33
4.1	Návrh plasmidu pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu.....	33
4.2	Strategie složení kruhové molekuly plasmidu pro pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu	35
4.3	Sestavení plasmidu pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu	37
4.4	Transfekce plasmidu do <i>in vitro</i> kultury <i>B. divergens</i>	40
5	Diskuze	42
6	Závěr.....	46
7	Literatura	47

1 Úvod

Babesie jsou prvoci, kteří patří do kmene Apicomplexa, a způsobují závažné onemocnění zvané babezióza. Babesie jsou schopné infikovat mnoho druhů živočichů, především pak savce, včetně člověka, ale i některé druhy ptáků (Homer et al., 2000; Hussein et al., 2021; Chauvin et al., 2009), a jejich přenašečem jsou klíšťata rodu *Ixodes* (Uilenberg 2006). Modelový organismus používaný v této práci - *Babesia divergens* - typicky napadá dobytek, a může být také infekční pro člověka (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008), u kterého je dnes prokázána infekce několika různými druhy babesii (Hildebrandt et al., 2023), a průběh lidské babeziózy se může vyznačovat asymptomaticky až po život ohrožující v závislosti na zdravotním stavu nakaženého (Schnittger et al., 2012).

Babesie mají velmi složitý životní cyklus, který je v rámci celého kmene Apicomplexa unikátní (Jalovecka et al., 2018a). Babesie ze skupiny *Babesia* sensu stricto mají schopnost transovariálního přenosu, což je jedna ze strategií pro efektivní přenos (Chauvin et al., 2009). V rámci složitého životního cyklu babesii, stejně jako ostatních parazitů z kmene Apicomplexa, hrají mimo jiné významnou roli enzymy zvané kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs), bez kterých by parazité nebyli schopni životní cyklus dokončit (Sharma et al., 2021). Role jednotlivých CDPKs u babesii včetně *B. divergens* nejsou v porovnání s ostatními zástupci tohoto kmene dostatečně prostudovány (Hussein et al., 2021).

Pro odhalení funkcí signálních molekul včetně CDPKs v rámci životního cyklu babesii lze využít metod genetické manipulace (Suarez et al., 2017), které umožňují funkční analýzu jednotlivých molekul a jejich zapojení ve vnitrobuněčné signalizaci. Tato práce je zaměřena na vytvoření transfekční linie *B. divergens* metodou knock-in ve formě episomálního plasmidu pro značení BbCDPK5, což je molekula, která je u *P. falciparum* zapojena ve vstupu do a výstupu z erytrocytů hostitele (Mitcheson et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2021), stejně tak u *T. gondii* může mít roli ve vstupu do a výstupu z hostitelské buňky, a obecně v pohybu parazita (Wang et al., 2015). U babesii však její funkce dosud nebyla studována.

1.1 Apicomplexa

Kmen Apicomplexa se vyvinul z fotosyntetického předka a počítá prozatím více než šest tisíc popsáných druhů (Votýpka et al., 2017). Zástupci jsou jednobuněční intracelulární parazité, kteří způsobují závažná onemocnění nejen u zvířat, ale i u milionů lidí ročně, což je zapříčiněno mimo jiné velmi rychlou replikační schopností těchto parazitů (Verhoef et al., 2021). S vysokou replikační schopností je spojena i zrychlená evoluční adaptace na změnu prostředí, a to včetně vývoje rezistence parazita na běžně používaná léčiva (Rangel et al., 2021).

I přes různorodost zástupců skupiny Apicomplexa mají společný znak nazvaný apikální komplex, soubor cytoskeletárních a sekrečních struktur. Apikální komplex slouží mimo jiné k vniknutí parazita do hostitelské buňky (Mathur et al., 2019). Zástupci skupiny mají některé části apikálního komplexu více či méně redukované, je však přítomný vždy alespoň v jedné části životního cyklu parazita (Okamoto et al., 2014). Proces invaze do červených krvinek hostitele je zprostředkovaný proteiny vylučovanými apikálním komplexem, ten je u *Babesia* výrazně redukován, a je tudíž pravděpodobné, že si tyto parazité vyvinuli alternativní molekulární mechanismy pro invazi do červených krvinek (Jalovecka et al., 2019).

Většina zástupců této skupiny je charakterizována zbytkovým, nefotosyntetickým plastidem, známý jako apikoplast, který se vyznačuje kruhovým genomem (McFadden et al., 2011). Tato čtyřmembránová buněčná organela je důsledkem sekundární endosymbiózy, a jeho funkce je odlišná od rostlinného chloroplastu (Vaishnava et al., 2006). Apikoplast se s jistotou nevyskytuje u rodu *Cryptosporidium* (McFadden, 2014), a několika druhů gregarín (Mathuret et al., 2019). Ztráta nebo poškození apikoplastu vede obvykle ke smrti parazita, čímž se stává cílem výzkumu pro léčbu onemocnění parazity skupiny Apicomplexa (McFadden et al., 2011).

1.1.1 Vybraní zástupci

Zástupci se v rámci skupiny liší ve škále svých hostitelů a způsobu infekce, invaze a replikace uvnitř buněk hostitele (Chakraborty et al., 2017). Tito parazité mají vyvinuté speciální strategie, kterými manipulují signálními drahami hostitele, a využívají je ke svému přežití (Chakraborty et al., 2017). Způsobují onemocnění zvířat a lidí po celém světě, a mezi nejvýznamnější zástupce patří *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Theileria* či méně prostupovaný rod *Babesia*. (Chakraborty et al., 2017). Infekce může probíhat

asymptomaticky, v závislosti na virulenci parazita a imunitní schopnosti hostitele, často je však infekce fatální nebo projevuje závažnými příznaky (Su et al., 2019).

Cryptosporidium je obligátní parazit gastrointestinálního traktu zvířat i člověka. Člověk bývá infikován nejčastěji konzumací fekáliemi kontaminovaných potravin či vody, který je možný díky rezistenci oocyst *Cryptosporidium* na chlór, kterým je voda čištěna. Nejčastějším druhem infikující člověka je *Cryptosporidium parvum* či *Cryptosporidium hominis* (Chalmers et al., 2019).

Toxoplasma gondii je vysoce rozšířený přenašeč toxoplazmózy, který napadá teplokrevné obratlovce včetně člověka. *T. gondii* má velmi složitý životní cyklus a širokou škálu potenciálních hostitelů. Definitivním hostitelem je kočka domácí, mezihostitelem je pták či savec. Nakažení ženy toxoplazmózou v období těhotenství může plodu způsobit vážné poškození mozku a očí (Galal et al., 2018).

Plasmodium způsobuje malárii, a postihuje kromě lidí a opic také ptáky, plazy a hlodavce. Nejčastější výskyt je v tropech a subtropích, a je přenosný komáry (Su et al., 2019). Nejsmrtelnějším druhem *Plasmodium* je *Plasmodium falciparum*, které je infekční pro člověka (Chakraborty et al., 2017). Dle Poespoprodjo et al., 2023 bylo v roce 2021 nakaženo malárií 247 milionů lidí, z nichž bylo 619 tisíc případů smrtelných.

Theileria spp. je stejně jako *Babesia* spp. obávaným krevním parazitem přenášený klíšťaty především u skotu. *Theileria* se množí nejprve v leukocytech hostitele a poté v erytrocytech, zatímco *Babesia* se množí pouze v erytrocytech. Významným zástupcem rodu *Theileria* je *Theileria annulata*, která způsobuje tropickou theileriózu. Ta je charakterizována horečkami, otoky lymfatických uzlin a může vést ke smrti slabších jedinců skotu (Kuibagarov et al., 2023).

1.2 Babesia a babezióza

Babesia je krevní parazit přenášený klíšťaty z čeledi *Ixodidae*. Má celosvětový ekonomický, veterinární a lékařský dopad. Po trypanosomách jsou *Babesia* nejčastějšími krevními parazity savců (Schnittger et al., 2012). Bylo popsáno více než 100 druhů babesií, mezi nejznámější patří *B. divergens*, *B. bovis*, *B. caballi* nebo *B. equi* (Schuster et al., 2002). Na rozdíl od *Plasmodium* spp. nemá *Babesia* synchronní vývoj v krevních buňkách a lze tedy

sledovat všechna intraerytrocytární vývojová stádia ve stejném krevním nátěru (Zintl et al., 2003).

Babesia způsobuje onemocnění zvané babezióza. Projevy onemocnění závisí na stavu imunitního systému hostitele, přítomnosti dalších možných patogenů a/nebo genetických faktorů. Akutní infekce zahrnuje horečky, anémii, malátnost, letargii, žloutenku, anorexii či hemoglobinurii (porucha krvetvorby), zatímco chronický stav je často asymptomatický (Schnittger et al., 2012). Babezióza může být zoonotické onemocnění, které se přenáší mezi zvířaty a člověkem (Schuster et al., 2002). V rámci celého rodu *Babesia* se hostitelem může stát téměř jakýkoliv obratlovec včetně domácích, divokých či hospodářských zvířat (Gohil et al., 2013). Dochází k aktivnímu přenosu na člověka klíštětem či pasivnímu přenosu z člověka na člověka transfuzí infikované krve (Schuster et al., 2002). Velmi zřídka dochází k přenosu na plod během těhotenství (Lobo et al., 2019). Lidská babezióza byla poprvé popsána v Jugoslávii v roce 1957 (Krause, 2019). Lidským patogenem bylo dosud popsáno několik druhů babesií, tři z nich se vyskytují v Evropě – *B. divergens*, *B. venatorum* (skupina *Babesia* sensu stricto) a *B. microti* (skupina *Babesia* sensu lato) (Hildebrandt et al., 2023). Babezióza je dnes diagnostikována z krevního nátěru či pomocí PCR. Léčba se skládá ze standardních kombinací antibiotik a antimalarik, nejčastěji je podáván azitromycin společně s atovaquonem, případně pak klindamycin s chininem. V případě těžkého průběhu onemocnění dochází většinou k výměnné transfuzi krve (Krause, 2019).

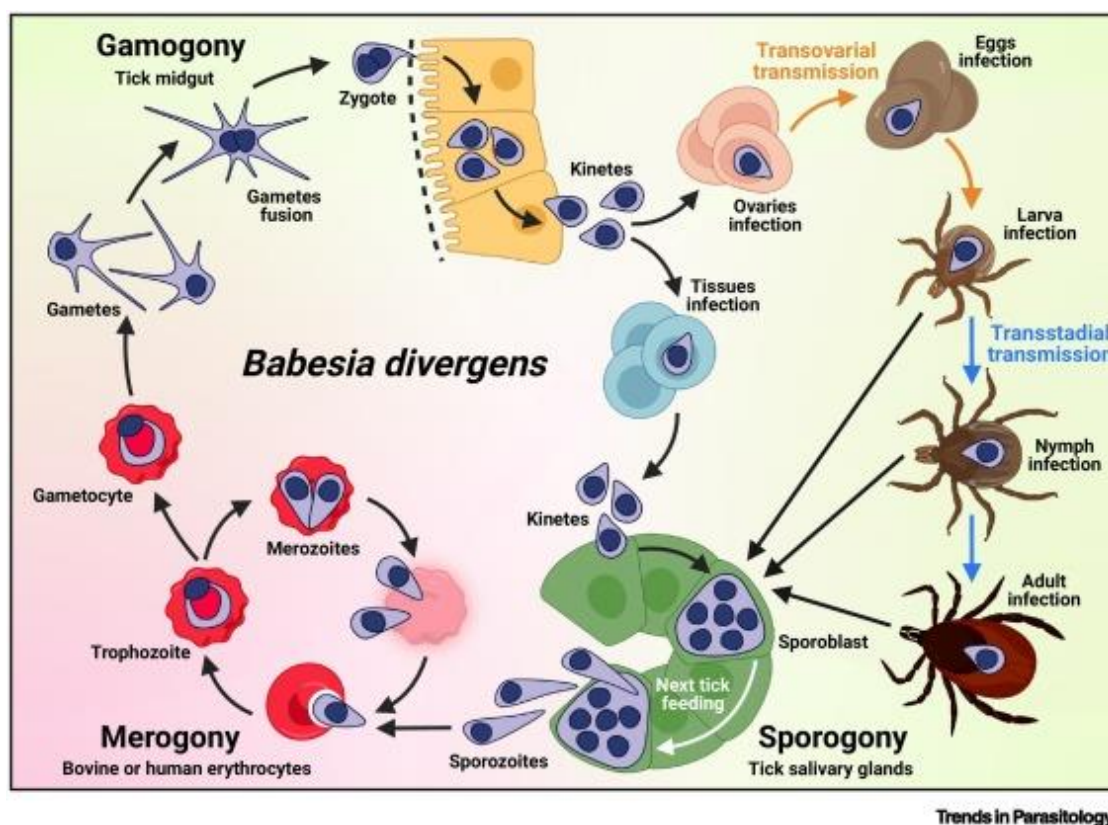
Bovinní babezióza je onemocnění skotu způsobující úmrtí skotu, potraty a sterilitu, což je spojeno s poklesem produkce masa a mléka (Schnittger et al., 2012), čímž způsobuje onemocnění globální ekonomické ztráty (Suarez et al., 2019). Mezi druhy, které nejčastěji infikují skot, patří *B. bovis*, *B. divergens* a *B. bigemina* (Gohil et al., 2013). Pro standardní léčbu boviní babeziózy slouží imidocarb dipropionát (Imizol, Schering Plough) (Zintl et al., 2003).

1.2.1 Životní cyklus

Babesia ve svém životním cyklu (Obr. 1) střídá dva hostitele, jedním je klíště a druhým je obratlovec (Lobo et al., 2019). Životní cyklus je složen ze tří fází, merogonie, gamogonie a sporogonie. Nepohlavní část cyklu – merogonie - je lokalizována v červených krvinkách mezihostitele, tedy obratlovců. Pohlavní část cyklu – gamogonie - probíhá ve střevech definitivního hostitele, klíštěti, kde poté probíhá další nepohlavní rozmnožování – sporogonie – ve slinných žlázách (Jalovecka et al., 2019).

Cyklus začíná infikováním mezipřímého hostitele infekčními sporozoity ze slin klíštěte, které ihned napadají červené krvinky (Jalovecka et al., 2019). *Babesia* oproti *Plasmodium* spp. neprochází extraerytrocytárním stádiem životního cyklu (Lobo et al., 2019). Za invazi do červených krvinek jsou zodpovědné proteiny produkované apikálním komplexem. Sporozoité se po invazi do erytrocytu mění v trofozoity, kteří se dělí procesem merogonie, binárním dělením, čímž vzniká stádium merozoita (Cursino-Santos et al., 2019; Jalovecka et al., 2019). *Babesia* uniká imunitnímu systému hostitele expresí různých variant erytrocytárních povrchových antigenů (Cursino-Santos et al., 2019; Jalovecka et al., 2019).

V další fázi životního cyklu dochází k sexuálnímu rozmnožování, gamogonii, a to vývojem některých merozoitů v stádium gametocytů (Jalovecka et al., 2016). Ostatní merozoity opouští erytrocyty a infikují další neinfikované erytrocyty v krevním řečišti (Cursino-Santos et al., 2019; Jalovecka et al., 2019). Následně dochází k nasátí červených krvinek infikovaného hostitele do lumen střeva klíštěte, které mimo jiné obsahují právě gametocyty. Gametocyty nejsou morfologicky odlišitelné od asexuálních stádií. Mechanismus řízení vzniku gametocytů není známý, ke zvýšené produkci ale dochází při zvýšené hostitelské parazitácii či při léčbě (Jalovecka et al., 2016). Gametocyty v lumen střeva klíštěte dozrávají v gamety, které jsou u babesii označovány jako Spiky-rayed nebo Strahlenkörper gamety, a výrazně se liší od gamet ostatních zástupců skupiny Apicomplexa. Gamety se následně spojují v pohyblivou zygotu zvanou ookineta procesem syngamie (fúze gamet) (Bock et al., 2004; Jalovecka et al., 2019). Ookineta prostupuje peritrofickou matrix lumen střeva, a napadá střevní buňky klíštěte. V buňkách epitelu střeva podstoupí ookineta meioické dělení a stávají se ní jednobuněčné kinety, které se šíří hemolymfou klíštěte do periferních tkání včetně vaječnicků a slinných žláz klíštěte. Infekce vaječnicků vyústí v transovariální přenos (viz kapitola 1.2.2) (Bock et al., 2004; Jalovecka et al., 2019). Poslední část cyklu zvaná sporogonie probíhá v buňkách slinných žláz klíštěte, kde se invazivní kinety vyvinou v mnohojaderný dormantní sporoblast, který během ekdyze klíštěte zůstává v buňkách, a tím babesie zajišťují svůj transstadiální přenos (viz kapitola 1.2.2) (Bock et al., 2004; Jalovecka et al., 2019). Při následném sání klíštěte je sporoblast sáním aktivován, a produkuje velké množství infekčních sporozoitů, které se uvolňují do krve obratlovce. Cílem parazita je zachování jeho existence množením a zajištěním přenosu z hostitele na hostitele (Jalovecka et al., 2019).



Obr. 1: Schéma životního cyklu babesií. Životní cyklus je složen ze tří fází, merogonie, gamogonie a sporogonie. Merogonie je lokalizována v červených krvinkách meziphostitele, tedy obratlovci. Gamogonie probíhá ve střevě definitivního hostitele, klíštěti. Následně ve slinných žlázách klíštěte probíhá sporogonie (Jalovecka et al., 2019). Převzato z (Filipe et al., 2023).

1.2.2. Unikátní strategie

Babesie si vyvinuly speciální strategie ve svém životním cyklu pro adaptaci na parazitismus (viz Obr. 1). Mají schopnost transstadiálního přenosu, který jim umožňuje přetrvávat v několika po sobě jdoucích vývojových stádiích klíštěte, a tím zajistit přežití během životního cyklu klíštěte (Lobo et al., 2019). Transstadiální přenos je zajištěn tvorbou polymorfního syncytia v slinných žlázách, tedy dormantního sporoblastu z invazních kinet. Při sání klíštěte na hostiteli dochází k aktivaci dormantního sporoblastu a dochází k asynchronnímu uvolňování sporozoitů do krve obratlovce (Jalovecka et al., 2019).

Další neobvyklou schopnost životního cyklu babesií je tzv. transovariální přenos, kterou mají pouze babesie sensu stricto, nikoliv babesie sensu lato. Jde o velmi úspěšnou

evoluční strategii, která babesiím umožňuje přenos z jednoho mateřského klíštěte na tisíce potomků. Tento přenos je zprostředkován vstupem invazivních kinet do vaječníků klíštěte, kde dochází k jejich množení a přenosu na vajíčka a následně larvy (Jalovecka et al., 2019).

1.2.3 Babesia divergens

B. divergens je obligátní parazit červených krvinek přenášený klíštětem *Ixodes ricinus*. Tento druh se vyskytuje především v Evropě a způsobuje bovinní a lidskou babeziózu (Krause, 2019). *B. divergens* je schopna se přenášet přes mateřské klíšťata na potomky transovariálním přenosem (viz kapitola 1.2.2) (Jalovecka et al., 2019). Průběh infekce *B. divergens* probíhá u člověka většinou asymptomaticky. Symptomatické případy se ale vyznačují vysokou mortalitou, a to především u pacientů s oslabeným imunitním systémem, asplenií, či u starších jedinců (Hildebrandt et al., 2021). Na území Evropy bylo popsáno přes 50 případů nákazy člověka tímto druhem babesie především ve Francii a Irsku, a mimo jiné také v dalších zemích Evropy jako je Chorvatsko, Finsko, Norsko, Portugalsko, Španělsko či Švédsko (Krause, 2019). Epidemiologické studie však upozorňují na obrovský nárůst prevalence protilátek IgG proti *B. divergens* u lidí z 2 % na téměř 40 %. Studie také naznačují, že většina těchto infekcí je nedagnostikována, což vede k potenciálnímu riziku bezpečnosti dárcovství krve (Montero et al., 2023). Příčinou nárůstu infekcí tímto parazitem může být například globální oteplování, které vede k prodloužení období, kdy jsou klíšťata včetně *I. ricinus* aktivní (Zintl et al., 2003). Dosud neexistuje komerční vakcína proti *B. divergens*, a není schváleno žádné klinicky používané léčivo proti lidské babezióze (Zintl et al., 2003).

1.3 Vápníková buněčná signalizace

Vápník ve formě vápenatých iontů hraje důležitou roli v přenosu signálu v buňce (Decampo & Moreno, 2021). Princip vápníkové signalizace spočívá v kódování, přenosu a následném dekódování signálů (Barros et al., 2017), které vedou k vyvolání buněčné odpovědi na základě změny intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Berridge et al., 2000). Signalizace je spuštěna uvolněním vápenatých iontů z intracelulárních zásob (Decampo & Moreno, 2021), především z endoplazmatického retikula (Raffaello et al., 2016), nebo přechodem iontů skrz plazmatickou membránu buňky (Decampo & Moreno, 2021), a to vše na základě vnitřní či vnější stimulace (Hüser et al., 2000).

Hladina vápenatých iontů mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky, a mezi intracelulárními organelami je regulována řízením toku iontů systémem Ca^{2+} transportérů, kanálů, pump, výměníků či vazebných proteinů (Marchi et al., 2020). Pro vylučování Ca^{2+}

z cytosolu slouží dva mechanismy. Prvním je ATP-áza, která za spotřeby ATP pumpuje ionty přes plazmatickou membránu. Druhým mechanismem je $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník, který bez spotřeby energie díky Na^+ elektrochemickému gradientu pumpuje Ca^{2+} proti jeho gradientu. Za každý vytlačený Ca^{2+} iont z buňky vstupují 3 Na^+ ionty do buňky (Bruce, 2018; Cali et al., 2018). V excitabilních buňkách jsou pro udržení hladiny Ca^{2+} v cytosolu podstatné mimo jiné napěťově řízené vápníkové kanály (Williams et al., 2008).

Všechny buňky včetně prokaryot až po eukaryota jsou vybaveny alespoň specifickými transportéry a Ca^{2+} -vazebnými proteiny (Cyert, 2001; Plattner & Verkhratsky, 2015). U prokaryot plní z velké části detoxikační funkci, u eukaryot jsou ale součástí této velmi složité signální sítě (Dominguez et al., 2015) pro lokální buněčné reakce, ale i pro systémové reakce na úrovni celého těla u mnohobuněčných organismů (Choi et al., 2016; Südhof, 2012; Tian et al., 2020). Mezi buněčné procesy u mnohobuněčných organismů, které jsou závislé na Ca^{2+} signalizaci, patří fertilizace, diferenciace buněk, proliferace, aktivace transkripce či apoptóza (Berridge et al., 2000), mimo to mají podíl na mezibuněčné koordinaci (Falcke, 2004). Vápník také přímo nebo nepřímo moduluje mnoho proteinů, mezi které patří různé kinázy, fosfatázy, transkripční faktory, a kalcium-vazebný protein kalmodulin (Bootman, 2012).

1.3.1 Vápníková buněčná signalizace u kmene Apicomplexa

Pro jednobuněčné parazity může být Ca^{2+} signalizace mechanismem pro usnadnění invaze do hostitelské buňky, či pro schopnost reagovat na změnu prostředí v hostiteli. Tyto intracelulární stádia parazitů se chovají v hostitelské buňce jako organely, což jim umožňuje soutěžit s organelami hostitelské buňky o živiny a ionty (Decampo & Moreno, 2021).

Podle nedávného výzkumu Vella et al., 2021 dochází ke zvýšení hladiny vápenatých iontů v cytosolu ve dvou fázích. První zvýšení je způsobeno uvolněním iontů z intracelulárních zásob (Vella et al., 2021). U parazitů skupiny Apicomplexa se vyskytují typické intracelulární zásobárny vápníku jako v jiných eukaryotických buňkách, tedy endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát či mitochondrie. Zároveň u těchto parazitů mohou k signalizaci přispívat další kompartmenty, mezi které patří acidokalcisomy a potravinové vakuoly v *Plasmodium* spp. a tzv. rostlině podobná vakuola u *T. gondii* (Lourido & Moreno, 2015). Druhý vzestup hladiny Ca^{2+} je způsoben vstupem iontů z extracelulárního prostoru. Obě tyto události jsou důležité pro intracelulární parazitismus včetně invaze a výstup z hostitelské buňky. Například výzkum Vella et al., 2021 prokázal, že je intracelulární parazit

schopen přijímat vápenaté ionty z cytosolu hostitele, čímž doplňuje své intracelulární zásoby, které jsou poté také využity pro výstup z hostitelské buňky (Vella et al., 2021).

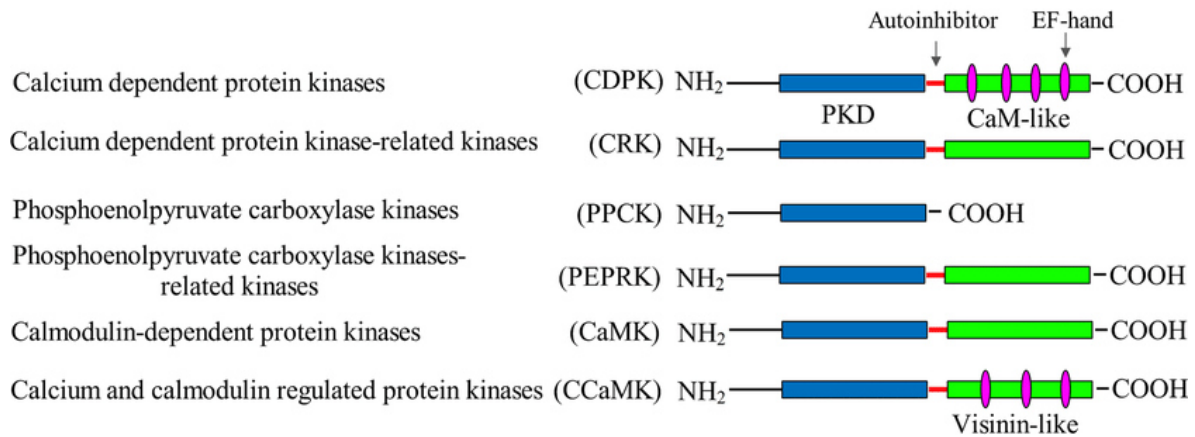
Signalizace založená na Ca^{2+} má důležitou roli při funkci apikálního komplexu, například sekreci mikronem, a také při diferenciaci do dalších vývojových stádií během životního cyklu parazita (Lourido & Moreno, 2015). Signál je přeměněn do fyziologické odpovědi efektorovými proteiny, mezi které patří proteiny vázající vápenaté ionty, zejména kalmoduliny, kalcineurin B-podobné proteiny (Calcineurin B-like proteins) a proteinkinázy závislé na vápníku (CDPKs) (Lourido & Moreno, 2015; Bisio & Soldati-Favre, 2019).

1.3.2 Kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs)

Jedním typem signálních molekul reagujících na Ca^{2+} jsou proteinkinázy závislé na vápníku (Lim et al., 2012), neboli kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs), které se vyskytují v rostlinách, u nálevníků, a v parazitech skupiny Apicomplexa, nevyskytují se ale u živočichů a hub (Wang et al., 2015)

V rostlinách tyto proteinkinázy hrají roli ve vývoji rostliny a zprostředkování přenosu signálů při působení abiotického či biotického stresu, včetně reakcí na chlad, sucho, či hladinu solí. Také mají podíl na kontrole hormonální odpovědi a metabolických drah (Miao et al., 2023). Rostliny mají široký repertoár CDPKs čítající zhruba 30 enzymů s různou funkcí (Miao et al., 2023).

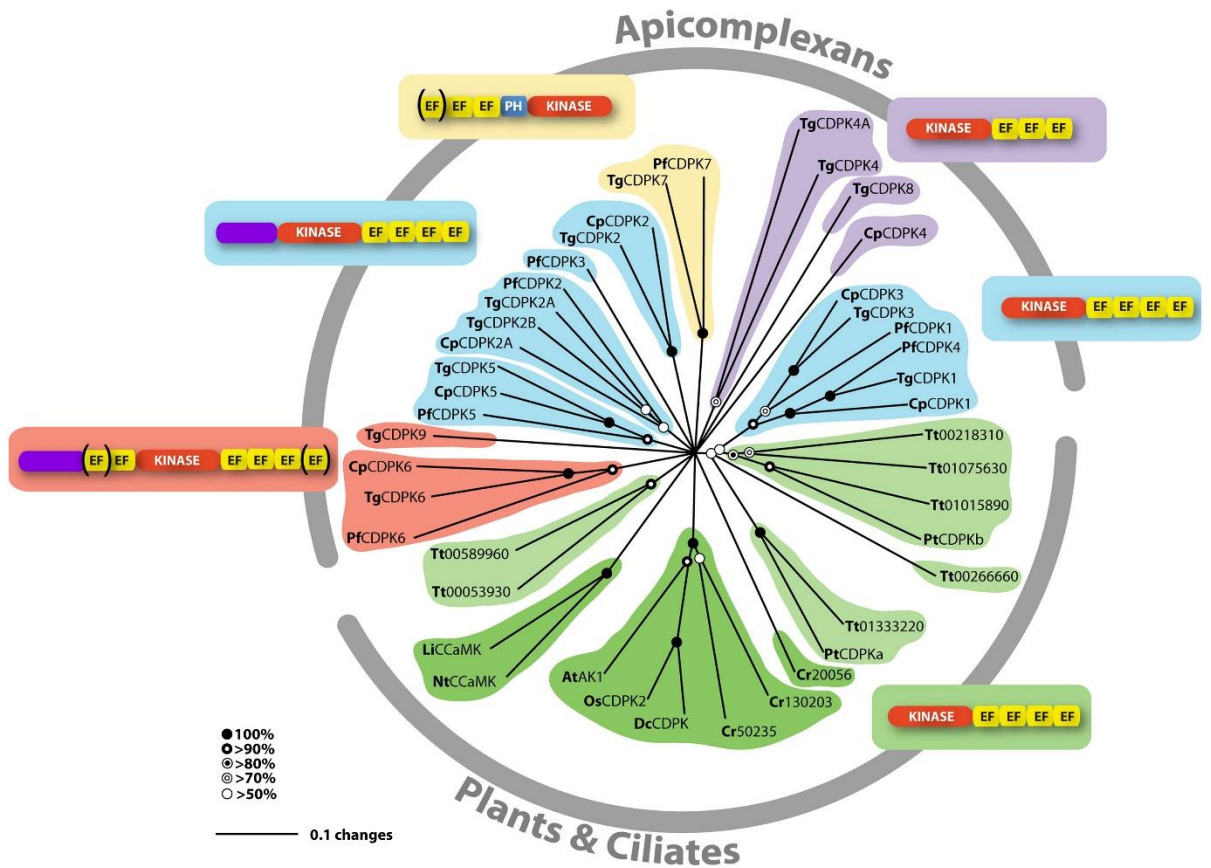
CDPKs se skládají z amino-terminální serin/threonin kinázové domény, označované jako PKD (protein kinázová katalytická doména), na N-konci, spojovací domény (známá jako autoinhibiční) a calmodulin-like terminální domény na C-konci (Obr. 2). Calmodulin-like terminální doména se skládá z jedné či více domén vázajících vápník, které se nazývají EF-hands (Moreno et al., 2011). Vazbou Ca^{2+} na EF-hands jsou tyto proteinkinázy aktivovány (Harper et al., 1994; Harmon et al., 1994), a v aktivovaném stavu následně fosforylují substráty nebo zprostředkovávají interakci s dalšími proteiny (Chen et al., 2021).



Obr. 2: CDPKs a jim příbuzné proteinkinázy. Struktura kinázy od N-konce: aminoterminální serin/threonin kinázová doména (PKD) (v diagramu černá čára a modrý obdélník), spojovací (autoinhibiční) doména (červená čára) a calmodulin-like vápník vázající doména (CaM-like) (zelený obdélník) s EF-hands (růžové ovály) (Harmon et al., 2001; Zhang et al., 2019). Převzato z Zhang et al., 2019.

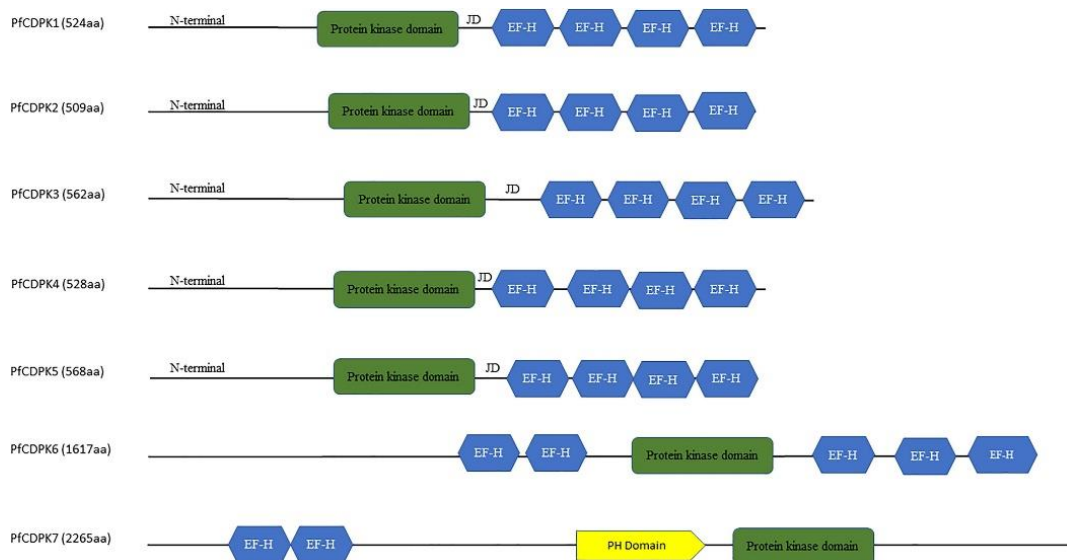
1.3.2.1 CDPKs u parazitů ze skupiny Apicomplexa

CDPKs mají významnou roli v biologických procesech parazitů kmene Apicomplexa (Billker et al., 2009). Jednotlivé CDPKs se liší svou funkcí, ale všechny obecně zprostředkovávají základní biologické funkce nezbytné pro přežití parazita (Keyloun et al., 2014). Parazité skupiny Apicomplexa se liší počtem těchto proteinkináz a jednotlivé CDPKs se poté liší svou strukturou, tedy počtem EF-hand domén či délkou PKD (Billker et al., 2009), některé CDPKs jsou však konzervované u všech zástupců celého kmene (Billker et al., 2010). Na základě struktury kinázových domén lze CDPKs fylogeneticky rozdělit do pěti hlavních tříd (Billker et al., 2009) (Obr. 3).



Obr. 3: Fylogenetická analýza založená na srovnání kalcium-dependentních proteinkináz u vyšších rostlin (zeleně), nálevníků (světle zeleně) a parazitů skupiny Apicomplexa *P. falciparum* (PfCDPK), *C. parvum* (CpCDPK), *T. gondii* (TgCDPK). Převzato z Billker et al. 2009.

Plasmodium falciparum má dosud popsáno 7 různých CDPKs (PfCDPKs), PfCDPK1 – PfCDPK5 mají typickou strukturu s PKD na N-konci a EF-hands na C-konci, PfCDPK6 a PfCDPK7 obsahuje atypickou organizaci domén a neobvykle dlouhé sekvence aminokyselin (Obr. 4) (Sharma et al., 2021).



Obr. 4: Struktura kalcium-dependentních proteinkináz *Plasmodium falciparum* (PfCDPKs). Převrato z Sharma et al., 2021.

CDPKs u *P. falciparum* mají velmi širokou škálu rolí při sexuálním vývoji v komáří samičce rodu *Anopheles*, při asexuálním vývoji, v pre-erytrocytárních stádiích i při vnitrobuněčném vývoji parazita (Sharma et al., 2021). PfCDPK1 má mnoho rolí, a pokusy o vyřazení této kinázy naznačují, že jde o esenciální gen, který je důležitý mimo jiné pro invazi do a výstup z hostitelské buňky (Kato et al., 2008). Další role PfCDPK1 spočívají v regulaci růstu intraerytrocytárního parazita (Holder et al. 2012) či vývoje schizontů (Azevedo et al., 2013). PfCDPK1 má společně s PfCDPK3 a PfCDPK4 také vliv na motilitu ookinet, přičemž funkce PfCDPK3 spočívá v regulaci sekrece adhezínů, které jsou pro motilitu nezbytné (Fang et al., 2018). PfCDPK1 má dále společně s PfCDPK2 a PfCDPK4 nezbytnou roli také pro samčí gametogenezi ve střevě komára, a PfCDPK4 je nezbytná pro vznik bičíkatých samčích gamet (Kumar et al., 2021), přičemž chemické cílení na PfCDPK1 a PfCDPK4 by mohlo zabránit přenosu parazita na komáry (Govindasamy et al., 2020). PfCDPK7 je pak pravděpodobně důležitá pro regulaci vývoje parazitů v krevních stádiích, avšak mechanismus této regulace je stále neznámý (Maurya, 2022). Bylo však zjištěno, že při narušení této proteinkinázy dochází ke snížení růstu parazita v krevních stádiích a k utlumení jejich proliferace (Kumar et al., 2013).

V pre-erytrocytárních jaterních stádiích, která se vyvíjí po invazi sporozoitů do jaterních buněk *P. falciparum*, dochází také k expresi hned několika PfCDPKs (Coppi et al., 2007; Govindasamy et al., 2016; Jebiwott et al., 2013), v této době však o jejich funkcích není

dostatek informací (Coppi et al., 2007; Govindasamy et al., 2016), je ale dokázáno, že pokud jsou PfCDPK4 a PfCDPK6 nefunkční, pak se snižuje procento sporozoitů, které invadují do hepatocytů (Coppi et al., 2007; Govindasamy et al., 2016).

T. gondii (zkratka Tg) má dosud popsáno 14 CDPKs, a většina z nich představuje ortology k výše zmíněným PfCDPKs (viz Obr. 3), což naznačuje určitou konzervovanost u téměř všech parazitů skupiny Apicomplexa. TgCDPK1 hraje klíčovou roli v regulaci exocytózy, má vliv na motilitu, invazi do a úniku z hostitelských buněk (Lourido et al., 2010). TgCDPK3 má taktéž vliv na výstup z hostitelských buněk, nikoliv však na invazi do buněk či na motilitu. Má pak na rozdíl od TgCDPK1 v úniku parazita o něco specifitější funkci (Garrison et al., 2012; Lourido et al., 2012; McCoy et al., 2012). TgCDPK7 je pak zásadní pro růst a dělení v raných stádiích parazita (Foroutan & Ghaffarifar, 2018), přesněji se zdá, že má TgCDPK7 vliv na správné umístění centrozomů během dělení (Morlon-Guyot et al., 2014).

U *C. parvum* je nyní známo 11 CDPKs, a to díky sekvenaci celého genomu (Lippuner et al., 2018). U CpCDPK1 je na základě studií potvrzena důležitá role během invaze do hostitelské buňky (Castellanos-Gonzalez et al., 2016; Kuhlenschmidt et al., 2016). Role CpCDPK3 spočívá v podílení se na intracelulárním vývoji tohoto parazita. Porovnání všech CpCDPKs však dosud není možné, protože nejsou všechny dostatečně prozkoumány (Zhang et al., 2020).

U babesii nejsou CDPKs dostatečně prostudovány, ale na základě studie Hussein et al., 2021 se předpokládá, že by CDPK4 u *B. bovis* mohla mít roli v sexuální reprodukci a v přenosu parazita (Hussein et al., 2021). Elsworth et al., 2023 ve svém výzkumu však provedl knockdown BdCDPK4, který vedl k tomu, že se *B. divergens* nadále množila uvnitř erytrocytu bez možnosti výstupu z buňky, z toho vyplývá, že je BdCDPK4 vyžadována pro výstup z hostitelské buňky. Zároveň zjistili, že BdCDPK5 a BdCDPK7 nejsou esenciální pro krevní stádia *B. divergens*, ale detailněji jejich funkci neobjasnili (Elsworth et al., 2023).

Odlišnost rolí jednotlivých CDPKs souvisí s lokalizací v buňce a expresí v různých fázích vývoje parazita. Kromě toho každá CDPKs reaguje na vápenaté ionty s různou citlivostí. Navíc za určitých podmínek se parazité adaptují na sníženou aktivitu či ztrátu některé CDPK (Sharma et al., 2021). V lidském genomu nejsou kódovány ortology CDPKs apikomplex, tudíž jsou CDPKs považovány za možný cíl pro vývoj léčiv proti této skupině parazitů (Sharma et al., 2021).

1.4 Genetické manipulace parazitů kmene Apicomplexa

Podrobný výzkum základních biologických principů parazitického životního stylu babesíí je nezbytný pro vývoj léčiv či vakcín. Efektivní nástroje funkční genomiky představují jeden z klíčových prostředků pro identifikaci cílových genů a mechanismů nezbytných pro vývoj terapeutik (González et al., 2019). Zavedení metod genetické manipulace je možné především díky stále více dostupné *in vitro* kultivaci parazitů kmene Apicomplexa, osekvenování genomu některých zástupců kmene (Suarez et al., 2017), různým metodám transfekce a pokročilých metod genových analýz (Suarez et al., 2017). Konkrétně u babesíí jsou techniky *in vitro* kultivace dostupné např. u *B. bovis*, *B. ovata*, *B. bigemina*, *B. gibsoni* (Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018b; Silva et al., 2018; Suarez & McElwain, 2010) a u našeho modelového organismu *B. divergens* (Jalovecka et al., 2016), u kterého je také osekvenován celý genom (Young et al., 2019), což umožňuje studium širokého spektra molekulárních procesů, včetně životního cyklu, regulace genů a metabolismu (Young et al., 2019). Například u různých zástupců skupiny Apicomplexa včetně babesíí vedly metody funkční genomiky a genové targetování mimo jiné k odhalení různých mechanismů buněčné invaze či egress parazita (de Konig-Ward et al., 2015; Elsworth et al., 2023). I přesto však u babesíí není aplikace pokročilých genetických manipulací dostatečná v porovnání s *Plasmodium* spp. či *T. gondii* (Hakimi et al., 2021; Su et al., 2019). Dosud zavedené metody funkční genomiky u jiných zástupců skupiny Apicomplexa mohou vést k aplikaci těchto metod i na babesie, a rozšířit tak spektrum nástrojů funkční genomiky specifických pro tyto parazity (Hakimi et al., 2021).

1.4.1 Zavedení plasmidu do cílové buňky: episomální a intragenomický přístup

Genetická modifikace vyžaduje plasmidový vektor, který je vložen do cílové buňky, a buď zůstává volně v buňce jako extrachromozomální epizom schopný replikace (episomální přístup) nebo je začleněn přímo do genomu parazita (intragenomický přístup) (Hakimi et al., 2021). Při episomálním přístupu je plasmid zaveden v kruhové molekule do cílové buňky. Mezi výhody tohoto přístupu patří to, že nedochází k narušení genomu parazita, takže nehrozí, že by exprese cílového genu byla pod kontrolou např. neznámých regulačních faktorů, zároveň se episomální plasmid v buňce může vyskytovat ve velkém množství kopií, což vede k vysoké expresi cílového genu, a také může vložení episomálního plasmidu vést k vyšší účinnosti transfekce (Lufino et al., 2008). V případě intragenomického přístupu je plasmid vpraven do buňky v linearizované či kruhové formě v závislosti na parazitovi, a do genomu je plasmid zaveden obvykle využitím homologní rekombinace (viz kapitola 1.4.4). U babesíí se pro

intragenomický přístup využívá především forma linearizovaného plasmidu (Hakimi et al., 2021). Hlavní výhodou intragenomického přístupu je kontrola nad počtem vzniklých kopií plasmidu a snadné interpretování výsledků (van Craenenbroeck et al., 2000).

Episomální plasmid se využívá pro přípravu přechodné (transientní) transfekční linie, která je vhodná pro definování optimálních podmínek pro transfekci (viz kapitola 1.4.3) a pro studium funkcí a účinnosti regulačních prvků (promotorů a terminačních signálů) (Suarez et al., 2017). První úspěšná přechodná transfekce proběhla u *T. gondii* (Soldati & Boothroyd, 1993). Metody přechodné transfekce byly následně vyvinuty také u *P. falciparum* (Goonewardene et al., 1993), *C. parvum* (Li et al., 2009), *Theileria parva* (De Goeyse et al., 2015), *Theileria annulata* (Adamson et al., 2001) a u babesíí pro *B. bigemina*, *B. bovis* (Silva et al., 2016; Suarez et al., 2006; Suarez & McElwain, 2010) a náš modelový organismus *B. divergens* (Cubillos et al., 2023). Tyto metody pak daly základ stabilním transfekčním systémům (Suarez et al., 2017).

Vytvoření stabilní transfekční linie obvykle vyžaduje vložení plasmidu do genomu parazita, tedy výše zmíněný intragenomický přístup, a byly dosud vytvořeny pro *T. gondii* (Kim et al., 1993), *P. falciparum* (Goonewardene et al., 1993; Van Dijk et al., 1995), *C. parvum*, *B. bovis* (Suarez & McElwain, 2009; Suarez & McElwain, 2010), *Babesia ovata*, *Babesia gibsoni* (Wang et al., 2021) a pro náš modelový organismus *B. divergens* (Cubillos et al., 2023; Elsworth et al., 2023).

Techniky pro vznik transfekčních systémů umožnily specifické knock-in nebo knock-out experimenty (viz dále kapitola 1.4.5 a 1.4.6) díky kterým lze studovat funkci genů (Asada et al., 2012a, Asada et al., 2012b; Suarez et al., 2015). Nadstavbou jsou pak techniky tzv. podmíněného (kondicionálního) vypínání genů, které se běžně využívají pro esenciální geny parazita a umožňují jejich funkční analýzu (viz kapitola 1.4.5.2 a 1.4.6.2) (Asada et al., 2015).

1.4.2 Příprava plasmidu pro genetické manipulace

Plasmidový vektor se obvykle skládá z reportérové kazety, kazety pro selekci (tzv. rezistenční kazeta) a backbone. Složení reportérové kazety závisí na druhu genetické manipulace. Může obsahovat např. reportérový gen pro sledování exprese GOI (gene of interest), tzv. knock-in, nebo naopak cílené vypnutí sledovaného GOI jeho nahrazením např. fluorescenčním reportérovým genem, tzv. knock-out. Fluorescenční reportérový gen obvykle slouží k rychlé detekci, zda byla kazeta parazitem úspěšně přijata, a zda je např. GOI exprimován v buňce nebo došlo k jeho úspěšné delecii (Suarez et al., 2017), a mezi nejčastěji

používané patří GFP (zelený fluorescenční protein) či mCherry (červený fluorescenční protein). Tato reportérová kazeta je pak pod kontrolou promotoru, u kterého je vhodné, aby byl specifický pro daný druh modelového organismu (Suarez et al., 2017). Jedním z nejčastěji používaných promotorů u Apicomplexa je silný konstitutivní promotor pro gen *actin* (Suarez et al., 2006, Asada et al., 2015) nebo *elongační faktor 1-alpha* (Adamson et al., 2001; Asada et al., 2012; De Goeyse et al., 2015; Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018; Suarez & McElwain, 2009), a to i u většiny druhů babesii (Liu et al., 2018b), nikoliv však u *B. divergens* (Cubillos et al., 2023).

Selekční kazeta je důležitá pro gen kódující rezistenci na selekční drogu (Asada et al., 2015). U babesii se standardně používá gen *blastocidin-S-deamináza*, kódující rezistenci na BSD (blastocidin) a gen *hdhfr* (gen lidské dihydrofolát reduktázy, hDHFR), kódující rezistenci na WR99210 (Asada et al., 2012, Suarez et al., 2009), pro ostatní zástupce kmene Apicomplexa jsou dostupné i jiné selekční drogy, například pyrimethamin u *P. falciparum* (Limenitakis et al., 2011). Tyto geny se také nazývají selekční markery, a poskytují parazitům selekční výhodu (Nehlsen et al., 2006). I selekční kazeta obsahuje silný konstitutivní promotor, obvykle již zmíněný promotor pro geny *actin* nebo *elongační faktor 1-alpha*.

Třetí částí plasmidu je backbone, která je důležitá pro selekci plasmidu a jeho následné namnožení do potřebného množství v kompetentních bakteriálních buňkách, jelikož nese gen kódující rezistenci na ampicilin (AMP) či jiné antibiotikum (Doghaither & Gull, 2019).

1.4.3 Metody transfekce

Plasmid může být vložen do cílových buněk parazita pomocí různých metod transfekce (Suarez et al., 2017), mezi které patří elektroporace, nukleofekce, mikroinjekce či využití lipozomů neboli lipofekce (Kepczynski & Róg, 2016). Elektroporace je velmi jednoduchá metoda, která spočívá v narušení buněčných membrán díky krátkým elektrickým impulsům o vysokém napětí pro vytvoření pórů kudy může vkládaná DNA projít do cytoplasmy. Nukleofekce je forma elektroporace, která dopraví nukleovou kyselinu přímo do jádra či do cytoplasmy, a zdá se být oproti elektroporaci účinnější transfekční metodou (Greiner et al., 2004; Johnson et al., 2005; Kumar et al., 2019). Mikroinjekcí je manuálně vkládán exogenní materiál do buňky, není možné ale tuto metodu využít pro velké množství buněk (Zhang et al., 2008). Lipofekce pak pro přenos nukleové kyseliny využívá kationtové lipidy (Goodwin & Huang, 2014).

Výzkum transfekčních systémů u babesii je založen na předchozích studiích u příbuzných zástupců z kmene Apicomplexa, a to především u *T. gondii* a *P. falciparum*, ne všechny tyto výzkumy ale vedly u babesii ke stejným výsledkům (Suarez & McElwain, 2010). V rámci rodu *Babesia* byly první experimenty o vytvoření přechodné (transientní) transfekční linie provedeny u *B. bovis* elektroporací za relativně nízkého napětí, proto byla později metoda vyhodnocena za nedostatečnou, a vedla k vývoji vysokonapěťové elektroporace (Suarez et al., 2006; Suarez & McElwain, 2008). Následně začala být využívána nukleofekce (Gresch et al., 2004), která se zdá být účinnější metodou oproti elektroporaci (Greiner et al., 2004; Johnson et al., 2005; Kumar et al., 2019) a je nyní nejčastěji využívanou metodou transfekce (Suarez & McElwain, 2010).

Plasmid může být nukleofekcí vložen do buňky na základě tří různých transfekčních protokolů: nukleofekcí volných merozoitů, nukleofekcí infikovaných bovinních erytrocytů (iRBCs) a nukleofekcí neinfikovaných bovinních erytrocytů (uRBCs) (Cubillos et al., 2023). Přímá transfekce infikovaných bovinních erytrocytů je velmi často používanou a ověřenou variantou transfekčního protokolu (Suarez & McElwain, 2010; Asada et al., 2012b), stejně tak je ověřena varianta s volnými merozoity (Hakimi et al., 2021b), která ale není tak běžná (Suarez & McElwain, 2008). Třetí způsob, nukleofekce neinfikovaných bovinních erytrocytů, oproti předešlým metodám vykazuje nejvyšší životaschopnost parazitů a brzkou emergenci transgenních parazitů, byla ale dosud zavedena pouze u *B. divergens* (Cubillos et al., 2023). U *B. divergens* byly úspěšně použity i první dvě zmíněné metody (Cubillos et al., 2023; Elsworth et al., 2023), ale experiment s přímou nukleofekcí iRBCs vykazoval vysokou míru lyzovaných erytrocytů a nižší životaschopnost parazitů, a při experimentu nukleofekce volných merozoitů pak došlo k emergenci transgenních parazitů po výrazně delší době oproti ostatním variantám experimentu, což si lze vysvětlit manipulací s náchylnými volnými merozoity, která vedla k jejich nižší životaschopnosti (Cubillos et al., 2023).

1.4.4 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace je proces, který buňka využívá pro opravení poškozené DNA ve formě dvouřetězcových zlomů (DSB, double-stranded break). Během homologní rekombinace dochází mezi dvěma podobnými či stejnými molekulami DNA k výměně genetické informace, a to především během meiózy či při horizontálním přenosu genů u bakterií (Hoshijima et al., 2016). Tvorba dvouřetězcových zlomů je základem pro úspěšnou genetickou manipulaci (Sander & Joung, 2014), a to nejen u babesii, ale i ostatních zástupců skupiny Apicomplexa (Suarez et al., 2017). Homologní rekombinace totiž umožňuje genové

targetování, které spočívá ve vložení genu či specifické mutace do cílového místa v genomu (intragenomický přístup). Vkládaný úsek musí mít na svých koncích identické sekvence jako gen v genomu parazita, tzv. 5' a 3' homologní úseky, které jsou následně rozpoznány parazitární buňkou a na základě homologní rekombinace inkorporovány do genomu (Hoskijima et al., 2016). Homologní rekombinace tak umožňuje knock-out, který zabrání expresi GOI, nebo knock-in, kdy je GOI označen reportérovým genem (Hoshijima et al., 2016).

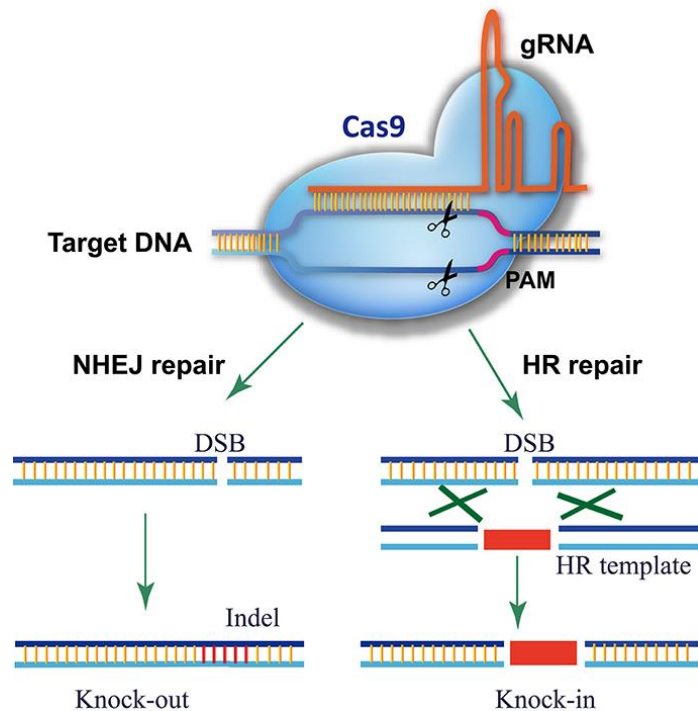
1.4.5 Způsoby genetických manipulací na úrovni DNA

1.4.5.1 CRISPR/Cas9 systém

CRISPR/Cas9 se využívá k indukci DSB v cílených místech, a v dnešní době téměř nahradil dříve používané ZFNs endonukleázy (zinc finger nukleázy) a efektorové nukleázy TALENs, které bývaly využívány pro genetické manipulace například u *P. falciparum* a *Plasmodium vivax* (Barros et al., 2015; Straimer et al., 2012). Pro navedení těchto nukleáz na cílové místo slouží vazba protein-DNA, u CRISPR/Cas9 systému vazba RNA-DNA (Loureiro & da Silva, 2019). CRISPR/Cas9 má oproti těmto nukleázám mnoho výhod včetně snadného designu a menší časové náročnosti experimentu (Loureiro & da Silva, 2019).

CRISPR/Cas9 (viz Obr. 5) systém se skládá ze dvou základních složek, endonukleázy Cas9, která je schopná štěpit DNA, a jednořetězcové vodící RNA (gRNA), která navede Cas9 na správné místo štěpení. SgRNA se váže na cílovou sekvenci díky párování bází, a Cas9 štěpí DNA za vzniku DSB (Gasiunas et al., 2012). Vytvoření DSB vede k aktivaci opravných mechanismů buňky (Ran et al., 2013), které DSB opraví pomocí homologií řízené opravy (homology-directed repair – HDR, tedy homologní rekombinace) nebo přes nehomologní spojení konců (non-homologous end-joining – NHEJ) (Vinayak et al., 2015, Calhoun et al., 2017).

U babesii se dráhy NHEJ nevyskytují, je u nich tedy pro funkční analýzu genů využíváno homologní rekombinace (Nenarokova et al., 2019). CRISPR/Cas9 je standardně používán např. u *Plasmodium* spp. či *Toxoplasma* spp., a v rámci babesii byl již zaveden pro *B. bovis* u které byl úspěšně použit např. k epitopovému značení nebo zavedení bodových mutací (Hakimi et al., 2021).

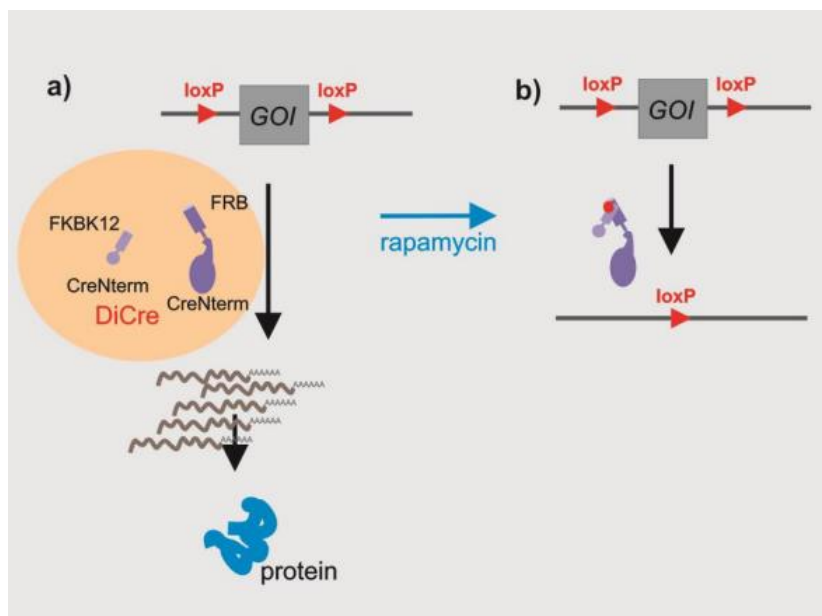


Obr. 5: Schéma CRISPR/Cas9 systému. Pro rozpoznání a štěpení Cas9 je vyžadován motiv PAM (z angl. protospacer adjacent motif) downstream od oblasti vázající gRNA. Cas9/gRNA štěpí obě vlákna cílové DNA, čímž vytváří DSB, a spouští reparační mechanismy buňky. NHEJ opravují DSB pro knock-out experiment a zavádí indel do místa DSB, která vyřadí genu z funkce. V knock-in experimentu je DSB opraven pomocí HDR díky donorovému templátu, čímž je vložena donorová DNA do místa DSB. Převzato z Razzaq & Masood, 2018.

1.4.5.2 Systém DiCre

DiCre je jednou z metod, kterou lze studovat esenciální geny, jelikož studium těchto genů vyžaduje podmíněnou genetickou modifikaci (Hakimi et al., 2021; Knuepfer et al., 2017). Princip DiCre spočívá v ohraničení GOI sekvencemi LoxP (viz Obr. 6) (Hoess et al., 1986), které rozpoznává Cre rekombináza; gen kódující obě podjednotky Cre rekombinázy musí být také vložen do genomu modifikovaného organismu. Poté dochází k dimerizaci a následné aktivaci DiCre spojením dvou podjednotek Cre rekombinázy přidáním rapamycinu, čímž dojde k rekombinaci dvou loxP míst, což má za následek odstranění ohraničeného GOI (Jullien et al., 2003; Jullien et al., 2007)

Tato metoda podmíněného genového knock-outu zatím nebyla u babesii zavedena. Je ale běžně využívána u *P. falciparum*, *P. berghei* (Collins et al., 2013; Knuepfer et al., 2017) a *T. gondii* (Andenmatten et al., 2013).



Obr. 6: Schéma DiCre systému. Princip metody DiCre je ohraničení GOI specifickými sekvencemi LoxP, která jsou rozpoznána dimerizovatelnou Cre rekombinázou. a) Nedochází k dimerizaci a aktivaci DiCre bez přítomnosti rapamycinu, dochází proto k transkripci GOI a translaci za vzniku proteinu. b) Přidáním rapamycinu dochází k dimerizaci a aktivaci DiCre, dochází k rekombinaci mezi dvěma LoxP místy, což vede k delecí GOI, takže nedochází k následné transkripci a nevzniká protein. Převzato z Briquet et al., 2022.

1.4.6 Způsoby genetických manipulací na úrovni RNA

1.4.6.1 RNA interference

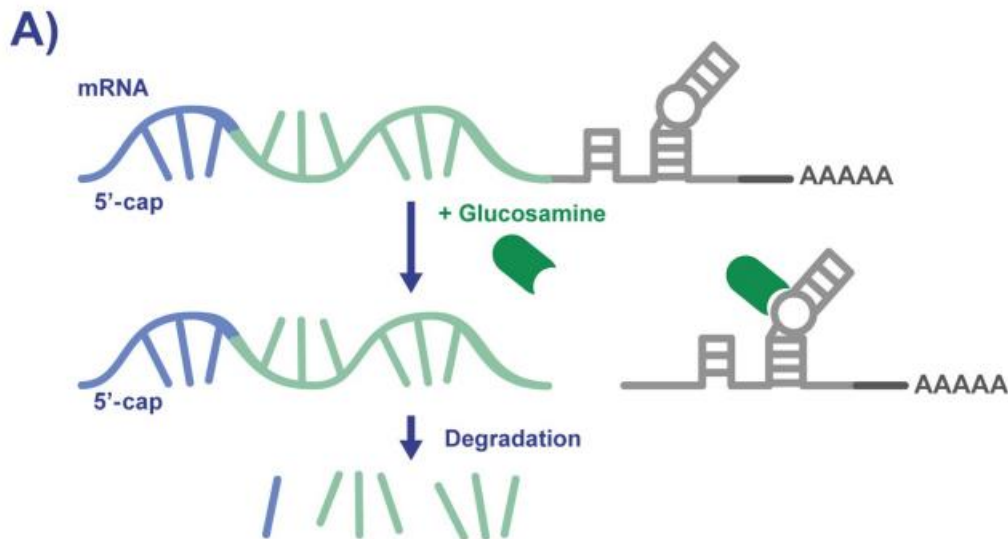
RNA interference je nástroj pro studii exprese a funkce mRNA, a výhodou této metody je, že nedochází k zásahu do genomu buňky (Mitchel et al., 2019). Geny, které umožňují využití RNA interference ke kontrole translace genů však u babesí chybí, a stejně tak u ostatních zástupců kmene Apicomplexa (Keroack et al., 2019), proto zde neuvádím princip metody. Nicméně se RNA interference dá využít ke studiu životního cyklu babesí v klíčícím vektoru, např. se díky RNA interferenci povedlo zabránit šíření *B. bovis* do ovárií u několika druhů klíšťat (Mitchell et al., 2019).

1.4.6.2 GlmS ribozym

Alternativní metodou k RNA interferenci u parazitů kmene Apicomplexa je glmS ribozym, který slouží ke kontrole exprese mRNA (Hakimi et al., 2020; Prommana et al., 2013). Ribozym glmS je katalyticky aktivní RNA (enzym), a je schopný sám sebe štěpit po přidání glukosamin-6-fosfátu (Winkler et al., 2004; Watson & Fedor, 2011). GlmS riboswitch se

nachází v 5' UTR (z angl. untranslated region) oblasti genu pro glukosamin-6-fosfát syntetázu (glmS), která katalyzuje štěpení glutaminu a fruktosa-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát (Cochrane et al. 2006). Katalytické centrum ribozymu je aktivováno po navázání ligandu, kterým je právě glukosamin-6-fosfát, čímž dochází k degradaci mRNA (Fedor & Williamson, 2005).

U *P. falciparum* byl glmS ribozym vložen mezi GOI a 3' UTR oblast, což vedlo k indukci štěpení glukosamin-6-fosfátem, a došlo k oddělení 3' UTR oblasti od transkriptu. To vedlo k degradaci mRNA jelikož molekula mRNA neměla polyA sekvenci na 3' konci (Prommana et al., 2013; Cruz-Bustos et al., 2018). Ve výzkumu Hakimi et al., 2020 a Prommana et al., 2013 studovali aktivitu glmS ribozymu nejen u *B. bovis*, ale i u *P. falciparum*, a došli k závěru, že lze díky reverzní genetice za využití glmS ribozymu studovat funkce esenciálních genů u parazitů kmene Apicomplexa. U *B. bovis* byl glmS ribozym využit k identifikaci některých proteinů, kterými parazit v červené krvince hostitele modifikuje některé její mechanické a strukturální vlastnosti (Hakimi et al., 2021). Elsworth et al., 2023 ve svém výzkumu použil glmS ribozym ke studiu proteáz a kináz důležitých pro vstup do a výstup z hostitelské buňky *B. divergens* (Elsworth et al., 2023).

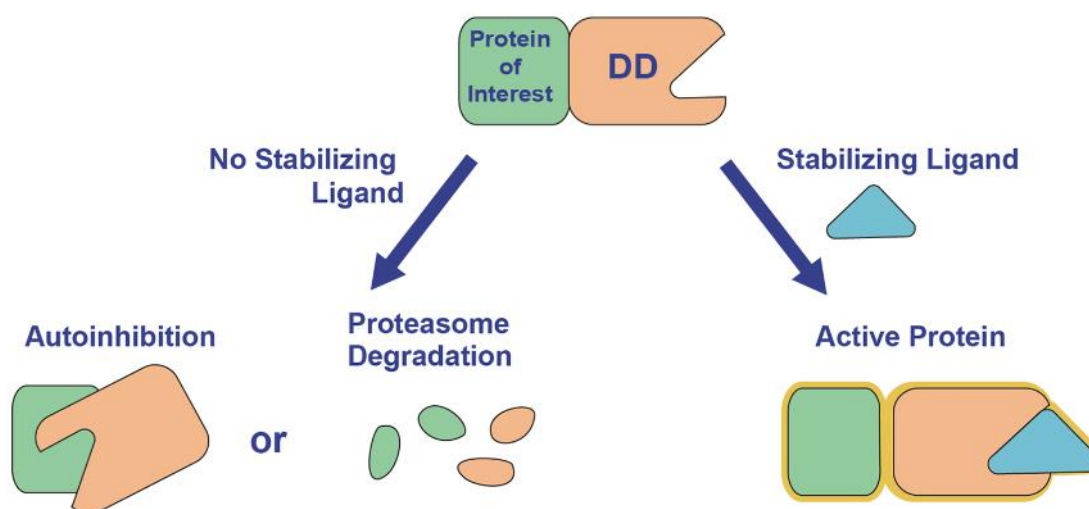


Obr. 7: Schéma podmíněného knockdown pomocí glmS ribozymu. Princip systému glmS ribozymu spočívá ve vložení ribozymové sekvence do genomu parazita, která je následována stop kodónem GOI. Transkript mRNA obsahuje glmS ribozym (v diagramu šedě), který je po přidání glukosamin-6-fosfátu aktivován a štěpí RNA, což vede k její degradaci. Převzato z Kudyba et al., 2021.

1.4.7 Způsoby genetických manipulací na úrovni proteinu

1.4.7.1 Destabilizační doména

Destabilizační doména (DD) je nástroj pro podmíněnou kontrolu POI (protein of interest, protein zájmu), a je často používán ve spojení s glmS ribozymem pro zvýšení efektivity genetické modifikace (Kudyba et al., 2021). DD je poměrně krátká, za fyziologických podmínek nestabilní, proteinová sekvence, která slouží k degradaci proteinů. Pro genetickou manipulaci je vložena sekvence kódující DD do genomu cílové buňky (Kudyba et al., 2021). Princip spočívá ve fúzi DD s POI, po které dochází k rychlé degradaci zájmového proteinu. K degradaci nedochází v případě, že je na DD navázán ligand TMT (trimethoprim) (Muralidharan et al., 2011), který tuto doménu stabilizuje (Ramadurgum & Hulleman, 2020). Experimenty založené na DD tak mohou řídit velké množství proteinů, které jsou součástí důležitých biologických procesů (Datta et al., 2019). DD již byla použita pro genetické manipulace u *P. falciparum* (Armstrong & Goldberg, 2007) a dokonce u *B. divergens* ve výzkumu Elsworth et al., 2023 ke studiu proteinů kináz a aspartových proteáz, které jsou zásadní pro invazi do a výstup z erytrocytů (Elsworth et al., 2023).



Obr. 8: Schéma funkce destabilizační domény (DD). Fúze DD a proteinu zájmu (POI) vede bez molekuly stabilizujícího ligandu k degradaci POI v proteasomu či k autoinhibici. Přidáním stabilizačního ligandu na sfúzovanou molekulu POI a DD je protein stále aktivní. Převzato z Kudyba et al., 2021.

2 Cíle práce

- Stručná literární rešerše zaměřená na kalcium-dependentní proteinkinázy a techniky genových manipulací parazitů z kmene Apicomplexa.
- Navrhnout schéma pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu na modelu parazita *B. divergens*.
- Sestavit plasmid pro vytvoření transgenní *B. divergens* se značenou BdCDPK5.
- Přčistit a transfekovat tento plasmid do *B. divergens in vitro* kultury.
- Připravit transgenní *B. divergens* parazity se značenou BdCDPK5 pomocí metody knock-in.

3 Materiál a metody

3.1 Kultivace *B. divergens*

Kultivace *B. divergens* probíhala za konstantních podmínek (37 °C, 5 % CO₂) v inkubátoru (Galaxy 170 S, Eppendorf) ve směsi kultivačního média (viz kapitola 3.1.1) a defibrinovaných bovinních erytrocytů (BioTrading). Pro všechny experimenty byl využíván kmen *B. divergens* 2210A G2 (Jalovecka et al., 2016). Bovinní erytrocyty byly před použitím zbaveny fibrinové složky a krevního séra promytím v promývacím médiu (viz Tab. I) pomocí centrifugace (Multi Centrifuge 3SR, Heraeus; 4 °C, 2000 × g, 10 min). Promyté neinfikované bovinní erytrocyty byly následně uchovávány při 4 °C v promývacím médiu (v poměru 1:2).

3.1.1 Pasážování a udržování kultur

Manipulace s kulturou *B. divergens* probíhala v laminárním boxu (Airstream® Class II, BSCO) za dodržování aseptických technik práce. Pro udržování *in vitro* kultury byla používána 24- jamková destička (Techno Plastic Products). Pasážování kultur bylo prováděno vždy jednou za dva až tři dny. Při pasážování byly do prázdné jamky napipetovány 2 ml kultivačního média (viz Tab. I). Do média bylo následně přidáno 50 µl neinfikovaných bovinních erytrocytů (kapitola 3.1) a 10 µl peletu z předchozí pasážované jamky, která obsahovala *B. divergens* infikované bovinní erytrocyty. Pokud byla parazitémie v původní jamce příliš vysoká (nad 10 %), byl způsob pasážování optimalizován přenesením menšího objemu (5 µl) infikovaných bovinních erytrocytů do nové jamky. Naopak pokud byla parazitémie příliš nízká (do 2 %), bylo pouze odsáto původní médium a vyměněno za nové.

Tab. I: Složení promývacího a kultivačního média

Chemikálie	Promývací médium	Kultivační médium
RPMI 1640 (Biosera, 25nM Hepses, Glutamine)	500 ml	400 ml
Amphotericin B (Sigma, c=250 µg/ml)	0,5 ml	0,5 ml
Gentamycin sulfát (Sigma, c=10 mg/ml)	2,5 ml	2,5 ml
Fetální bovinní sérum (Capricorn)	-	100 ml

3.1.2 Mikroskopická analýza

Před pasážováním bylo provedeno vyšetření infikovaných bovinních erytrocytů pomocí krevního roztěru pro zjištění parazitémie a kontroly případné kontaminace. 2 µl peletu byly

přeneseny na podložní sklíčko (CapitolBrand), a pomocí druhého podložního sklíčka byl vzorek rozetřen (tzv. krevní roztěr, blood smear). Po zaschnutí byl roztěr nabarven pomocí Diff Quick Staining Setu (Siemens) ponořením 10× do roztoku Diff-Quik Fix, 10× do Diff-Quik I, a ponořením na 60 sekund do Diff-Quik II. Po zafixování a nabarvení bylo podložní sklíčko opláchnuto ve vodě, jemně ostříknuto 70% ethanolem a opět opláchnuto ve vodě. Takto zpracovaný vzorek byl vyšetřen světelným mikroskopem (Olympus BX53F) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje (Olympus). Parazitémie byla vyhodnocena jako poměr infikovaných erytrocytů vůči celkovému počtu erytrocytů.

3.2 Příprava inzertů a vektoru pro klonování

3.2.1 Příprava inzertů

Inzerty A a B byly před zaklonováním naamplifikovány pomocí gradientové PCR reakce. Primery pro tuto reakci byly designovány v programu SnapGene® 7.0.2. Seznam názvů a sekvencí navržených primerů jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II: Seznam navržených primerů pro gradientovou PCR inzertů

Název	Interní značení	Sekvence	Očekávaná velikost produktu [bp]
Inzert A - f	Bab_181	GGATAATAACCCTTCAAACCTAGGAT GAAGAATGAG	2933
Inzert A - r	Bab_182	CGGTCCAGTACACAGCAATGC	
Inzert B - f	Bab_183	GCCTAAGCGGCCGCA	1959
Inzert B - r	Bab_184	CATTAAATCTGATATCGAAAAGCTTC TACGGTG	

K PCR reakci byl použit iProof™ High-Fidelity DNA polymerase kit (Biorad). Celkový objem reakce činil 50 µl: 31,5 µl PCR vody, 10 µl iProof High Fidelity bufferu (Biorad), 2,5 µl DMSO (dimethylsulfoxid, Biorad), 0,5 µl iProof polymerázy, 1 µl dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty, Biorad), 0,5 µl inzertu a 2 µl každého amplifikačního primeru z Tab. II v závislosti na inzertu. Tato reakce byla rozdělena do 5 zkumavek po 10 µl reakční směsi. Každá ze zkumavek byla vystavena v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) jiné teplotě nasedání primerů od 45 °C do 65 °C. Reakce probíhala dle hodnot v Tab. III.

Tab. III: Parametry gradientové PCR

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	30
Nasedání primerů	45-65	30 s	
Elongace	72	30 s na 1 kb ¹	
Finální elongace	72	10 min	1
Ochlazení	14		

¹ Inzert A (2976 bp) – elongace 1,5 min; inzert B (1959 bp) – elongace 1 min

3.2.2 Příprava vektoru

Vektorem, do kterého byly následně oba inzerty vkládány, byl úsek již v laboratoři zavedeného recipientního plasmidu plasmid_vektor_PL001 (viz příloha č. 1). K linearizaci vektoru a odstranění nežádoucích úseků byly použity restrikčními enzymy AvrII a HindIII (New England Biolabs, NEB). Celkový objem reakce činil 50 μ l: 39,7 μ l PCR vody (Top-Bio), 5 μ l rCutSmart Bufferu (NEB), 3,3 μ l vektoru (zásobní roztok 3300 ng/ μ l), a dále 1 μ l každého restrikčního enzymu. Reakce proběhla v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) při teplotě 37 °C přes noc pro linearizaci plasmidu. Druhý den byla reakce zastavena při 65 °C po dobu 20 minut. Následně bylo přidáno do reakce 2,5 μ l látky Quick Cip (NEB), aby nedošlo k opětovnému spojení linearizovaného plasmidu do kruhové molekuly, a inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 30 minut, a následně byla reakce zastavena při 65 °C po dobu 5 minut.

3.2.3 Elektroforéza a přečištění produktů z gelu

Pro zjištění optimální teploty nasedání primerů (viz kapitola 3.2.1) a pro potvrzení linearizace vektoru byl připraven 1% agarózový gel, který obsahoval 30 ml 1 \times TAE pufru (výroba 50 \times TAE: 242 g TRIS, 100 μ l 0,05 M EDTA, 57, 1 ml CH₃COOH, dolití do 1 l destilovanou vodou), 0,3 g agarózy (Bioline) a 0,3 μ l ethidium bromidu (Sigma-Aldrich). Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (Mupid-One, Advance) po dobu 30 minut při napětí 100 V. Gely byly následně vizualizovány pomocí UV transluminátoru (G:BOX F3, Syngene). Velikosti produktů gradientové PCR (viz kapitola 3.2.1) byly ověřeny použitím 100 bp ladderu (Thermo scientific). K ověření velikosti linearizovaného vektoru (viz kapitola

3.2.2) byl použit 1 kb ladder (Thermo scientific). Produkty o požadované velikosti byly přečištěny z gelu pomocí Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kitu (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce. Následně byla změřena jejich koncentrace (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3.3 Sestavení kruhové molekuly plasmidu

Plasmid pro vytvoření transgenní *B. divergens* se značenou BdCDPK5 metodou knock-in byl navržen v programu SnapGene® 7.0.2., kde bylo rovněž ověřeno jeho postupné složení pomocí tzv. *in silico* klonování. Návrh plasmidu je popsán ve výsledcích této práce (viz kapitola 4.1). Inzert A a B byly nasyntetizovány od Thermo Fisher Scientific (Invitrogen GeneArt Strings DNA Fragments), které byly vytvořeny s přesahujícími sekvencemi (overhangy) pro vkládání do vektoru. Vektorem byla část již zavedeného plasmidu v laboratoři (viz kapitola 3.2.2).

3.3.1 Gibson Assembly a transformace plasmidu do kompetentních bakteriálních buněk

Spojení linearizovaného vektoru s inzerty A a B bylo provedeno pomocí reakce Gibson Assembly, která umožňuje spojení několika fragmentů za použití NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning kitu (NEB). Na základě změřené koncentrace a velikosti vektoru a inzertů bylo vypočteno množství jednotlivých složek reakce v NEBioCalculator® v poměru 1:1:1 (vektor:inzert A:inzert B) (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

Celkový objem reakce činil 10 µl: 5 µl NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mater Mixu (NEB), 2 µl linearizovaného vektoru a 1,5 µl každého inzertu. Reakce byla inkubována v termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) po dobu 120 minut při 50 °C. Poté byla polovina této reakce (5 µl) smíchána s 50 µl kompetentních bakteriálních buněk NEB® 5- alpha Competent *E. coli* (NEB). Vzorek byl inkubován 30 minut na ledu a poté proběhl tzv. heatshock vystavením buněk teplotě 42 °C po dobu 60 sekund v heatblocku (Digital Dry Bath, Labnet). Následně byl vzorek ochlazen na ledu po dobu 2 minut, a poté bylo ke vzorku přidáno 300 µl růstového S.O.C. Outgrowth média (Super Optimal Broth, NEB) pokojové teploty. Tento vzorek byl následně třepán (Gallenkamp IOI400.XX2.C) při teplotě 37 °C 1 hodinu při 200rpm, a následně byl rozetřen na předehřátou LB (Luria Broth) AMP (ampicilin) plotnu (viz kapitola 3.3.2), a kultivován v inkubátoru (Froilabo) přes noc při teplotě 37 °C dnem vzhůru.

3.3.2 Příprava LB AMP agarových ploten

Byly připraveny LB agarové plotny, které sloužily k růstu transformovaných kompetentních buněk. Do skleněné nádoby bylo naváženo 2 g triptonu (Sigma-Aldrich), 1 g kvasnicového extraktu (Amresco), 2 g NaCl (Lach-Ner) a 3 g agaru (Amresco). Nádoba byla doplněna destilovanou vodou na objem 200 ml, a umístěna do autoklávu (MLS 3751, PHCbi) po dobu 90 minut a poté chlazena ve vodní lázni (SWB15D, STUART) v 52 °C. Po dosažení stejné teploty jako vodní lázeň bylo do LB média přidáno 200 µl AMP (zásobní roztok 50 mg/ml). V biohazard boxu (SafeFAST Classic) bylo médium za sterilních podmínek nalito do deseti plastových Petriho misek (Thermo Scientific). Po zatuhnutí LB média byly misky přiklopeny víčkem a uchovány dnem vzhůru při 4 °C.

3.3.3 PCR z kolonií

Následující den byla provedena PCR z 25 kolonií z LB AMP plotny. Každá náhodně vybraná kolonie byla rozsuspendována v 5 µl PCR vody. Celkový objem PCR reakce byl 10 µl: 5 µl OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with GC Buffer (NEB), 3,4 µl PCR vody, 1 µl rozsuspendované kolonie a 0,3 µl od každého primeru pro jednotlivé reakce dle Tab. IV, které měly potvrdit přítomnost klíčových úseků z obou vkládaných inzertů. Reakce byla vložena do termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf), který byl nastavený na hodnoty dle Tab. V. PCR z kolonie byla vyhodnocena pomocí elektroforézového gelu a vizualizován v UV transluminátoru (viz kapitola 3.2.3). Pozitivní kolonie dle PCR byly tzv. překřížkovány na novou předehřátou LB AMP plotnu, která byla kultivována v inkubátoru (Froilabo) přes noc při teplotě 37 °C dnem vzhůru.

Tab. IV: Seznam primerů pro PCR z kolonií

	Název	Interní značení	Sekvence	T _m [°C]	Očekávaná velikost produktu [bp]
1.	bdiv_035940c_f	Bab_14	TCTTCCAATCAGAGATACGT CTGCG	60	1960
	bdiv_035940c_r	Bab_15	TTACACCATCTCTGTCCAGA TCAACC		
2.	hDHFR_F	Bab_99	ATGGTTGGTTCGCTAAACT GCAT	60	633
	hDHFR_R	Bab_100	CTACGGTGAGATAGTGTATG TGCCAAATAC		

Tab. V: Parametry nastavení PCR z kolonií

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	30 s	1
Denaturace	94	30 s	30
Nasedání primerů	60	60 s	
Elongace	68	1 min per 1 kb ¹	
Finální elongace	68	5 min	1
Ochlazení	10		

¹ (viz Tab. IV) 1. PCR (1960 bp) – elongace 2 min; 2. PCR (633 bp) – elongace 1 min

Následně byla přítomnost plasmidu v namnožených kompetentních buňkách ověřena pomocí elektroforézového gelu a vizualizace UV transluminátorem (viz kapitola 3.2.3) za použití 100 bp ladderu (Thermo scientific).

3.3.4 Izolace plasmidu a sekvenace

Pro namnožení plasmidu v kompetentních NEB® 5- alpha Competent *E. coli* buňkách bylo připraveno tekuté LB médium. Do skleněné nádoby bylo naváženo 10 g triptonu (Sigma-Aldrich), 5 g kvasnicového extraktu (Amresco) a 10 g NaCl (Lach-Ner) a doplněna destilovanou vodou na objem 1 l. Do 5 ml tekutého LB média bylo přidáno 5 µl AMP a vybraná pozitivně testovaná kolonie (Obr. 15), která byla do média přenesena pipetovou špičkou z plotny s křížky. Takto připravené miniprepy byly přes noc třepány v třepačce (Gallenkamp) při teplotě 37 °C na 200rpm s mírně povoleným víčkem pro snadný přístup vzduchu, který je nutný pro množení kompetentních buněk.

Plasmid byl následující den z buněk vyizolován pomocí NucleoSpin® Plasmid kitu (Macherey-Nagel) dle návodu od výrobce, a byla změřena jeho koncentrace (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Plasmid byl odeslán na sekvenování (Eurofins). Výsledky sekvenace byly analyzovány v programu Geneious Prime 2023.2.1.

Pozitivní kolonie ověřená sekvenací byla namnožena v objemu 200 ml tekutého LB média s 200 µl AMP, a tento vzorek byl třepán za stejných podmínek (viz výše) přes noc. Plasmid byl následující den izolován pomocí NucleoBond® Xtra Midi kitu (Macherey-Nagel) dle návodu od výrobce a změřena jeho koncentrace (NanoDrop 1000 Spectrophotometer,

Thermo Scientific). Takto vyizolovaný plasmid byl použit k přečištění a následné transfekci (viz kapitola 3.4.1) do *in vitro* kultury *B. divergens*.

K 700 μ l namnožených kompetentních NEB® 5- alpha Competent *E. coli* buněk se sekvenačně ověřeným plasmidem bylo přidáno 300 μ l 20% glycerolu. Vzorek byl zvortexován (Vortex IKA MS 3 basic, IKA) a uskladněn v kryozkumavce při -80 °C.

3.4 Transfekce *B. divergens*

3.4.1 Přečištění a transfekce plasmidu do *B. divergens* in vitro kultury

Vyizolovaný plasmid (viz kapitola 3.3.4) bylo nutno přečistit před transfekcí do *in vitro* kultury *B. divergens* (viz kapitola 3.1.1). 40 μ g plasmidu (20 μ l) bylo přečištěno přidáním 10 μ l 3M sodium acetátu (pH=5) a 70 μ l 100% ethanolu, který byl předem nachlazen při teplotě -20 °C. Vzorek byl vložen na 2 hodiny do -20 °C. Poté byl centrifugován (Centrifuge 5424, Eppendorf) na 21 130 \times g po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byl promyt 70% ethanolem a opět centrifugován na 21 130 \times g po dobu 10 minut, následně byl zbaven supernatantu a nechán vyschnout pro zbavení se zbytkového ethanolu. Suchý pelet byl následně rozsuspendován ve 20 μ l PCR vody.

Rozsuspendovaný pelet byl smíchán se 100 μ l Nucleofector Bufferu Amaxa™ Basic Parasite Nucleofector™ 2 kit (Lonza), který byl připraven smícháním 82 μ l Nucleofector Solution a 18 μ l Nucleofector Supplement. K této směsi bylo přidáno 100 neinfikovaných bovinních erytrocytů které byly dvakrát promyty centrifugací (Centrifuge 5424, Eppendorf) při pokojové teplotě a rychlosti 800 \times g po dobu 3 minut v 1 \times PBS (Phosphate Buffered Saline). Složení 1 \times PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0,2 g KCl, doplněno do 1 l destilovanou vodou. Směs Nucleofector Bufferu s přečištěným plasmidem a s promytými neinfikovanými erytrocyty byla opatrně promíchána a přenesena do elektroporační kyvety.

Transfekce proběhla pomocí nukleofekce v Nucleofectoru (Nucleofector™ 2b, Lonza) při programu V-024. Transfekované erytrocyty byly poté ihned přidány do 2 ml předehřátého kultivačního média (viz Tab. I) s 50 μ l infikovaných erytrocytů s 10-15% parazitemií. Transfekovaná kultura byla inkubována (Galaxy 170 S, Eppendorf) při konstantních podmínkách (37 °C, 5 % CO₂). Po 6 hodinách bylo vyměněno kultivační médium. Po 24 hodinách od transfekce bylo znovu vyměněno kultivační médium a bylo přidáno 15 μ l 4 μ M WR99210 (viz kapitola 3.4.1.1). Následně bylo každý den vyměněno předehřáté kultivační

médium a přidáno 15 μ l 4 μ M WR99210. Kultura byla každý den kontrolována pomocí krevního roztěru (viz kapitola 3.1.1). Ve chvíli, kdy parazité nebyli v krevním roztěru nadále detekováni (cca 7 dní po transfekci) bylo měněno médium a WR99210 třikrát týdně. Jednou za týden bylo přidáno 50 μ l čerstvých neinfikovaných bovinních erytrocytů. Poté, co se parazité v transfekované kultuře objevili, byla přítomnost plasmidu v parazitech ověřena pomocí PCR z izolované DNA (viz kapitola 3.4.2).

3.4.1.1 Příprava pracovního roztoku WR99210 hydrochloridu

Ze zásobního roztoku selekční drogy WR99210 hydrochloridu, laskavě poskytnutý Jacobus Pharmaceutical, o koncentraci 1 mM byl připraven 250 \times ředěný pracovní roztok o koncentraci 4 μ M přidáním 4 μ l látky zásobního roztoku do 996 μ l miliQ H₂O. Zásobní roztok byl rozalíkvtován po 200 μ l. Používaný roztok byl uchováván při 4 °C, zbylé aliquoty byly uskladněny při -20 °C. Do transfekované kultury bylo vždy přidáváno 15 μ l pracovního 4 μ M roztoku WR99210, finální koncentrace v jamce tedy činila 30 nM.

3.4.2 Izolace DNA

DNA pro ověření přítomnosti transfekovaného plasmidu v parazitech byla izolována z 50 μ l peletu infikovaných bovinních erytrocytů (Centrifuge 5424, Eppendorf; 2000 \times g, 4 °C, 3 minuty) z transfekované kultury *B. divergens*, ke kterému bylo přidáno 150 μ l 1 \times PBS. Izolace DNA byla provedena pomocí NucleoSpin® Tissue izolačního kitu (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce, a následně byla ověřena pomocí amplifikačních primerů z Tab. VI.

3.4.3 PCR a elektroforéza izolované DNA z transfekované in vitro kultury

Celkový objem PCR reakce byl 10 μ l: 5 μ l FastStart PCR Master mixu (Roche), 2 μ l PCR vody, 1 μ l izolované DNA, 1 μ l od každého primeru pro jednotlivé reakce dle Tab. VI, které měly potvrdit přítomnost plasmidu v transfekovaných parazitárních buňkách. Reakce byla vložena do termocycleru (Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf) nastavený na hodnoty v Tab. VII. PCR bylo vyhodnoceno pomocí elektroforézového gelu a následně vizualizováno pomocí UV transluminátoru (viz kapitola 3.2.3)

Tab. VI: Primery pro PCR z izolované DNA

	Název	Vnitřní značení	Sekvence	T _m [°C]	Očekávaná velikost produktu [bp]
1.	hDHFR_F	Bab_99	ATGGTTGGTTCGCTAAACT GCAT	60	534
	hDHFR_r	Bab_195	GTAATAATGCCTTTCTCC TCCTGG		
2.	GFP_1	Bab_44	GCCTGACAATCACTATCTT TC		2057
	hDHFR_r	Bab_195	GTAATAATGCCTTTCTCC TCCTGG		
3.	GFP_2	Bab_46	CATCACCTTCTCCTTCACC AGAAAC		2007
	Bdiv_035940c f	Bab_96	GTGGAAGTATATCGCTGCT A		
4.	Bdiv_035940c r	Bab_97	TTCCGGTTATCATGGTTAT ACA		2397
	M13_r	M13_r	GGAAACAGCTATGACCAT G		
5.	hDHFR_F	Bab_99	ATGGTTGGTTCGCTAAACT GCAT		2182
	M13 f	M13 f	GTAAAACGACGGCCAGT		

Tab. VII: Parametry nastavení PCR

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	4 min	1
Denaturace	95	30 s	30
Nasedání primerů	60	30 s	
Elongace	72	1 min na 1 kb ¹	
Finální elongace	72	7 min	1
Ochlazení	12		

¹ (viz Tab. VII) 1. PCR (534) – elongace 1 min; 2. PCR (2057 bp) – elongace 2:30 min; 3. PCR (2007) – elongace 2:30 min; 4. PCR (2397 bp) – elongace 2:30 min; 5. PCR (2182) – elongace 2:30 min

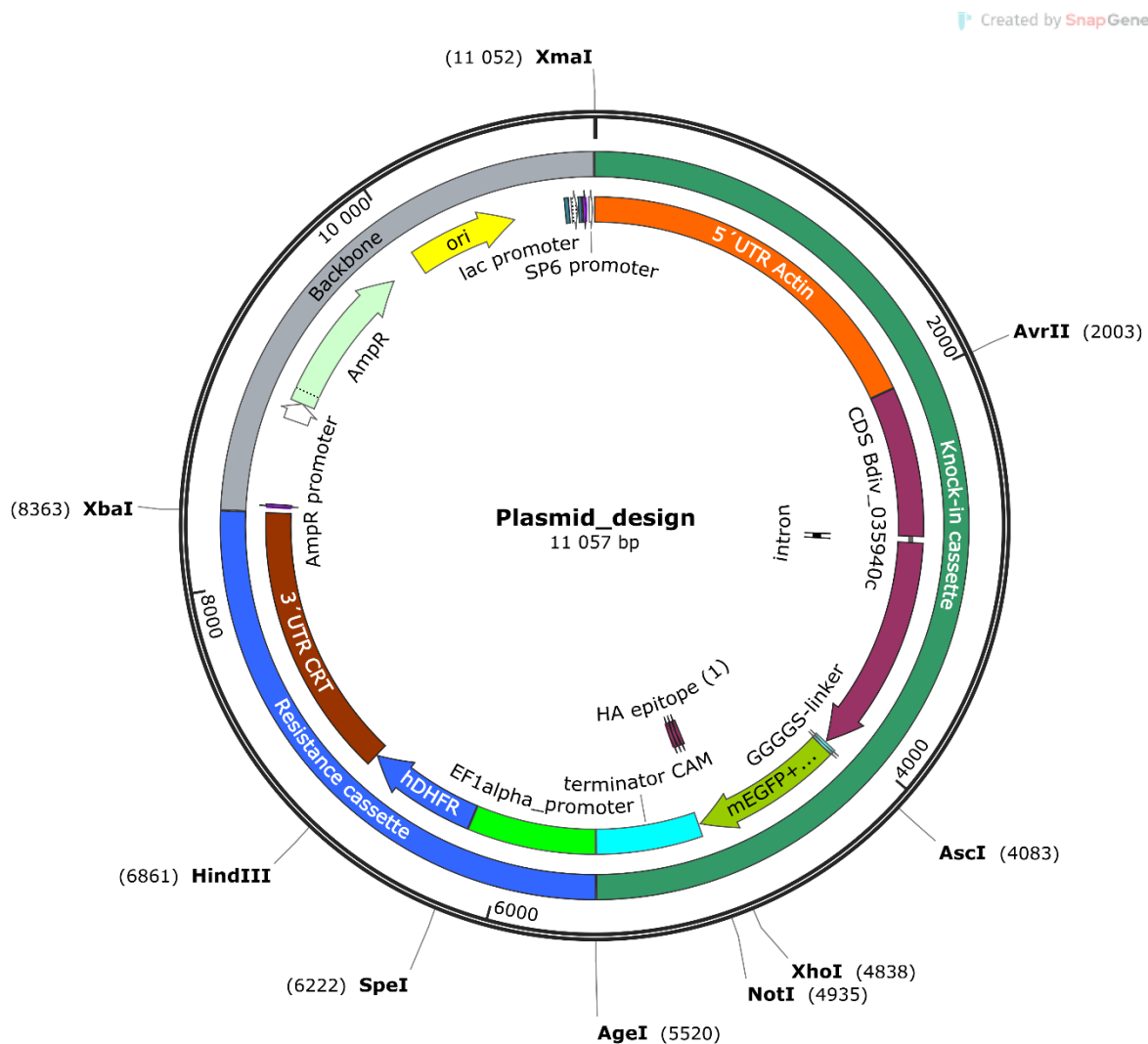
4 Výsledky

4.1 Návrh plasmidu pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu

Byla navržena kruhová molekula episomálního plasmidu pro knock-in značení cílového proteinu o celkové velikosti 11057 bp. Tento návrh se skládal z knock-in kazety, kazety pro rezistenci a tzv. backbone (viz Obr. 9). Design knock-in kazety zahrnoval promotor pro gen *actin* (5' UTR Actin, Bdiv_007890, 2002 bp), který osekvenovala v laboratoři Bc. Šárka Borsodi (viz BP- Borsodi, Š. Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*, 2021), a jeho aktivita v transgenním systému *B. divergens* byla ověřena Cubillos et al., 2023. Promotor pro gen *actin* řídí expresi kódující sekvence genu *bcdcpk5* (BdCDPK5, CDS Bdiv_035940c, 2073 bp), která byla již dříve zanalyzována a osekvenována Bc. Terezou Křečkovou (viz BP- Křečková, T. Pilotní analýza kalcium-dependentních proteinkináz prvoka *Babesia divergens*, 2022), a odpovídá sekvenci gDNA BdCDPK5 námi používaného kmenu *B. divergens* 2210A G2. Sekvence *bcdcpk5*, ze které byl odstraněn stop kodon TAA, je v návrhu propojená běžně používaným GGGGS-linkerem na mEGFP (z angl. monomeric enhanced GFP), který svou fluorescencí specificky označí exprimovaný protein BdCDPK5, a umožňuje tedy sledovat lokalizaci a dynamiku tohoto proteinu v buňce. K sekvenci pro gen *gfp* byla navíc ještě přidána třikrát opakovaná sekvence bakteriálního epitopu hemaglutininu 3×HA, která umožní detekci BdCDPK5 proteinu pomocí specifických anti-HA protilátek různými imunofluorescenčními metodami či elektronovou mikroskopií. Knock-in kazeta byla zakončena stop kodonem TAA, po kterém následoval úsek 3' UTR genu *calmodulin* (terminátor CAM, Bdiv_005010c, 578 bp), který také osekvenovala Bc. Šárka Borsodi (viz BP- Borsodi, Š. Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*, 2021).

Návrh kazety pro rezistenci, která umožní selekci parazitů obsahující plasmid, obsahovala promotor genu *ef-tgtp* (Elongation Factor Tu GTP binding domain family protein, Bdiv_030590, 696 bp), který je standardně používán v naší laboratoři (Cubillos et al., 2023). 5' UTR *ef-tgtp* řídí gen pro selekční marker *hdhfr*, který kóduje rezistenci pro drogu WR99210, na kterou byla ověřena citlivost *B. divergens* v laboratoři Mgr. Dominikou Reichensdörferovou (viz DP- Reichensdörferová, D. Development of DiCre parental lineage of *Babesia divergens*, 2022) a Cubillos et al., 2023. Kazeta byla zakončena 3' UTR genu pro *chloroquiní transporter resistance* (Bdiv_036760, 1496 bp), který také osekvenovala Bc. Šárka Borsodi (viz BP- Borsodi, Š. Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*, 2021).

Jako backbone byla vybrána část již dříve v laboratoři vytvořeného plasmidu, která obsahuje gen kódující resistenci na AMP, a tedy umožňuje selekci plasmidu a jeho následné namnožení do potřebného množství v kompetentních bakteriálních buňkách. Finální návrh kruhové molekuly plasmidu je zobrazen na Obr. 9 včetně restrikčních míst, která mohou sloužit k výměně různých úseků plasmidu.

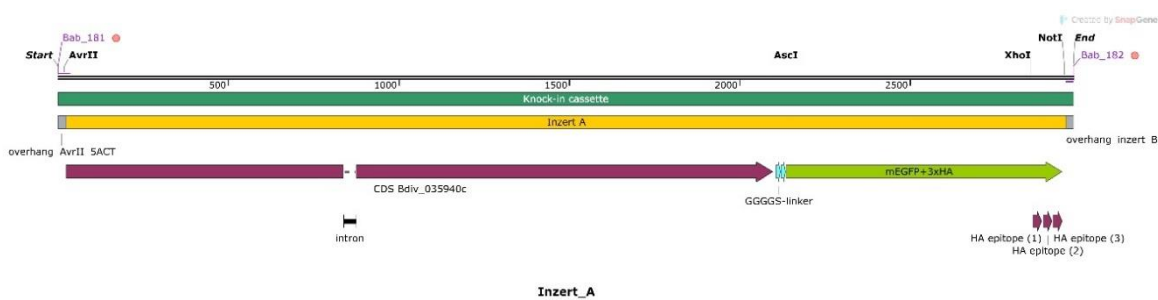


Obr. 9: Finální návrh plasmidu s restrikčními místy. Plasmid obsahuje knock-in kazetu (na diagramu tmavě zelená část kruhu), kazetu pro rezistenci (modrá část kruhu) a backbone (šedivá část kruhu). Velikost plasmidu: 11 057 bp.

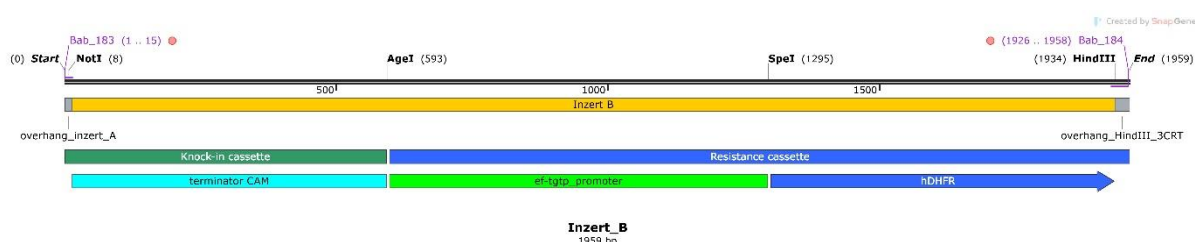
4.2 Strategie složení kruhové molekuly plasmidu pro pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu

Jako vektor pro spojení s inzerty do kruhové molekuly byla vybrána část plasmidu, který je rutinně používán v laboratoři (viz příloha č. 1), a již obsahovala 5' UTR Actin, 3' UTR CRT a backbone s genem kódující rezistenci pro AMP.

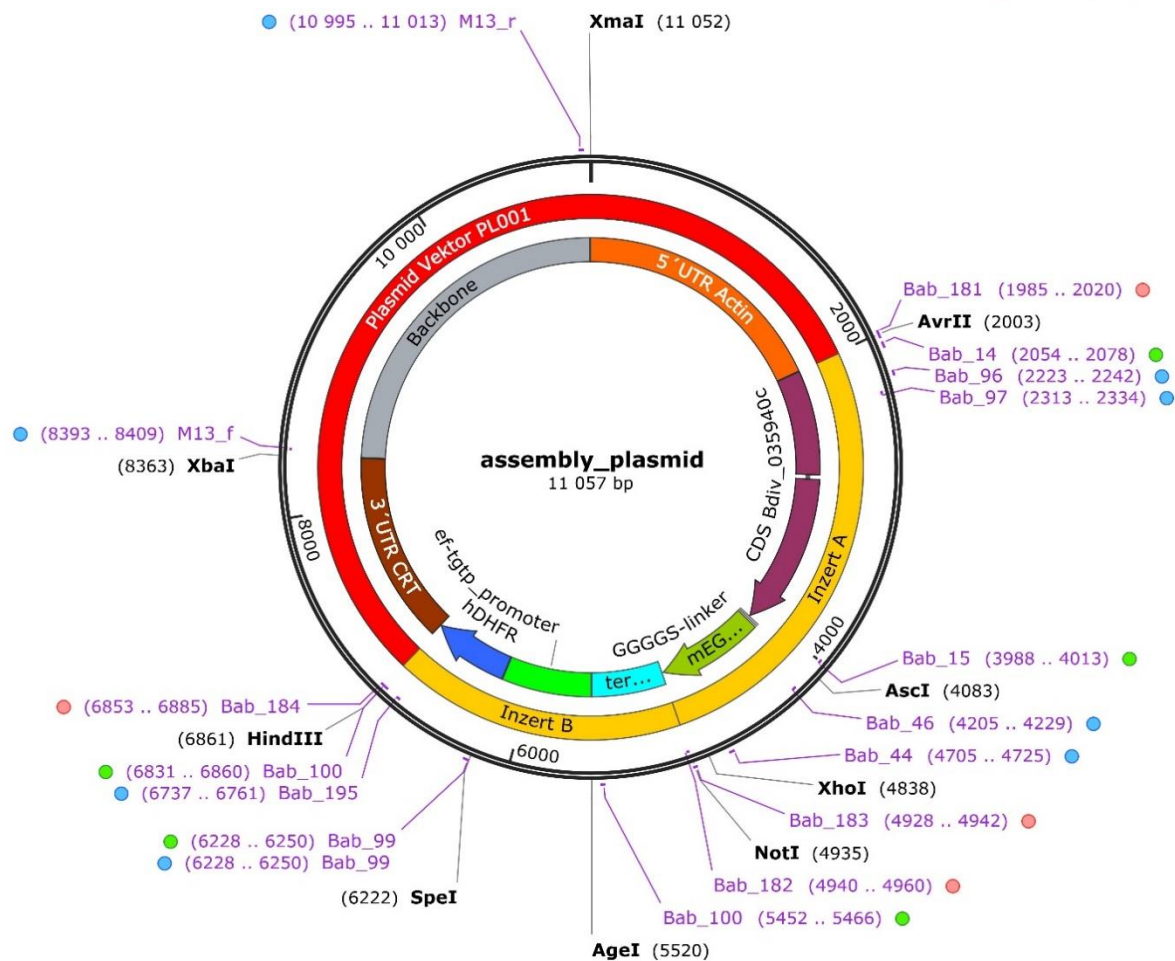
Pro syntézu zbylých úseků knock-in a rezistenční kazety byla zvolena komerční syntéza – Invitrogen GeneArt Strings DNA Fragments. Z důvodu velikosti byla tedy tato část plasmidu rozdělena do dvou kratších úseků, inzertu A (2976 bp) a inzertu B (1959 bp). Oba tyto inzerty byly nasyntetizovány včetně ~20bp přesahů, které slouží pro spojení vektoru s inzerty do požadované kruhové molekuly plasmidu. Inzert A obsahoval kódující sekvenci BdCDPK5 spojenou přes GGGGS-linker s mEGFP a 3×HA tag (viz Obr. 10). Inzert B obsahoval CAM terminátor, promotor genu *ef-tgtp*, a selekční marker hDHFR (viz Obr. 11). Návrh přípravy plasmidu a jeho složení metodou Gibson assembly do cirkulární formy bylo úspěšně ověřeno pomocí *in silico* klonování v programu SnapGene® 7.0.2 (viz Obr. 12), kompletní *in silico* design plasmidu včetně sekvence je zobrazen v příloze č. 2, označen jako plasmid PL031_plasmid_design_and_assembly.



Obr. 10: Schéma inzertu A. Inzert A obsahuje: kódující sekvenci BdCDPK5 (na diagramu fialový úsek), GGGGS-linker (tyrkysový úsek), mEGFP (světle zelený úsek) a 3×HA tagy (3 fialové úseky). Velikost inzertu A s overhangy: 2976 bp.



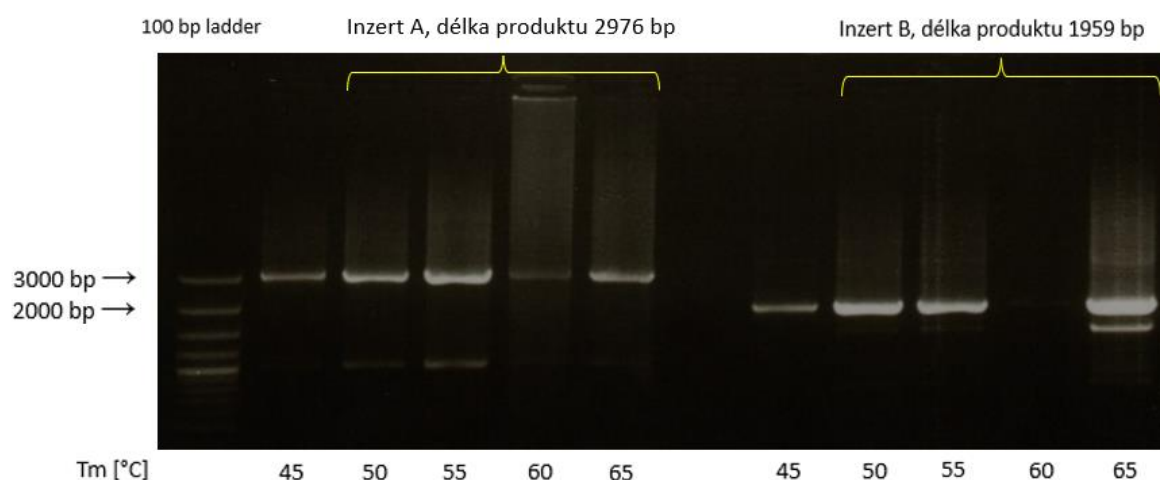
Obr. 11: Schéma inzertu B. Inzert B obsahuje: CAM terminátor (tyrkysový úsek), promotor genu *ef-tgtp* (světle zelený úsek) a selekční marker hDHFR (na diagramu modrý úsek). Velikost inzertu B s overhangy: 1959 bp.



Obr. 12: Strategie složení kruhové molekuly plasmidu. Plasmid je složen z: inzert A a B (žluté úseky), a vektoru (červený úsek). Na mapě jsou zobrazeny primery pro spojení inzertů s vektorem (červeně, viz Tab. II), primery pro PCR z kolonie (zeleně, viz Tab. IV) a pro ověření přítomnosti plasmidu v transfekovaných buňkách (modře, viz Tab. VI). Celková velikost plasmidu: 11057 bp.

4.3 Sestavení plasmidu pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu

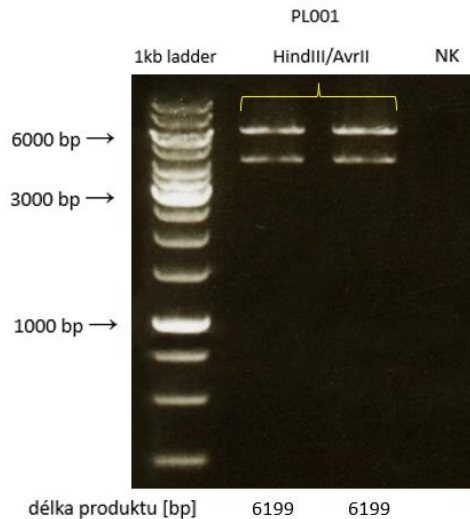
Inzerty A a B byly před vložením do vektoru nejprve amplifikovány pomocí PCR reakce (viz kapitola 3.2.1), jelikož pokusy vložit tyto inzerty do vektoru bez využití PCR amplifikace nebyly úspěšné. Před amplifikováním inzertů bylo nutné zvolit optimální teplotu nasedání navržených primerů pro tuto reakci (viz Tab. II), což bylo vyhodnoceno pomocí elektroforézového gelu na Obr. 13. Teplota nasedání primerů pro reakci byla zvolena v rozsahu od 45 °C do 65 °C na základě protokolu iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Biorad).



Obr. 13: Gradientová PCR inzertů. Agarózový gel zobrazující amplifikované inzerty A (2976 bp) a B (1959 bp) při působení různých teplot nasedání navržených primerů (z Tab. II). Byl použit 100 bp ladder (Thermo scientific).

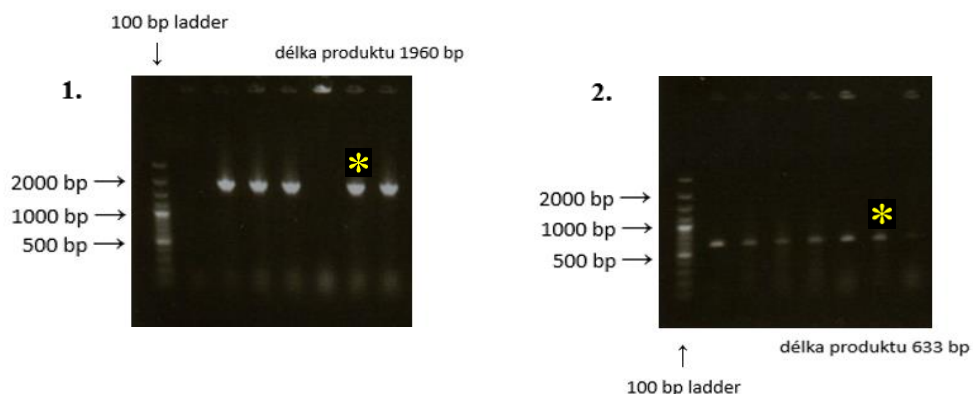
Za neoptimálnější Tm pro inzert A byla vyhodnocena teplota 55 °C, pro inzert B pak 50 °C, které byly použity k amplifikaci inzertů pro Gibson assembly reakci. Po přečištění těchto produktů z gelu byla změřena jejich koncentrace, která v případě inzertu A činila 12,2 ng/μl, v případě inzertu B 17,3 ng/μl.

Požadovaný úsek vektoru (recipientního plasmidu PL001, viz příloha č. 1) pro vložení inzertů bylo nejprve třeba linearizovat. Linearizaci požadovaného úseku vektoru pomocí AvrII a HindIII restričních enzymů jsem ověřila elektroforézovým gelem na Obr. 14, na kterém jsou patrné dva produkty o očekávaných velikostech 6199 bp a 4140 bp.



Obr. 14: Linearizace vektoru. Agarózový gel zobrazující recipientní plasmid. Recipientní úsek představuje produkt o velikosti 6199 bp. NK je negativní kontrola neobsahující templát. Byl použit 1 kb ladder (Thermo scientific).

Produkt o velikosti 6199 bp představuje recipientní úsek vektoru, a byl z gelu přečištěn a změřena jeho koncentrace, která činila 30,6 ng/μl. Na základě koncentrací a velikosti inzertů a vektoru byl vypočten jejich objem v následné Gibson assembly reakci v poměru 1:1:1 (viz kapitola 3.3.1). Po transformaci plasmidu do kompetentních bakteriálních buněk byla provedena PCR z kolonie pro ověření přítomnosti obou inzertů v molekule plasmidu.



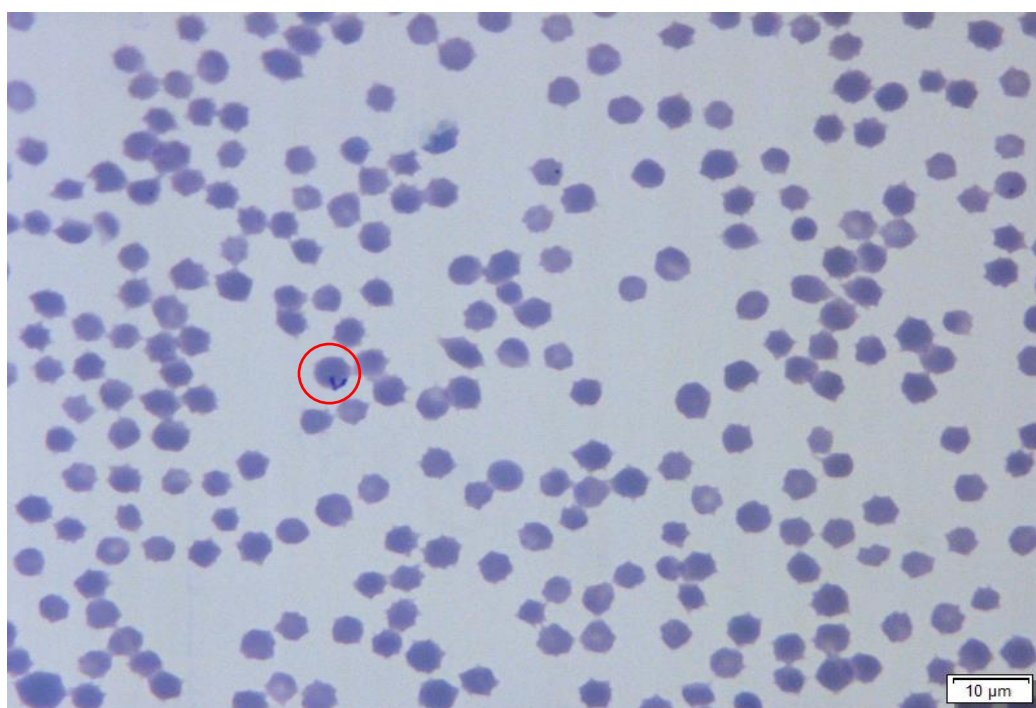
Obr. 15: PCR z kolonie. Vlevo je potvrzena přítomnost inzertu A ve vybraných koloniích, vpravo je pak potvrzena přítomnost inzertu B v totožných koloniích s primery viz Tab. IV. Byl použit 100 bp ladder (Thermo scientific).

Plasmid z vybraného pozitivního klonu, kde byla potvrzena přítomnost obou inzertů, na obrázku označen hvězdičkou, byl odeslán na sekvenování. Výsledná sekvence plasmidu z

pozitivní kolonie byla porovnána s referenční sekvencí z *in silico* klonování (viz Obr. 12 a příloha č. 2). Výsledný alignment je zobrazený v příloze č. 3. Z 11057 porovnávaných bází se referenční sekvence a sekvence pozitivní kolonie lišily pouze ve 3 bázích. 1 SNP (z angl. single-nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus) se vyskytuje na pozici 9540 v genu kódující AMP rezistenci, a mění aminokyselinu z prolinu (CCA) na alanin (GCA). Namnožení plasmidu v kompetentních bakteriálních buňkách bylo i přesto úspěšné, tudíž SNP neměl vliv na rezistenci vůči AMP. Zbylé dva SNP jsou na pozici 4244 a 4246 v genu pro GFP, kde došlo k záměně dvou nukleotidů (z TTA na CTC), nezměnila se však aminokyselina (leucin). Čísla pozic SNP odpovídají pozicím v příloze č. 3.

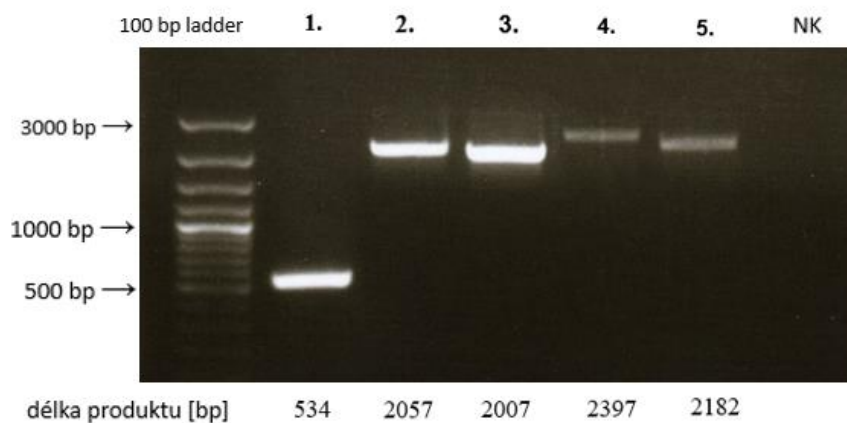
4.4 Transfekce plasmidu do *in vitro* kultury *B. divergens*

Sekvenačně ověřený plasmid byl namnožen pro získání potřebného množství plasmidu k transfekci. Koncentrace vyizolovaného plasmidu (viz kapitola 3.3.4) činila 2000 ng/μl, a transfekováno pomocí nukleofekce bylo celkem 40 ug. V transfekované kultuře *B. divergens* byl pozorován standardní průběh transfekce, kdy již 5. den po transfekci (4. den od přidání WR99210) nebyli detekováni žádní parazité v krevním roztěru. Inhibiční efekt zvolené koncentrace WR99210 byl ověřen pomocí wild type kultury, ve které nebyli parazité detekováni také již 4. den po přidání selekční drogy. První parazité (parazitémie <1 %, Obr. 16) v transfekované kultuře byli detekováni 10. den od transfekce.



Obr. 16: Detekce *B. divergens* merozoitů v *in vitro* kultuře 10. den po transfekci. Na snímku je zobrazen krevní roztěr *in vitro* kultury *B. divergens* pod selekčním tlakem WR99210. Na pořízeném snímku je detekovatelný první merozoit v transfekované kultuře. Krevní roztěr obarven pomocí DiffQuik staining setu.

Vyizolovaná DNA z transfekované kultury *B. divergens* (viz Obr. 16) byla úspěšně otestována pomocí již dříve ověřených primerů, které jsou v laboratoři rutinně využívány (viz Tab. VI). Následnou elektroforézou a vizualizací elektroforézového gelu (Obr. 17) byla potvrzena přítomnost plasmidu v této transfekované kultuře.



Obr. 17: Přítomnost plasmidu v transfekované kultuře. PCR č. 1 (dle Tab. VI) potvrdila přítomnost inzertu B; PCR č. 2 potvrdila přítomnost inzertu A a B; PCR č. 3 potvrdila přítomnost inzertu B; PCR č. 4 potvrdila přítomnost vektoru a na něj navazujícího inzertu A, PCR č. 5 potvrdila přítomnost vektoru a na něj navazujícího inzertu B. NK je negativní kontrola neobsahující templát. Byl použit 100 bp ladder (Thermo Scientific).

Ačkoliv transfekce proběhla úspěšně, a genetická modifikace – knock-in značení BdCDPK5 – v *in vitro* kultuře *B. divergens* byla potvrzena (viz Obr. 17), nepodařilo se vytvořit stabilní linii, která by mohla být dlouhodobě kultivována. Důvodem je nestabilita selekční drogy WR99210, u které bylo prokázáno postupné snižování funkce. Proto jsou v laboratoři nyní testovány selekční drogy WR99210 od různých dodavatelů, a po zjištění jejich efektivity a stability bude vhodná WR99210 použita pro vytvoření stabilní transfekční linie *B. divergens*, kde bude BdCDPK5 opět značena metodou knock-in za použití mnou navrženého a vytvořeného plasmidu (viz Obr. 12).

5 Diskuze

Tato práce je zaměřena na návrh a přípravu episomálního plasmidu pro značení signální molekuly BdCDPK5 metodou knock-in a následnou transfekci tohoto plasmidu do *in vitro* kultury *B. divergens* za účelem vytvoření transfekční linie. O funkci BdCDPK5 není dosud známo mnoho informací, avšak ortologní CDPK5 u *P. falciparum* hraje roli při proliferaci parazita a výstupu z erytrocytu (Dvorin et al., 2010). CDPK5 u *T. gondii* je pak o něco méně prostudovaná, výzkumy ale naznačují její zapojení do invaze do a výstupu z hostitelské buňky (Wang et al., 2015), stejná funkce však u BdCDPK5 ale zatím nebyla prokázána. Výzkum Elsworth et al., 2023 naznačuje, že BdCDPK5 není esenciální pro krevní stádia, na základě výzkumu v naší laboratoři se však zdá být důležitá v klíštěcích stádiích *B. divergens* (Msc. Filipe, dosud nepublikováno).

B. divergens je vhodným modelovým organismem pro vytvoření transfekčního systému, jelikož je pro tohoto parazita dostupná *in vitro* kultivace, a to v lidských (Lobo, 2005) a bovinních erytrocytech (Malandrin et al., 2004), je osekvenován celý genom (Young et al., 2019), jsou známy selekční mechanismy, a také je dostupný transfekční protokol (Cubillos et al., 2023; Elsworth et al., 2023). U *B. divergens* se standardně používá nukleofekce, což je účinnější metoda ve srovnání s elektroporací, a spočívá ve vložení nukleové kyseliny přímo do jádra či do cytoplasmy cílové buňky (Greiner et al., 2004; Johnson et al., 2005; Kumar et al., 2019), a tuto metodu jsem též využila v této práci.

Pro babesie se pro zavedení plasmidu do buňky standardně používá nukleofekce infikovaných bovinních erytrocytů (iRBC), což je velmi často používaná a ověřená metoda (Suarez & McElwain, 2010; Asada et al., 2012b), nebo nukleofekce volných merozoitů, která je také ověřenou metodou, ale je o něco méně využívána v porovnání s nukleofekcí iRBC (Suarez & McElwain, 2008). Cubillos et al., 2023 testovala v naší laboratoři pro *B. divergens* nukleofekci iRBCs i nukleofekci volných merozoitů, ale otestovala i méně standardní metodu, nukleofekci neinfikovaných bovinních erytrocytů (uRBCs), která dosud nebyla pro babesie zavedena. Ukázala se ale v porovnání s ostatními metodami nukleofekce jako nejúčinnější, protože vykazovala nejvyšší životaschopnost a brzkou emergenci transgenních parazitů (Cubillos et al., 2023). Na základě těchto experimentů byla v této práci využita varianta nukleofekce neinfikovaných bovinních erytrocytů pro docílení vyšší životaschopnosti a brzké emergenci transgenních parazitů v *in vitro* kultuře, což se jeví jako vhodně zvolená metoda, jelikož byli první transgenní parazité v mém výzkumu detekováni již 10. den po transfekci (viz Obr. 16). Elsworth et al., 2023 ve svém výzkumu zvolil nukleofekci volných merozoitů,

u které detekoval výskyt *B. divergens* transgenních parazitů obvykle až po 12-16 dnech po transfekci. Navíc úspěšnost této metody značí, že je *B. divergens* schopná přijmout DNA molekuly z cytoplasmy hostitelské buňky (Cubillos et al., 2023).

Pro genetickou manipulaci je nutné nejprve sestavit plasmid, který bude vložen do cílové buňky jednou z metod transfekce. Vložení plasmidu přímo do genomu parazita vyžaduje v případě babesii linearizovanou formu, zatímco episomální exprese vyžaduje plasmid ve formě kruhové molekuly (Asada et al., 2012), obě tyto varianty fungují i v případě *B. divergens* (Cubillos et al., 2023; Elsworth et al., 2023). Pro účely mé práce jsem zvolila episomální kruhový plasmid, který umožňuje overexpresi požadovaného genu (Lufino et al., 2008).

Transfekovaný plasmid se standardně skládá ze tří částí: reportérové kazety (v našem případě knock-in kazety), rezistenční kazety a tzv. backbone. My jsme použili standardní backbone s genem kódující rezistenci na AMP, což umožňuje namnožení plasmidu v kompetentních bakteriálních buňkách. Mnou navržená knock-in kazeta obsahovala kódující sekvenci BdCDPK5, která byla spojena linkerem GGGGS s fluorescenčním proteinem mEGFP a bakteriálním epitopem 3×HA tagem. GFP a 3×HA tag jsou běžně používané reportérové geny u babesii (Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018b; Suarez & McElwain, 2009), které slouží k detekci exprese cílového genu. Fluorescenční signál GFP lze využít např. na sledování exprese BdCDPK5 během životního cyklu parazita (tzv. *in vivo* imaging), 3×HA tag se zase používá k imunohistochemii či elektronové mikroskopii, kdy se využijí komerční protilátky proti tomuto epitopu (Hakimi et al., 2016; Suarez & McElwain, 2009). Reportérová kazeta má být řízena vhodným konstitutivním promotorem pro silnou expresi cílových genů (Fernandez-Becerra et al., 2003), v našem případě byla vybrána ověřená sekvence 5' UTR genu *actin*, který u babesii patří mezi jedny z nejsilnějších promotorů (Liu et al., 2018), a kazeta byla zakončena CAM terminátorem genu *calmodulin*. Vybrané UTRs byly již úspěšně zavedeny v naší laboratoři (Cubillos et al., 2023).

Rezistenční kazeta je důležitá pro poskytnutí selekční výhody parazitů, kteří tento plasmid přijmou do své buňky, a to ve formě genu kódující rezistenci na zvolenou selekční drogu, kterou je *in vitro* kultura držena pod tzv. selekčním tlakem. U babesii jsou standardně používané dvě selekční drogy – BSD (blasticidin) a WR99210 (Asada et al., 2012; Asada et al., 2015). BSD selekční droga nebyla pro tuto práci zvolena díky prokázanému inhibiční efektu až při vysoké koncentraci. Výzkum Elsworth et al., 2023 prokázal citlivost *B. divergens*

k BSD až při koncentraci 43,58 mM, zatímco u *B. bovis*, kde je BSD běžně využívanou selekční drogou, je inhibiční účinek BSD prokázán při koncentraci 4,36 mM (Suarez & McElwain, 2009). Ačkoliv selekce pomocí BSD byla v naší laboratoři také testována, nepodařilo se získat stabilní linii (Dr. Cubillos, Dr. Jalovecká, ústní sdělení), a tedy byla pro náš účel vyloučena. Navíc bylo zjištěno, že BSD nelze aplikovat napříč druhy *Babesia*, např. u *B. duncani* nebyl prokázán žádný inhibiční efekt, dokonce ani při koncentraci 217,91 mM (Wang et al., 2022). Byl proto na základě výzkumu Cubillos et al., 2023 zvolen selekční systém hDHFR-WR99210, který je založen na genu *hdhfr*. Sekvence genu *hdhfr* byla získána z plasmidu *B. bovis* od spolupracující laboratoře Dr. Asady (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan). Pro expresi hDHFR bylo nutné vložit do rezistenční kazety silný konstitutivní promotor. Promotor *ef-1alpha* je v této době u zástupců kmene Apicomplexa, včetně babesií, jedním z nejčastěji používaných (Adamson et al., 2001; Asada et al., 2012; De Goeyse et al., 2015; Hakimi et al., 2016; Liu et al., 2018; Suarez & McElwain, 2009). U *B. divergens* ale není *ef-1alpha* dosud anotován v genomu tohoto parazita, proto byl na základě výzkumu Cubillos et al., 2023 zvolen promotor genu *ef-tgtp* (Elongation Factor Tu GTP binding domain family protein), který vykazuje silnou aktivitu (Cubillos et al., 2023). Rezistenční kazeta byla zakončena 3' UTR CRT genu pro *chloroquiní transporter resistance*, který již byl také ověřen v naší laboratoři.

Cubillos et al., 2023 potvrdila ve svých experimentech citlivost *B. divergens* na WR99210, u které by zaznamenan inhibiční efekt již při koncentraci 5 nM, a která odpovídá standardně používané koncentraci v jiných transgenních systémech *Babesia* (Asada et al., 2012b; Hakimi et al., 2016; Wang et al., 2022) či příbuzného *Plasmodium* spp. (de Koning-Ward et al., 2000; Fidock & Wellems, 1997). V této práci byla nejprve používána 5 nM WR99210, tato koncentrace musela být po konzultaci s Dr. Asada zvýšena na 30 nM, jelikož 5 nM koncentrace již neměla požadovaný inhibiční účinek. Při 30 nM koncentraci WR99210 se podařilo transgenní parazity získat již 10. den po transfekci, ale ani tato koncentrace nestačila k dlouhodobému udržení kultury, a nemohly tedy být provedeny další experimenty. Problém se stabilizací transgenní kultury pod WR99210 se nevyskytl pouze v naší laboratoři. Obdobnému problému čelí i náš spolupracovník, výše zmíněný Dr. Asada, který pracuje s *B. bovis*. Remcho et al., 2020 shledal stejný problém při inhibici *P. falciparum*, kdy ve své studii testoval WR99210 ze dvou komerčních zdrojů, a to Jacobus Pharmaceutical Company (JP) a Sigma-Aldrich (SA) Corporation. WR99210 od JP mělo inhibiční efekt na *P. falciparum* již v nanomolárních koncentracích, WR99210 ze zdroje SA však nemělo požadovaný

inhibiční efekt ani v mikromolárních koncentracích (Remcho et al, 2020). Ačkoliv námi používané WR99210 pocházelo od JP, potřeba stále navyšovat jeho koncentraci ukazuje jeho nestabilitu. Pro budoucí studie je tedy velmi důležitým cílem vybrat a optimalizovat vhodné selekční drogy. Gen *hdhfr* zároveň kóduje rezistenci pro pyrimethamin, který by do budoucna teoreticky mohl problematické WR99210 vystřídat (Hakimi et al., 2021).

Ačkoliv byla úspěšně vytvořena *in vitro* transfekční linie *B. divergens*, a úspěšně proběhla genetická modifikace ve formě knock-in značení BdCDPK5, nedošlo k vytvoření stabilního transfekčního systému z důvodu snížené funkce WR99210. Jakmile bude identifikováno vhodné WR99210, bude použito k vytvoření stabilního transfekčního systému *B. divergens*, kde bude připravený plasmid použit pro značení BdCDPK5. Výsledná transgenní linie bude sloužit k podrobné charakterizaci funkce BdCDPK5 během životního cyklu *B. divergens* a lokalizaci tohoto enzymu v buňce parazita pomocí různých mikroskopických technik.

6 Závěr

- Provedla jsem stručnou literární rešerši na téma kalcium-dependentních proteinkináz a genových manipulací parazitů z kmene Apicomplexa.
- Navrhla jsem schéma pro značení BdCDPK5 pomocí knock-in přístupu na modelu parazita *B. divergens*.
- Sestavila jsem plasmid pro vytvoření transgenní *B. divergens* se značenou BdCDPK5.
- Transfekovala jsem sestavený plasmid do *in vitro* kultury *B. divergens*, a ověřila jsem přítomnost transgenních parazitů s tagovanou BdCDPK5.

7 Literatura

- Adamson, R., Lyons, K., Sharrard, M., Kinnaird, J., Swan, D., Graham, S., Shiels, B., & Hall, R. (2001). Transient transfection of *Theileria annulata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *114*(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00238-9)
- Armstrong, C. M., & Goldberg, D. E. (2007). An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nature Methods*, *4*(12), 1007-1009. <https://doi.org/10.1038/nmeth1132>
- Asada, M., Goto, Y., Yahata, K., Yokoyama, N., Kawai, S., Inoue, N., & Kaneko, O. (2012a). Gliding Motility of *Babesia bovis* Merozoites Visualized by Time-Lapse Video Microscopy. *PLOS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035227>
- 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., Tanaka, M., Goto, Y., Yokoyama, N., Inoue, N., & Kawazu, S. (2012b). 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), 162-170. <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>
- Azevedo, M. F., Sanders, P. R., Krejany, E., Nie, C. Q., Fu, P., Bach, L. A., Wunderlich, G., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2013). Inhibition of *Plasmodium falciparum* CDPK1 by conditional expression of its J-domain demonstrates a key role in schizont development. *Biochemical Journal*, *452*(3), 433-441. <https://doi.org/10.1042/BJ20130124>
- Barros, M. T. (2017). Ca²⁺-signaling-based molecular communication systems: Design and future research directions. *Nano Communication Networks*, *11*, 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.nancom.2017.02.001>

- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 11-21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Billker, O., Lourido, S., & Sibley, L. D. (2009). Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.017>
- Bisio, H., & Soldati-Favre, D. (2019). Signaling cascades governing entry into and exit from host cells by *Toxoplasma gondii*. *Annual Review of Microbiology*, 73, 579-599. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120235>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7). 10.1101/cshperspect.a011171
- Bruce, J. I. E. (2018). Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*, 69, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.001>
- Cali, T., Brini, M., & Carafoli, E. (2018). The PMCA pumps in genetically determined neuronal pathologies. *Neuroscience Letters*, 663, 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.005>
- Castellanos-Gonzalez, A., Sparks, H., Nava, S., Huang, W., Zhang, Z., Rivas, K., Hulverson, M. A., Barrett, L. K., Ojo, K. K., Fan, E., & Van Voorhis, W. C. (2016). A Novel Calcium-Dependent Kinase Inhibitor, Bumped Kinase Inhibitor 1517, Cures Cryptosporidiosis in Immunosuppressed Mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(12), 1850-1855. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw481>
- Chakraborty, S., Roy, S., Mistry, H. U., Murthy, S., George, N., Bhandari, V., & Sharma, P. (2017). Potential Sabotage of Host Cell Physiology by Apicomplexan Parasites for Their Survival Benefits. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 1261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01261>
- Chalmers, R. M., Davies, A. P., & Tyler, K. (2019). *Cryptosporidium*. *Microbiology*, 165(5) <https://doi.org/10.1099/mic.0.000764>

- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrino, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, *40*(2). <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>
- Choi, W., Hilleary, R., Swanson, S. J., Kim, S., & Gilroy, S. (2016). Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *67*, 287-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112130>
- Cochrane, J. C., Lipchock, S. V., & Strobel, S. A. (2006). 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>
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., & Sinnis, P. (2007). Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to *Plasmodium* Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Cells. *Cell Host & Microbe*, *2*(5), 316. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>
- Cruz-Bustos, T., Ramakrishnan, S., Cordeiro, C. D., Ahmed, M. A., & Docampo, R. (2018). A Riboswitch-based Inducible Gene Expression System for *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *65*(3), 412-421. <https://doi.org/10.1111/jeu.12493>
- Cubillos, E. F. G., Snebergerova, P., Borsodi, S., Reichensdorferova, D., Levytska, V., Asada, M., Sojka, D., & Jalovecka, M. (2023). Establishment of a stable transfection and gene targeting system in *Babesia divergens*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1278041. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1278041>
- Cursino-Santos, J. R., Singh, M., Senaldi, E., Manwani, D., Yazdanbakhsh, K., & Lobo, C. A. (2019). Altered parasite life-cycle processes characterize *Babesia divergens* infection in 47 human sickle cell anemia. *Haematologica*, *104*(11), 2189–2199. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214304>

- Cyert, M. S. (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 35, 647-672. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091302>
- Datta, S., Peng, H., & Hulleman, J. D. (2019). Small Molecule-Based Inducible Gene Therapies for Retinal Degeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1185, 65-69. [10.1007/978-3-030-27378-1_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1_11)
- De Goeyse, I., Jansen, F., Madder, M., Hayashida, K., Berkvens, D., Dobbelaere, D., & Geysen, D. (2015). Transfection of live, tick derived sporozoites of the protozoan Apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Veterinary Parasitology*, 208(3-4), 238-241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.013>
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2015). Advances in molecular genetic systems in malaria. *In Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 373–387. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3450>
- de Koning-Ward, T. F., Fidock, D. A., Thathy, V., Menard, R., Van Spaendonk, R. M., Waters, A. P., & Janse, C. J. (2000). The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106(2), 199-212. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00189-9)
- Decampo, R., & Moreno, S. N. J. (2021). Calcium signalling in intracellular protist parasites. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.002>
- Doghaither, H. A. I., & Gull, M. (2019). Plasmids as Genetic Tools and Their Applications in Ecology and Evolution. *Plasmid. IntechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85705>
- Dominguez, D. C., Guragain, M., & Patrauchan, M. (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, 57(3), 151-165. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.006>
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M., J., Baker, D., A., Wandless, T., J., & Duraisingh, M., T. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*, 328(5980), 910-912. [10.1126/science.1188191](https://doi.org/10.1126/science.1188191)
- Elsworth, B., Keroack, C., Rezvani, Y., Paul, A., Barazorda, K., Tennessen, J., Sack, S., Moreira, C., Gubbels, M., Meyers, M., Zarringhalam, K., & Duraisingh, M. [2023, preprint] *Babesia*

- divergens* egress from host cells is orchestrated by essential and druggable kinases and proteases. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2553721/v1>
- Falcke, M. (2004). Reading the patterns in living cells —the physics of ca^{2+} signaling. *Advances in Physics*, 53(3), 255-440. <https://doi.org/10.1080/00018730410001703159>
- Fang, H., Gomes, A. R., Klages, N., Pino, P., Maco, B., Walker, E. M., Zenonos, Z. A., Angrisano, F., Baum, J., Doerig, C., Baker, D. A., Billker, O., & Brochet, M. (2018). Epistasis studies reveal redundancy among calcium-dependent protein kinases in motility and invasion of malaria parasites. *Nature Communications*, 9, 4248. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06733-w>
- Fidock, D. A., & Wellems, T. E. (1997). Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10931-10936. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10931>
- Filipe, A. M., Levytska, V., & Jalovecka, M. (2023). *Babesia divergens*. *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.11.008>
- Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidović, A., Durieux, M. F., Dardé, M. L., & Mercier, A. (2018). *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends in Parasitology*, 34(2), 140-154. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.010>
- Garrison, E., Treeck, M., Ehret, E., Butz, H., Garbuz, T., Oswald, B. P., Settles, M., Boothroyd, J., & Arrizabalaga, G. (2012). A forward genetic screen reveals that calcium-dependent protein kinase 3 regulates egress in *Toxoplasma*. *Pathogens*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003049>
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal of Parasitology*, 43(2), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>
- Goonewardene, R., Daily, J., Kaslow, D., Sullivan, T. J., Duffy, P., Carter, R., Mendis, K., & Wirth, D. (1993). Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5234-5236. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5234>

- Govindasamy, K., & Bhanot, P. (2020). Overlapping and distinct roles of CDPK family members in the pre-erythrocytic stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLOS Pathogens*, *16*(8), e1008131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008131>
- Govindasamy, K., Jebiwott, S., Jaijyan, D. K., Davidow, A., Ojo, K. K., Van Voorhis, W. C., Brochet, M., Billker, O., & Bhanot, P. (2016). Invasion of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites requires cGMP-dependent protein kinase and calcium dependent protein kinase 4. *Molecular Microbiology*, *102*(2), 349. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466>
- Hakimi, H., Asada, M., & Kawazu, S. I. (2021). Recent advances in molecular genetic tools for *Babesia*. *In Veterinary Sciences* *8*(10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vetsci8100222>
- Hakimi, H., Templeton, T. J., Sakaguchi, M., Yamagishi, J., Miyazaki, S., Yahata, K., Uchihashi, T., 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>
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, *151*(1), 175-183. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00171.x>
- Harmon, A. C., Yoo, B. C., & McCaffery, C. (1994). Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, *33*(23), 7278-7287. <https://doi.org/10.1021/bi00189a032>
- Harper, J. F., Huang, J. F., & Lloyd, S. J. (1994). Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, *33*(23), 7267-7277. <https://doi.org/10.1021/bi00189a031>
- Hildebrandt, A., Gray, J., & Montero, E. (2023). Characteristics of Human Babesiosis in Europe. *Pathogens*, *12*(2), 323. [10.3390/pathogens12020323](https://doi.org/10.3390/pathogens12020323)
- Hildebrandt, A., Zintl, A., Montero, E., Hunfeld, K., & Gray, J. (2021). Human Babesiosis in Europe. *Pathogens*, *10*(9), 1165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091165>

- Holder, A. A., Rudzuan, M. A. M., & Green J. L. (2012) Calcium dependent protein kinase 1 and calcium fluxes in the malaria parasite. *Microbes and Infection*, 14(10), 825-830. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.006>
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Hunfeld, K., Hildebrandt, A., & Gray, J. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219–1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Hüser, J., Blatter, L. A., & Lipsius, S. L. (2000). Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *Journal of Physiology*, 2, 415-422. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00415.x>
- Hussein, H. E., Johnson, W. C., Taus, N. S., Capelli-Peixoto, J., Suarez, C. E., Mousel, M. R., & Ueti, M. W. (2021). Differential expression of calcium-dependent protein kinase 4, tubulin tyrosine ligase, and methyltransferase by xanthurenic acid-induced *Babesia bovis* 49 sexual stages. *Parasites & Vectors*, 14(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04902-3>
- Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasites & Vectors*, 9(1), 439. <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., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *In Trends in Parasitology*, 35(5). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- 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>
- Kato, N., Sakata, T., Breton, G., Le Roch, K. G., Nagle, A., Andersen, C., Bursulaya, B., Henson, K., Johnson, J., Kumar, K. A., Marr, F., Mason, D., McNamara, C., Plouffe, D.,

- Ramachandran, V., Spooner, M., Tuntland, T., Zhou, Y., Peters, E. C., Chatterjee, A., Schultz, P. G., Ward, G. E., Gray, N., Harper, J., & Winzeler, E. A. (2008). Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nature Chemical Biology*, 4(6), 347-356. <https://doi.org/10.1038/nchembio.87>
- 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), 1499-1509. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000857>
- Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology*, 49(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>
- Kudyba, H. M., Cobb, D. W., Vega-Rodríguez, J., & Muralidharan, V. (2021). Some conditions apply: Systems for studying *Plasmodium falciparum* protein function. *PLOS Pathogens*, 17(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009442>
- Kuhlenschmidt, T. B., Rutaganira, F. U., Long, S., Tang, K., Shokat, K. M., Kuhlenschmidt, M. S., & Sibley, L. D. (2015). Inhibition of Calcium-Dependent Protein Kinase 1 (CDPK1) In Vitro by Pyrazolopyrimidine Derivatives Does Not Correlate with Sensitivity of *Cryptosporidium parvum* Growth in Cell Culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 570-579. <https://doi.org/10.1128/AAC.01915-15>
- Kuibagarov, M., Makhamed, R., Zhykibayev, A., Berdikulov, M., Abdrakhmanov, S., Kozhabayev, M., Akhmetollayev, I., Mukanov, K., Ryskeldina, A., Ramankulov, Y., Shustov, A., Bauer, C., & Shevtsov, A. (2023). *Theileria* and *Babesia* infection in cattle – First molecular survey in Kazakhstan. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(1), 102078. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102078>
- Kumar, P., Tripathi, A., Ranjan, R., Halbert, J., Gilberger, T., Doerig, C., & Sharma, P. (2014). Regulation of *Plasmodium falciparum* Development by Calcium-dependent Protein Kinase 7 (PfCDPK7). *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20386-20395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561670>
- Kumar, S., Haile, M. T., Hoopmann, M. R., Tran, L. T., Michaels, S. A., Morrone, S. R., Ojo, K. K., Reynolds, L. M., Kusebauch, U., Vaughan, A. M., Moritz, R. L., Kappe, S. H. I., &

- Swearingen, K. E. (2021). *Plasmodium falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 4 is Critical for Male Gametogenesis and Transmission to the Mosquito Vector. *mBio*, 12(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02575-21>.
- Li, W., Zhang, N., Liang, X., Li, J., Gong, P., Yu, X., Ma, G., Ryan, U. M., & Zhang, X. (2009). Transient transfection of *Cryptosporidium parvum* using green fluorescent protein (GFP) as a marker. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 168(2), 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.07.0034>
- Lim, D. C., Cooke, B. M., Doerig, C., & Saeij, J. P. J. (2012). *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: Roles in invasion and host cell remodelling. *International Journal for Parasitology*, 42(1), 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.11.007>
- Limenitakis, J., & Soldati-Favre, D. (2011). Functional genetics in Apicomplexa: Potentials and limits. *FEBS Letters*, 585(11), 1579-1588. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.002>
- Lippuner, C., Ramakrishnan, C., Basso, W. U., Schmid, M. W., Okoniewski, M., Smith, N. C., Hässig, M., Deplazes, P., & Hehl, A. B. (2018). RNA-Seq analysis during the life cycle of *Cryptosporidium parvum* reveals significant differential gene expression between proliferating stages in the intestine and infectious sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 48(6), 413-422. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.007>
- 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., Hakimi, H., Masatani, T., Sunaga, F., Kawazu, S., Yamagishi, J., Jia, L., Inoue, N., & Xuan, X. (2018). 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, P. F., 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., 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., Hakimi, H., Masatani, T., Sunaga, F., Kawazu, S., Yamagishi, J., Jia, L., Inoue, N., & Xuan, X. (2018). 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>
- Lobo, A. (2004). *Babesia divergens* and *Plasmodium falciparum* Use Common Receptors, Glycophorins A and B, To Invade the Human Red Blood Cell. *Infection and Immunity*, 73(1), 649-651. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.649-651.2005>
- Lobo, C. A., Cursino-Santos, J. R., Singh, M., & Rodriguez, M. (2019). *Babesia divergens*: A Drive to Survive. *Pathogens*, 8(3), 95. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030095>
- Lourido, S., & Moreno, S. N. J. (2015). The Calcium Signaling Toolkit of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Cell Calcium*, 57(3), 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.010>
- Lourido, S., Shuman, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Hui, R., & Sibley, L. D. (2010). Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. *Nature*, 465(7296), 359-362. <https://doi.org/10.1038/nature09022>
- Lourido, S., Tang, K., & Sibley, L. D. (2012). Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *The EMBO Journal*, 31(24), 4524-4534. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.299>
- Lufino, M. M. P., Edser, P. A. H., & Wade-Martins, R. (2008). Advances in High-capacity Extrachromosomal Vector Technology: Episomal Maintenance, Vector Delivery, and Transgene Expression. *Molecular Therapy*, 16(9), 1525-1538. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.156>
- Malandrin, L., L'Hostis, M., & Chauvin, A. (2004). Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Veterinary Research*, 35(1), 131-139. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003047>
- Marchi, S., Giorgi, C., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2020). Ca²⁺ Fluxes and Cancer. *Molecular Cell*, 78(6), 1055-1069. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.017>
- Mathur, V., Kolísko, M., Hehenberger, E., Irwin, N. A. T., Leander, B. S., Kristmundsson, Á., Freeman, M. A., & Keeling, P. J. (2019). Multiple Independent Origins of Apicomplexan Like Parasites. *Current Biology*, 29(17), 2936-2941.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.019>

- Maurya, R., Tripathi, A., Kumar, M., Antil, N., Yamaro-Botté, Y., Kumar, P., Bansal, P., Doerig, C., Botté, C. Y., Prasad, T. S. K., & Sharma, P. (2022). PI4-kinase and PfCDPK7 signaling regulate phospholipid biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *EMBO Reports*, 23(2). <https://doi.org/10.15252/embr.202154022>
- McCoy, J. M., Whitehead, L., van Dooren, G. G., & Tonkin, C. J. (2012). TgCDPK3 regulates calcium-dependent egress of *Toxoplasma gondii* from host cells. *Pathogens* 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003066>
- McFadden, G.I. (2011). The apicoplast. *Protoplasma*, 248, 641–650. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0250-5>
- McFadden, G.I. (2014). Apicoplast. *Current Biology*, 24(7), 262-263. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.024>
- Miao, R., Li, M., Wen, Z., Meng, J., Liu, X., Fan, D., Lv, W., Cheng, T., Zhang, Q., & Sun, L. (2023). Whole-Genome Identification of Regulatory Function of CDPK Gene Families in Cold Stress Response for *Prunus mume* and *Prunus mume* var. Tortuosa. *Plants*, 12(13), 2548. <https://doi.org/10.3390/plants12132548>
- Mitcheson, D. F., Tobin, A. B., & Alam, M. M. (2015). Applying chemical genetic tools to the study of phospho-signalling pathways in malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(10), 1650–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.06.014>
- Montero, E., Folgueras, M., Rodriguez-Pérez, M., Pérez-Is, L., Díaz-Arias, J., Meana, M., Revuelta, B., Haapasalo, K., Collazos, J., Asensi, V., & Gonzalez, L., M. (2023). Retrospective study of the epidemiological risk and serological diagnosis of human babesiosis in Asturias, Northwestern Spain. *Parasites & Vectors*, 16, 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05817-x>
- Morlon-Guyot, J., Berry, L., Chen, C.-T., Gubbels, M. J., Lebrun, M., & Daher, W. (2014). The *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 7 is involved in early steps of parasite division and is crucial for parasite survival. *Cellular Microbiology*, 16(1), 95-114. <https://doi.org/10.1111/cmi.12186>

- 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.
- Okamoto, N., & Keeling, P. J. (2014). The 3D Structure of the Apical Complex and Association with the Flagellar Apparatus Revealed by Serial TEM Tomography in *Psammosa pacifica*, a Distant Relative of the Apicomplexa. *PLOS One*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084653>
- Plattner, H., & Verkhatsky, A. (2015). The ancient roots of calcium signalling evolutionary tree. *Cell Calcium*, *57*(3), 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.004>
- Poespoprodjo, J. R., Douglas, N. M., Ansong, D., Kho, S., & Anstey, N. M. (2023), Malaria. *The Lancet*, *402*(10419). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01249-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01249-7)
- Prommana, P., Uthaipibull, 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>
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(12). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.001>
- Ramadurgum, P., & Hulleman, J. D. (2020). Protocol for Designing Small-Molecule-Regulated Destabilizing Domains for In Vitro Use. *STAR Protocols*, *1*(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100069>
- Ramadurgum, P., Daniel, S., & Hulleman, J. D. (2020). Protocol for In Vivo Evaluation and Use of Destabilizing Domains in the Eye, Liver, and Beyond. *STAR Protocols*, *1*(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100094>
- Rangel, G. W., & Llinás, M. (2021). Re-Envisioning Anti-Apicomplexan Parasite Drug Discovery Approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.691121>
- Remcho, T. P., Guggilapu, S. D., Cruz, P., Nardone, G. A., Heffernan, G., Bewley, C. A., Wellems, T. E., & Lane, K. D. (2020). Regioisomerization of Antimalarial Drug WR99210 Explains the

- Inactivity of a Commercial Stock. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01385-20>
- Sharma, M., Choudhury, H., Roy, R., Michaels, S. A., Ojo, K. K., & Bansal, A. (2021). CDPKs: The critical decoders of calcium signal at various stages of malaria parasite development. *In Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5092–5107. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.054>
- Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A. M., & Florin-Christensen, M. (2022). The Piroploasma *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitology Research*, 121, 1207-1245. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07424-8>
- 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 crossspecies 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>
- Soldati, D., & Boothroyd, J. C. (1993). Transient Transfection and Expression in the Obligate Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, 260(5106). <https://doi.org/8469986>
- Su, X., 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. *American Society for microbiology*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-19>
- 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*, 167(2-4), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.022>

- Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*, *49*(2), 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>
- 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. (2008). Transient transfection of purified *Babesia bovis* merozoites. *Experimental Parasitology*, *118*(4), 498-504. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.10.013>
- Suarez, C. E., Norimine, J., Lacy, P., & McElwain, T. F. (2006). Characterization and gene expression of *Babesia bovis* elongation factor-1 α . *International Journal for Parasitology*, *36*(8), 965-973. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.022>
- Südhof, T. C. (2012). Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(1). [10.1101/cshperspect.a011353](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353)
- Tian, W., Wang, C., Gao, Q., Li, L., & Luan, S. (2020). Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature Plants*, *6*(7), 750-759. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0667-6>
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*(1–2), 3– 10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- Vaishnava, S., & Striepen, B. (2006). The cell biology of secondary endosymbiosis – how parasites build, divide and segregate the apicoplast. *Molecular Microbiology*, *61*(6), 1380-1387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05343.x>
- Vaishnava, S., & Striepen, B. (2006). The cell biology of secondary endosymbiosis – how parasites build, divine and segregate the apicoplast. *Molecular Biology*, *61*(6), 1380-1387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05343.x>

- 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>
- Vella, S. A., Moore, C. A., Li, Z., Triana, M. A. H., Potapenko, E., & Moreno, S. N. J. (2021). The role of potassium and host calcium signaling in *Toxoplasma gondii* egress. *Cell Calcium*, 94, 102337. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102337>
- Verhoef, J. M. J., Meissner, M., & Kooij, T. W. A. (2021). Organelle Dynamics in Apicomplexan Parasites. *American society for microbiology* 12(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01409-21>
- Votýpka, J., Modrý, D., Oborník, M., Šlapeta, J., & Lukeš, J. (2017). Apicomplexa. *Handbook of the Protists*, 567-624. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_20
- Wang, J., Wang, X., Guan, G., Yang, J., Liu, J., Liu, A., Li, Y., Luo, J., & Yin, H. (2021). Stable transfection system for *Babesia* sp. Xinjiang. *Parasites & Vectors*, 14. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04940-x>
- Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Zhang, N.-Z., Chen, J., & Zhu, X.-Q. (2015). Genome-wide expression patterns of calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0917-z>
- Wang, S., Li, D., Chen, F., Jiang, W., Luo, W., Zhu, G., Zhao, J., & He, L. (2022). Establishment of a Transient and Stable Transfection System for *Babesia duncani* Using a Homologous Recombination Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.844498>
- Watson, P. Y., & Fedor, M. J. (2011). The *glmS* Riboswitch Integrates Signals from Activating and Inhibitory Metabolites In Vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(3), 359-363. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1989>
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., & Rubinsztein, D. C. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 295-305. <https://doi.org/10.1038/nchembio.79>
- Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., & Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 428(6980), 281-286. <https://doi.org/10.1038/nature02362>

- Young, K. M., Corrin, T., Wilhelm, B., Uhlund, 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, Q., Shao, Q., Guo, Y., Li, N., Li, Y., Su, J., Xu, R., Zhang, Z., Xiao, L., & Feng, Y. (2020). Characterization of Three Calcium-Dependent Protein Kinases of *Cryptosporidium parvum*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622203>
- Zhang, X., Liu, L., Su, Z., Tang, J., Shem, Z., Gao, G., Yi, Y., & Zheng, H. (2019). Expression analysis of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) superfamily genes in *Medicago lupulinain* response to high calcium, carbonate and drought. *Plant Soil*, *441*(1-2). <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04109-7>
- Zhang, Y., & Yu, L. (2008). Microinjection as a tool of mechanical delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(5), 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.005>
- 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. *American Society for microbiology*, *16*(4), 622-636. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.4.622-636.2003>

Seznam příloh

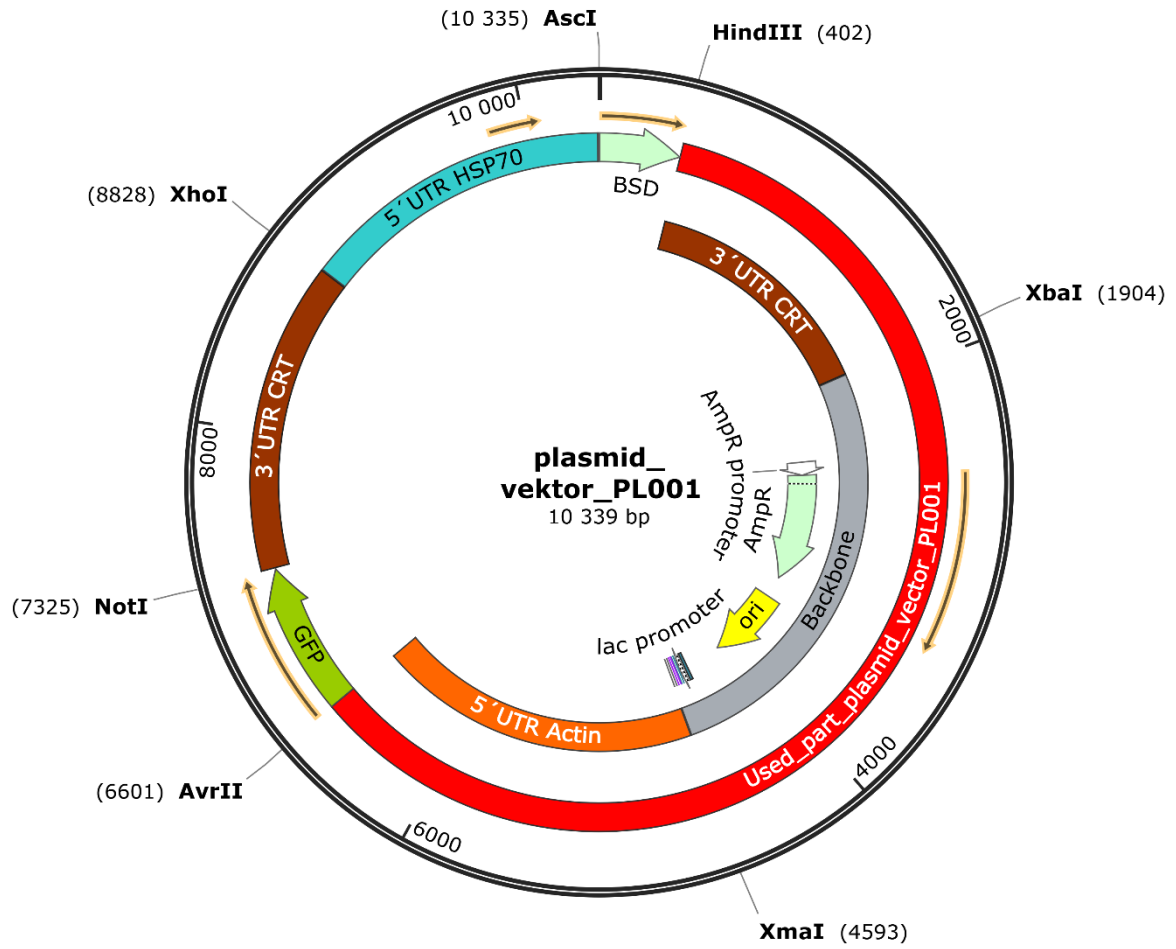
Příloha č. 1 – Mapa recipientního plasmidu plasmid_vektor_PL001

Příloha č. 2 – Kompletní *in silico* design plasmidu s referenční sekvencí

Příloha č. 3 – Aligment sekvence *in silico* klonování se sekvencí plasmidu z pozitivní kolonie

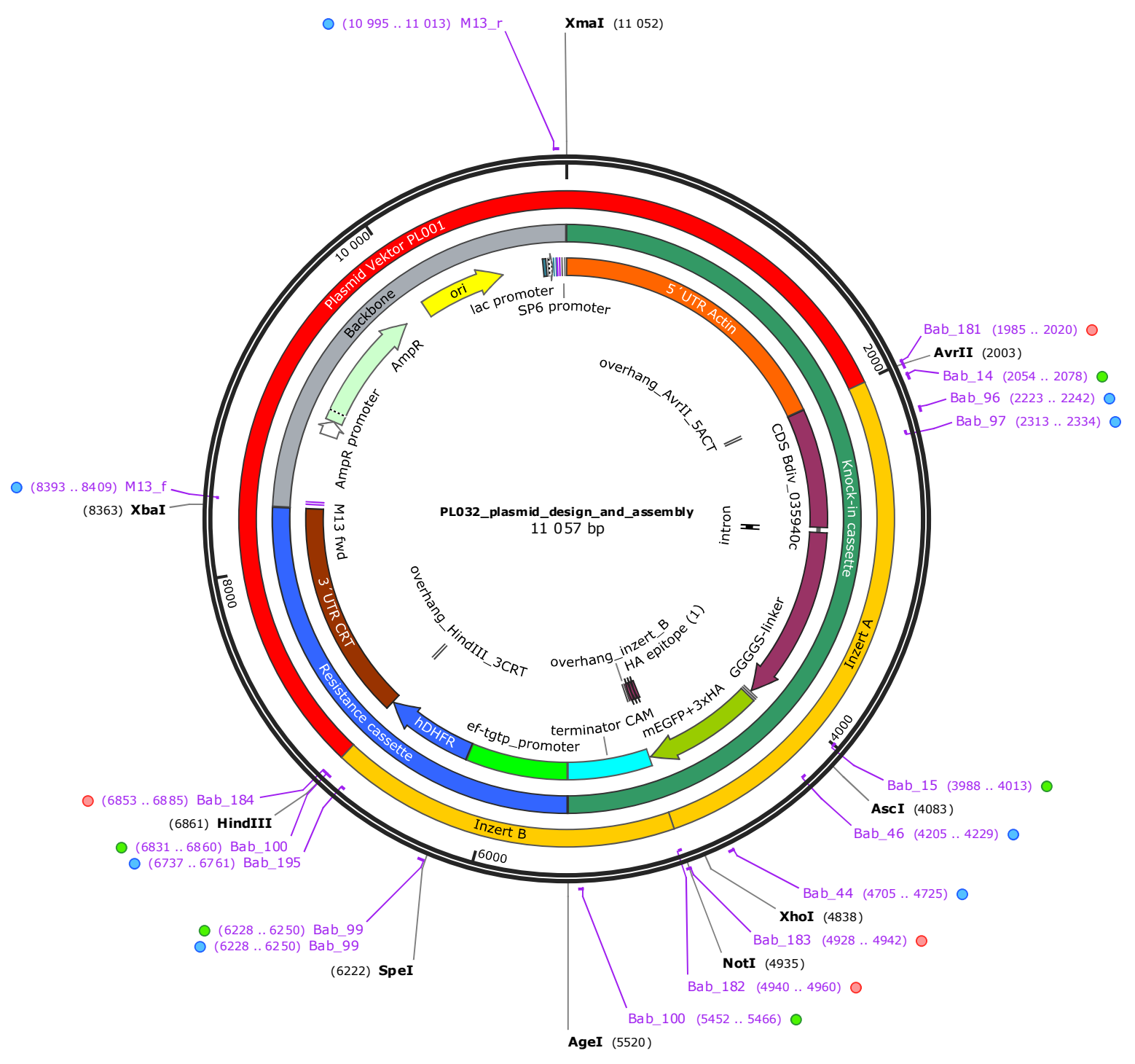
Příloha č. 1 – Mapa recipientního plasmidu plasmid_vektor_PL001

Created by SnapGene



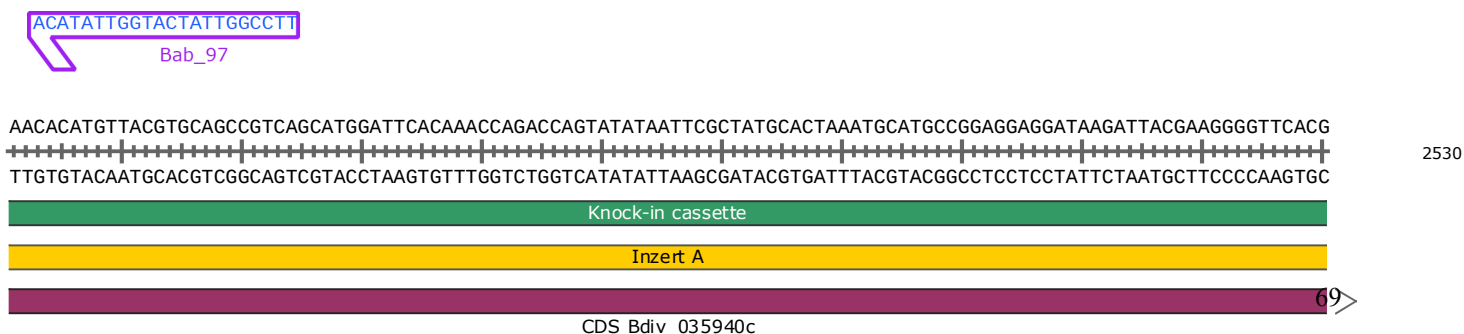
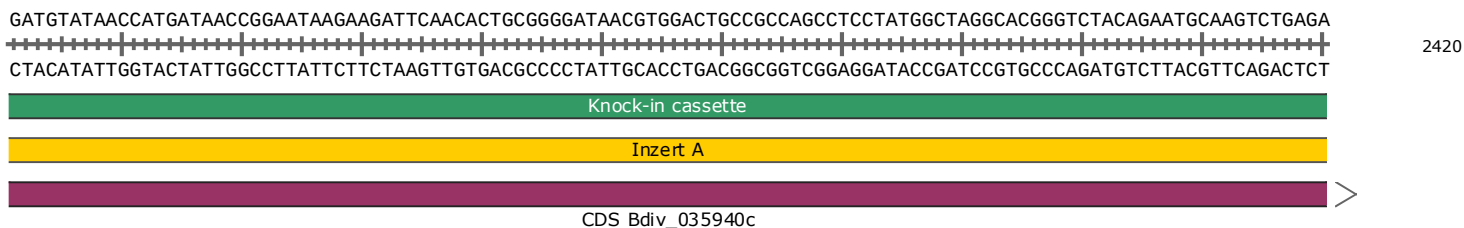
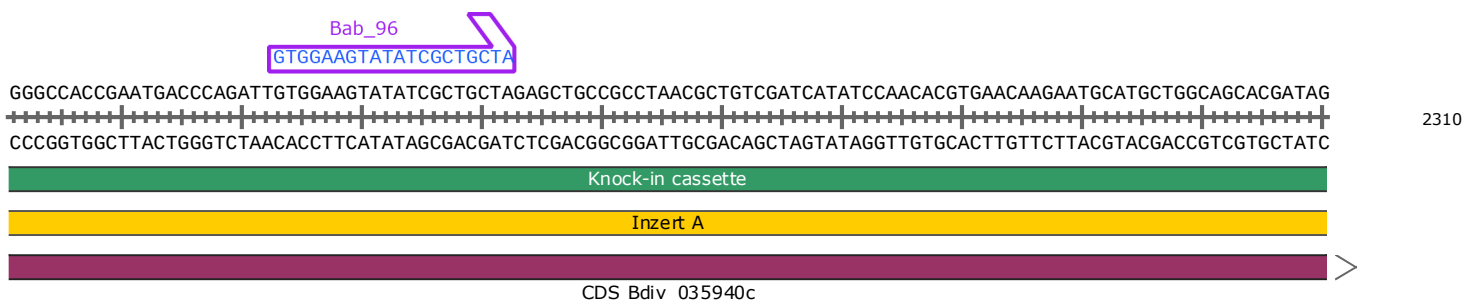
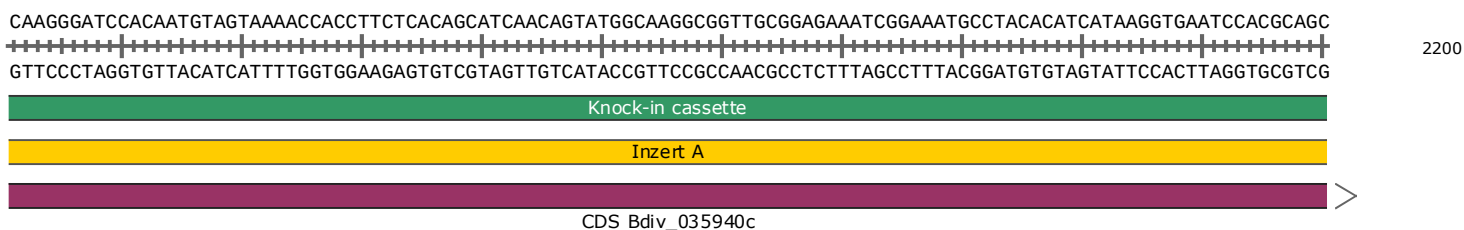
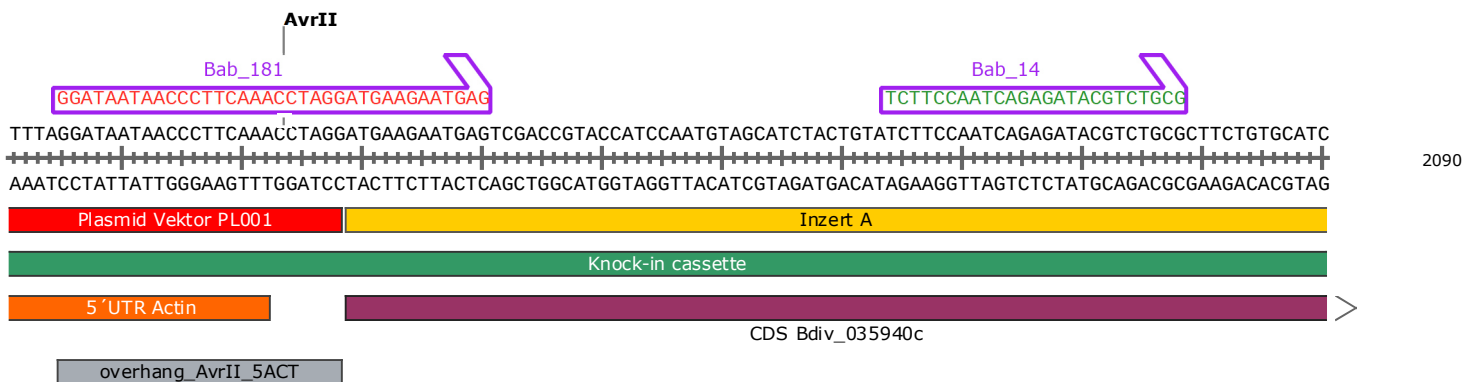
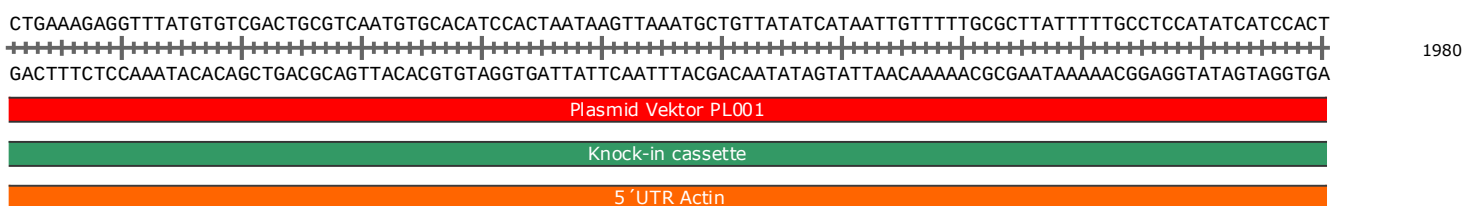
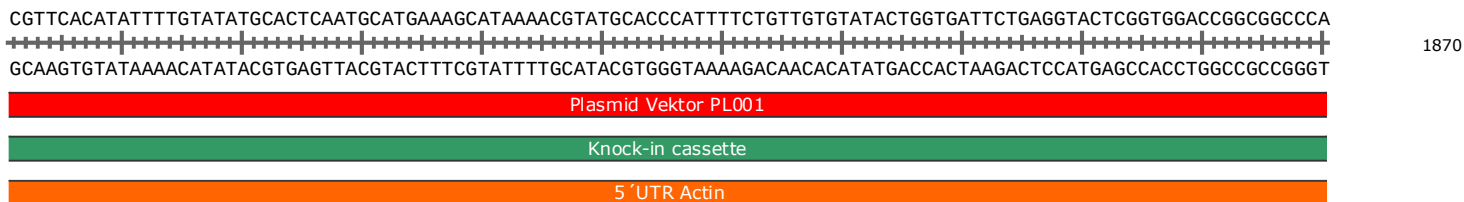
Příloha č. 2 – Kompletní *in silico* design plasmidu s referenční sekvencí

8 features are not displayed

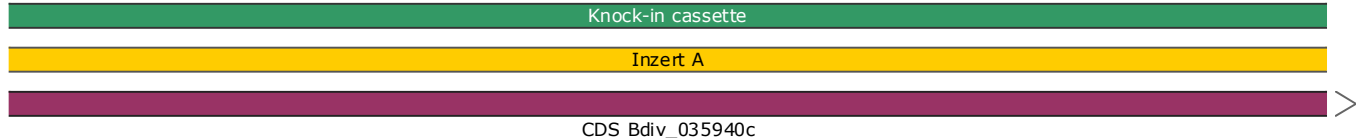




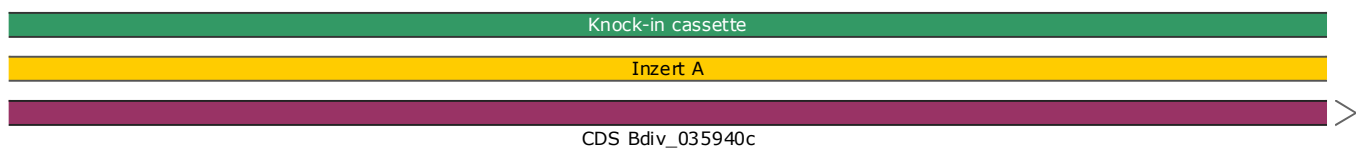




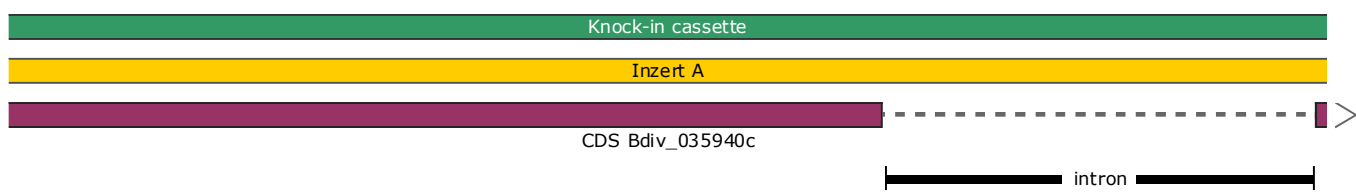
GGCCTTCTAATACAAACCCCAATTTTTAATTACGTCAATGAGCCCAAGCCACAGTCGTCGAGGGATGTGACTCCAACCTTTTGACAGATCTTTGTGATCCACGAACTGC
 CCGGAAGATTATGTTGGGGTTAAAAATTAATGCAGTTACTCGGGTTCGGTGTGACGAGCTCCCTACACTGAGGTTGAAAACCTGTCTAGAAAACACTAGGTGCTTTGACG



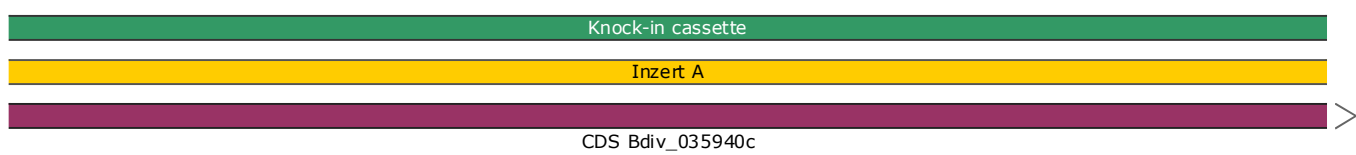
GCTCGTCGACGGAATGAGCATTAAATGATGTGTATGAACTTTACAGTCACCGcTTGGGCAAGGGCAGCTACGGCCAGGTGCTCAAAGCaTGCCACAGGGAGACTGGGGAAG
 CGAGCAGCTGCCTTACTCGTAATTAATACTACACATACTTGAAATGTGAGTGGCgAACCCGTTCCCGTCGATGCCGGTCCACGAGTTTCgtACGGTGTCCCTCTGACCCCTTC



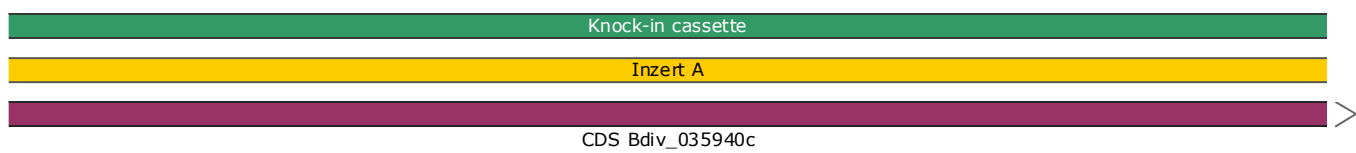
TGAAGGCGGTTAAAGTGATCAGGAAGGCGAGTATAGAGAAGCCATGCGGATGAAGCGCGAGATTGCTATCATGTAAGTTTAGAGCTAAAAACATTTAACCTGCCGAAGG
 ACTTCCGCCAATTTACTAGTCCTTCCGCTCATATCTCTGCGGTACGCTACTTTCGCGCTCTAACGATAGTACATTCAAATCTCGATTTTGTAAATTGGACGGCTTCC



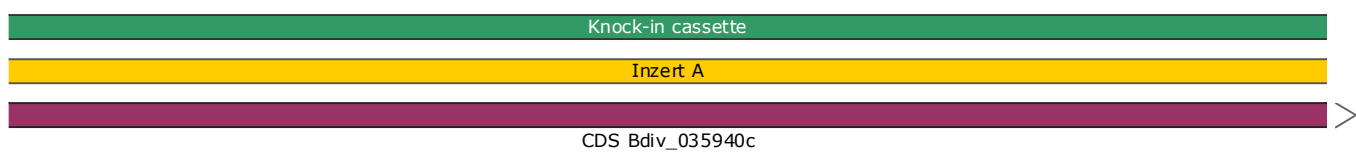
AAAACCTGAGATCATCCCAACATTGTAAGCTATTAGAAGGTACGAAGATGAAGAGTGCCTCTATCTCGTATGGAGATGTGCAGCGGCGGAGCTTTTGTGATGAGAT
 TTTTGAGACCTAGTAGGGTTGTAACATTTGATAATCTTACATGCTTCTACTTCTACGGAGATAGAGCACTACCTCTACACGTGCCCGCCGCTCGAAAACTACTCTA



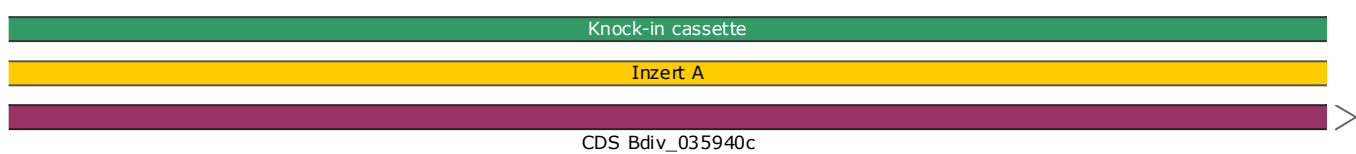
TGTAAGGCGCGGCTGTTTCAGTGAGGACTATGCCGCGACGGTAATGCGGCAGATCTTTTCTGCCATTTCTACTGCCACGGTAAGAGTATCTTGACCCGAGACCTCAAGC
 ACATTCGCGCCGACAAAGTCACTCCTGATACGGCCTGCCATTACGCGCTTAGAAAAGACGGTAAAGGATGACGGTGCATTCTCATAGAACGTGGCTCTGGAGTTCC



CTGAAAACATTTCTCTACGCAATAAAAAATAATGATTCGCCAATCAAGGTGATTGACTGGGGTTTGTCTACGAAATGCCGCAAGGCGCATAAATCCACACGTTGGTGGGC
 GACTTTTGAAGAGATGCGTTTATTTTATTACTAAGCGGTTAGTCCACTAACTGACCCCAAACGATGCTTACGGCGTTCGCGTATTTAAGGTGTGCAACCACCCG



ACACCATACTACGTAGCACCTGAGGTGTTACTTGGGAACACGACAAGAGTTGCGATATTTGGAGCGCTGGCGTCATTCTGTTTCATCATGCTTGTGGATACCCACCTTT
 TGTGGTATGATGCATCGTGGACTCCACAATGAACCTTGATGCTGTTCTAACGCTATAAACCTCGCGACCGCAGTAAGACAAGTAGTACGAAACCTATGGGTGGAAA





CCAACTAGACCTGTCTCTACCACATT
 Bab_15



AAAGTAAATTAAGTAAGGAcCCAAACGAGAAACGTGACCACATGGTTTTATTAGAATTCGTGACCGCCGCGGTATTACTCACGGAATGGATGAGCTTTATAAGCACTC
 TTTCAATTAATTCATTCCTgGGTTTGCCTTTGCACTGGTGTACCAAATAATCTTAAGCACTGGCGGCGCCATAATGAGTGCCTTACCTACTCGAAATATTTCTGTGAG

XhoI

4840

Knock-in cassette

Inzert A

205 210 215 220 225 230 235 240
 Glu Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Leu
 mEGFP+3xHA

GAGTATCCGTACGACGTCCCGGACTACGCTGGCTATCCCTATGATGTGCCGATTATGCGGGTTATCCGTACGATGTTCCAGATTATGCCTAAGCGGCCGATTGCTGTG
 CTCATAGGCATGCTGCAGGGCCTGATGCGACCGATAGGGATACTACACGGGCTAATACGCCAATAGGCATGCTACAAGGTCTAATACGGATTCCGCCGGCGTAACGACAC

NotI

Bab_183
 GCCTAAGCGGCCGA

4950

Knock-in cassette

Inzert A

Inzert B

245 250 255 260 265 270
 Glu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

mEGFP+3xHA

terminator CAM

overhang_inzert_B

overhang_inzert_A

Bab_182
 CGTAACGACAC

TACTGGACCGACGCGTTGGCCTCTGTAGCCTTGGTCTTCTGGTCATCATTTTCCCTGTTGCGCGTGATACTTTGCGTAATACGGCTTACCCTCTCGTTTCTCTCGCGCA
 ATGACCTGGCTGCGCAACC GGAGACATCGGAACCAGAAGACCAGTAGTAAAAGGGGACAAGCGCGACTATGAAACGCATTATGCCGAATGGGAGAGCAAAAGAGAGCGGT

5060

Knock-in cassette

Inzert B

terminator CAM

overhang_inzert_B

Bab_182
 ATGACCTGGC

TAGTAGTCGCATAGCGATTGATATAGTTGTTGATGTTCAAACCTTATGCCTCACGCTCTCCTTGATGGAGGTGAGATCGCATCCTCGGTTGGCTTAGGTACTC
 ATCATCAGCGTATCGCTAAACTATATCAACAACATAAAGTTTGAATACGAGTGCAGAGGAACACTCCACTTAGCGTAGGAGCAACCGAAGTCAATCCATGAG

5170

Knock-in cassette

Inzert B

terminator CAM

ATCCGCGACCTTAACAAGTCTATGAGCAGGGTGTACTTCCCACTCGGTTTTGCCGGTTCAGGCTCCTTTTTGCGCGATGTGTGCCGTAAGACAGGCAGCTAATGT
 TAGGCGCTGGAATTGTTCAGGATACTCGTCCACATGAAGGGTGTGACCAAAAACGGCCAAAGTCCGAGGA AAAACGCGCTACACACGGGCATTCTGTCCGTCGATTACA

5280

Knock-in cassette

Inzert B

terminator CAM

ACAGGTGTGTAGGCGCCGATGCGTGGGAGCTCAGCGCATCGCCACGTGATTTGATCACGCGGCTAATTTATGCTTAACCATCACGCTAGCGACGGCGAAAACGCCGA
 TGTCACACATCCGCGGCTACGCACCCTCGAGTCGCGTAGCGGTGCACATAAAGTGTGCGCGAATTAATACGAATTGGTAGTGCAGATCGCTGCCGCTTTTGGCGCT

5390

Knock-in cassette

Inzert B

terminator CAM

73

Bab_100
 CTACGGTGAGATAGT GTATGTGCCAAATAC

CCAAGTGTTTATTTATGGGGTCTGCCTTTGGCGCTGGTTGATAGGATTAAGGGTACATTTACTACGGTGAGATAGTTGTGTAACCAAACTACTATTTGATTTTCGTATAATG
 GGTTCACAAAATAAATACCCAGACGGAACCGGACCAACTATCCTAATTCCTATGTAATGATGCCACTCTATCAACACATTGGTTTATGATAAACTAAAGCATATTAC

5500

Knock-in cassette

Inzert B

terminator CAM

AgeI

TGTTCGAACCGGCATCTGAACCGGTGTTTGGCACTGTTGCTCCGCCAGGTGAAGTTACGTAGTCTTATAATGCTGATCAAAGGAACACTTGTGAAGCTCCTGTGCCCC
 ACAAGCTTGCCGTAGACTTGGCCACAAACCGTGACAACGAGGCGGGTCCACTTCAATGCATCAGAATATTACGACTAGTTTCTTGTGAACAACTCGAGGACACGGGG

5610

Knock-in cassette

Resistance cassette

Inzert B

terminator CAM

ef-tgtp_promoter

GTCATATCTTTTACGGGTGTTATTTTAGCGAATTAGTTTATTACCTGTATGGGTGGTACTGCGCCTTGCGGTCCCAACAAGCGTCTCTATTATAGTGGCATGACT
 CAGTATAAGAAAAGTGCCCAAAATAAAATCGCTTAATCAAATAAATGGACATACCACCATGACGCGGAACGCCAAGGGTTGTCGCAGAGATAATATCACCGTACTGA

5720

Resistance cassette

Inzert B

ef-tgtp_promoter

ACCACGATTAGTTTAGATTCTGCGATTATTTATCAGACATGTGTATGTCGAGTAGGTGTTTCATATCTTTTCGTTTTATCGTTTGCCTTATAGTCACGCGTTACTCCTC
 TGGTGCTAATCAAATCTAAGACGCTAATAAAGTAGCTCTGTACACATACAGCTCATCCACAAAGTATAGAAAAGCAAATAGCAACGCAAATATCAGTGCGCAATGAGGAG

5830

Resistance cassette

Inzert B

ef-tgtp_promoter

TCTGTGCGAGTTCGTTTCATTGATGCTATCCGTACGCGGTATAACTAGAACGTGCACATAGTGTATATATATATTATTTATGTACATTCGTATTAGGGCGCAATATTTG
 AGACACGCTCAAGCAAGTAACATACGATAGGCGAGTCCGCATATTGATCTTGCACGTGTATCACAATATATAATAAATACATGTAAGCATAATCCCGGTTATAAAC

5940

Resistance cassette

Inzert B

ef-tgtp_promoter

TCTCCTGGCGTGGGTGTTTGTCTTCTTGGCTGGAGGACAGCTCTGTGCCTTGATGTTATACGTCTGCCTTATATATGCGCCGCGGTTTCGATGTTATGTGAGATATAGTT
 AGAGGACCGCACCCACAAACAAAGAGAACCAGCTCCTGTGAGACACGGAACACTACAATATGACAGACGGAATATATACGCGGCGCAAGCTACAATACACTCTATATCAA

6050

Resistance cassette

Inzert B

ef-tgtp_promoter

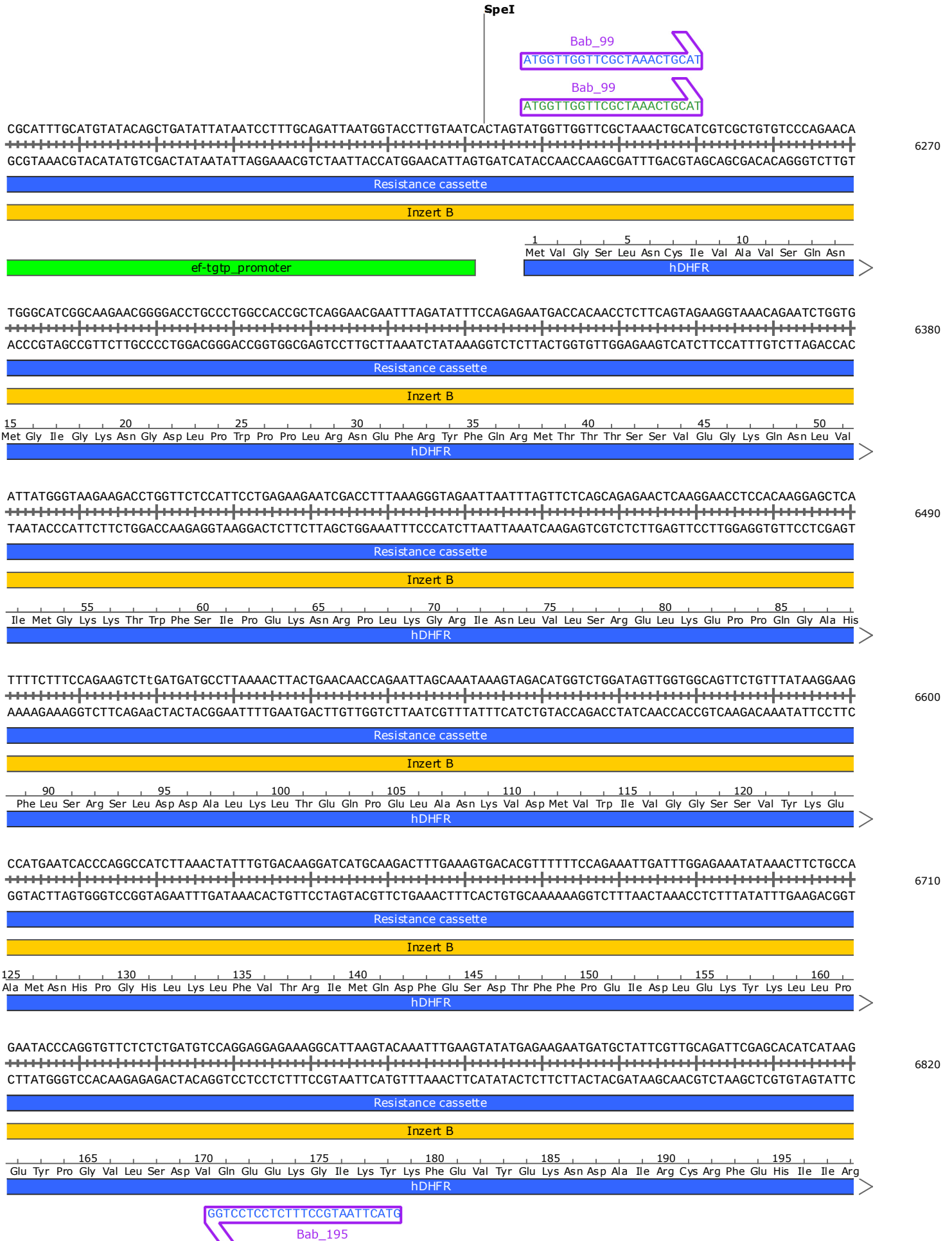
CCATATTAACGATAACAATAGCCTATATCGCCATTACATTTTCTACTCCGGTATAATTACTGTAATATGCGTTCTTACGTTTACATCTTGTGTACTGTAATAAACCT
 GGTATAATTGCTATGTTATCGGATATAGCGGTAATGTAAGGATGAGGCCATTAATATGACATTATACGCAAGAAGTGCAAATGTAGAACACATGACATTATTTGGA

6160

Resistance cassette

Inzert B

ef-tgtp_promoter





TGTTTCAAGTGTGATAAGCTATTCTGATATCCAGCCCCGTGTTGATTATTACGGAGCTCAGCCCTTGTGAACATGTTTGGTTTCATGATAGCCAAACCCTAATGGG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACAAAGTTCACACTATTCGATAAGACTATAGGTCGGGGCACAACATAATAAGTGCCTCGAGTCGGGAAGACACTTGTACAACCAAAGTACTATCGGTTTGGGATTACCC
 7700

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT

GAAATAATATTGTTTACGACGGAAGAATGCTTGTGCACTCAATAGCTACCGTGATTTTCATTGCTCACCACATCTCGAATGGTAGGATGCAACGGTTTCGTTTCGTGG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTATTATAACAAAATCTGCCTTTCTTACGAACGACGTGAGTTATCGATGGCACTAAAAGTAAGCAGTGGTGTAGAGCTTACCATCTACGTTGCCAAAGCAAAGCACC
 7810

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT

ATCACGATGTTCAGGAGCAGCAAAC TAGCGTCAGACGCTCGCAGGTCAGCGAACGAGGTTAGCGTTACCAAATCCGCTTCTCACTTGTGCTAGCTGAGCCGCCGCTTAGT
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGTGCTACAAGTCCCTCGTCGTTGATCGCAGTCTGCGAGCGTCCAGTCGCTTGCTCCAATCGCAATGGTTTAGGCAGAAGTGAACAGCATCGACTCGGGCGCAATCA
 7920

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT

TGCAACCTCCGCTGTATTACCGTGATGAGATTGGGACCAACTACGTTGCATCGGACGTCGCATCCTTACGGAGGAGCTCGTGCCAGGTTCTGGTACGAGGGCCACAG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGTTGGAAGGCGACATAATGGCACTACTCTAACCCCTGGTTGATGCAACGTAGCCTGACGCTAGGAAGTGCCTCCTCGAGCGACGGTCCAAGACCATGCTCCCGGTGTC
 8030

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT

TGATTACGACTTCCAGGAAGGTGGGTTACGAGAGTTAATAGTGTGTTGACCATCATTGCAGGCGGTCTGAGAACCCTAATCCCAATGTTTGTGCTTTACGCAGCTCGTT
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTAATGCTGAAGGTCCTTCCACCCAATGCTCTCAATTATCACAAACTGGTAGTAACGTCGCCAGGACTCTTGGCATTAGGGTTACAAAACAGCAAATGCGTCGAGCAA
 8140

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT

TGGAAGTCTCAAAGGTACCTTAGCACTCCCTGTTACATATTATATATGCCACAGGATGTTGGTTGCGGAGTTGCTTGTGCGATAAAGGAGCGGTTGATCCTTGTCTGTC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCTTCAGGAGTTTCCATGGAATCGTGAGGGACAATGTATAATATACGGTGTCTACAACCAACGCCCAACGAACGACGCTATTCTCGCCAAC TAGGAACAGACAG
 8250

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

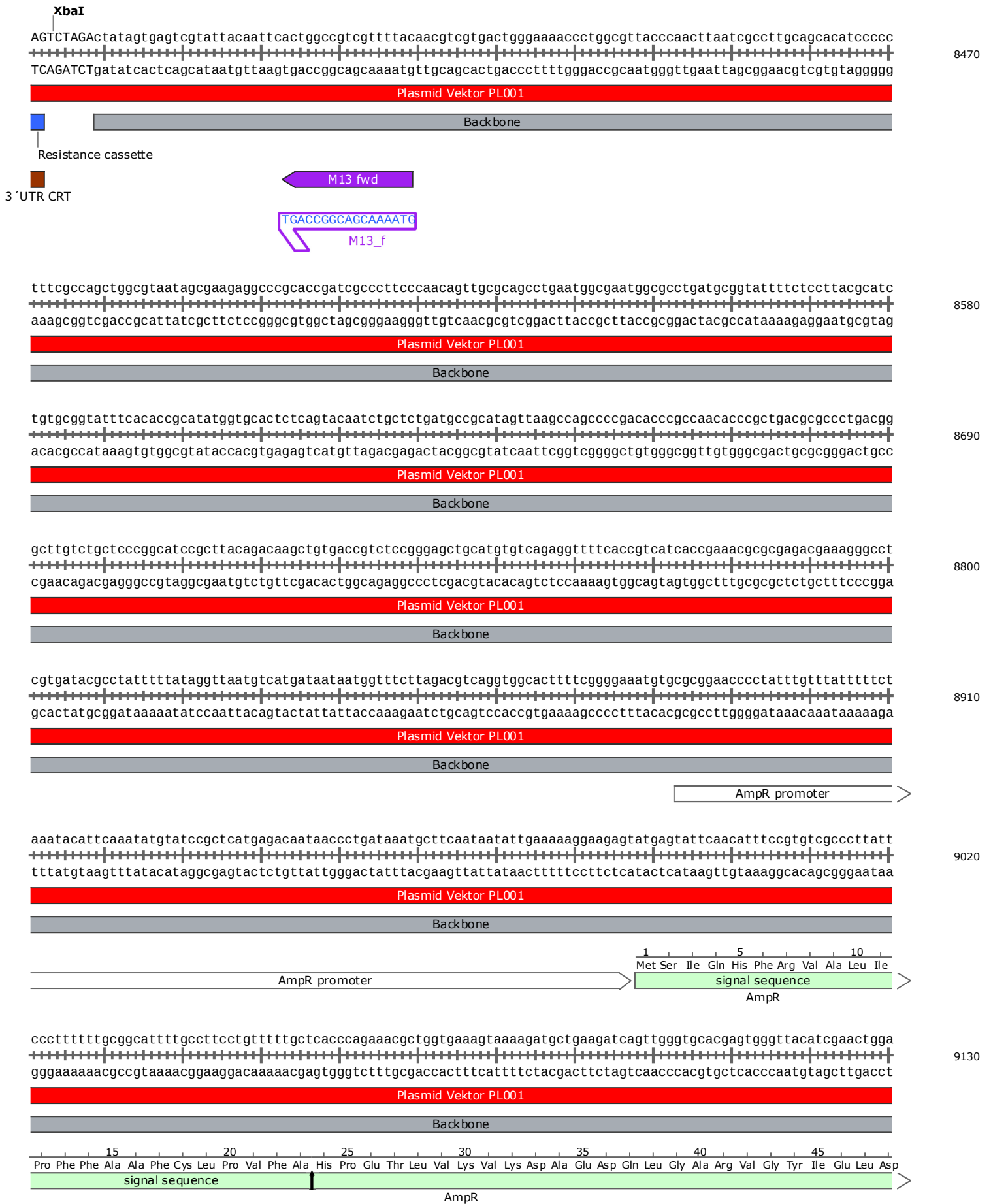
3' UTR CRT

GTTTTACCCAGCTGGAAACATACAGGGTATGCTATGCTAGTGTGCTAATGACATATTTATAGGCTACTATACACAGAACGTCCTTGAGAAGGTAAGTCACACTCCCTT
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAAAGTGGGTCGACCTTTGTATGTCCCATACGATACGATCACACAGATTACTGTATAAATATCCGATGATATGTGCTTTCGAGGAACTCTCCATTCAAGTGTGAGGGAA
 8360

Plasmid Vektor PL001

Resistance cassette

3' UTR CRT



tctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgattgacgcc
 agagtgtcgccatcttaggaactctcaaaagcgggctcttgcaaaaggttactactcgtagaaatttcaagacgatacaccgcgcataatagggcataactgccc

9240

Plasmid Vektor PL001

Backbone

50 55 60 65 70 75 80
 Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Ile Asp Ala

AmpR

ggcaagagcaactcggctcgcgcacatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtacagaaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgc
 ccgttctcgttgagccagcggcgtatgtgataagagttctactgaaccaactcatgagtggtcagtgcttttctgtagaatgcctaccgtactgtcattctcttaaacg

9350

Plasmid Vektor PL001

Backbone

85 90 95 100 105 110 115 120
 Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys

AmpR

agtgtgccataaccatgagtgataaacctgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaac
 tcacgacggtattggtactcactattgtgacccggtgaaatgaagactgttgctagcctcctggcttctcgtatggcgaaaaaacgtgtgtacccttagtacattg

9460

Plasmid Vektor PL001

Backbone

125 130 135 140 145 150 155
 Ser Ala Ala Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr

AmpR

tcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatgccaacaacgttgcgcaaactattaactggcg
 agcggaaactagcaacccttggcctcgacttacttcggtatggtttgctgctgcactgtggtgctacggacatcgttacggtgttgaacgcgcttgataatgaccgc

9570

Plasmid Vektor PL001

Backbone

160 165 170 175 180 185 190
 Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Val Ala Met Pro Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly

AmpR

aactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggctgggttatgtctgat
 ttgatgaatgagatcgaaggccgtgttaattatctgacctacctcgcctatttcaacgtcctggtgaagacgcgagccgggaaggccgaccgaccaaataacgacta

9680

Plasmid Vektor PL001

Backbone

195 200 205 210 215 220 225 230
 Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp

AmpR

aaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtagtatctacacgacggggagtcaggcaactat
 tttagacctcggcactcgcaccagagcgcctatagtaacgtcgtgacccggcttaccattcgggagggcatagcatcaatagatgtgctgcccctcagtcggttgata

9790

Plasmid Vektor PL001

Backbone

235 240 245 250 255 260 265
 Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met

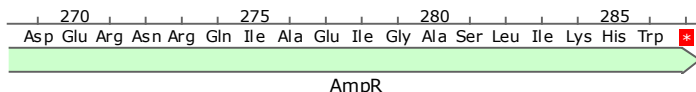
AmpR

ggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgatgaagcatggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaacttcatt
cctacttgccttatctgtctagcgactctatccacggagtgactaatcgtaaccattgacagctcgggtcaaatgagtatatatgaaatctaactaattttgagtaa

9900

Plasmid Vektor PL001

Backbone



tttaattaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatccttaacgtgagtttctgctccactgagcgtcagaccctgagaaaagatcaaa
aaattaaatttctctagatccacttctaggaaaaactatagagtactggtttagggaattgactcaaaagcaagggtgactcgcagctcggggcatctttctagttt

10 010

Plasmid Vektor PL001

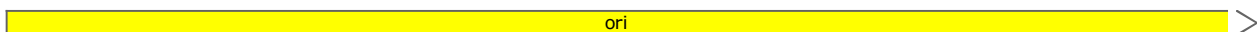
Backbone

ggatcttcttgagatcctttttctgcgtaaatctgctgcttgaacaaaaaacaccgcgtaccagcgggtgtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttt
cctagaagaactctaggaaaaaagacgcatagacgacgaacgttgttttttggggcgtggtcgcaccaaacaacggcctagtctcgatggttgagaaaa

10 120

Plasmid Vektor PL001

Backbone



tccgaaggaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacataacctcg
aggcttcattgaccgaagtcgtctcgcgtctatggtttatgacaagaagatcacatcggcatcaatccgggtggaagtcttgagacatcgtggcggatgtatggagc

10 230

Plasmid Vektor PL001

Backbone



ctctgctaactctgttaccagtgctgctgccagtgccgataagctgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagtaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacg
gagcagattaggacaatggtcaccgacgacggtcaccgctattcagcacagaatggccaacctgagttctgctatcaatggcctattccgctcgcagcccgacttgc

10 340

Plasmid Vektor PL001

Backbone



gggggttcgtgcacacagccagcttgagcgaacgacctacacgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaagggagaaaggcgga
ccccaagcagctgtgctgggtcgaacctcgttctgctggatgtggcttgactctatggatgctgcactcgatactcttctcgggtgcaagggcttccctcttccgcct

10 450

Plasmid Vektor PL001

Backbone



caggatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcagagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttccggacccttctgacttg
gtccataggccatcgcggtcccagccttctcctctcgcgtgctccctcgaaggtcccccttctcggaccatagaaatcaggacagcccaagcgggtggagactgaac

10 560

Plasmid Vektor PL001

Backbone



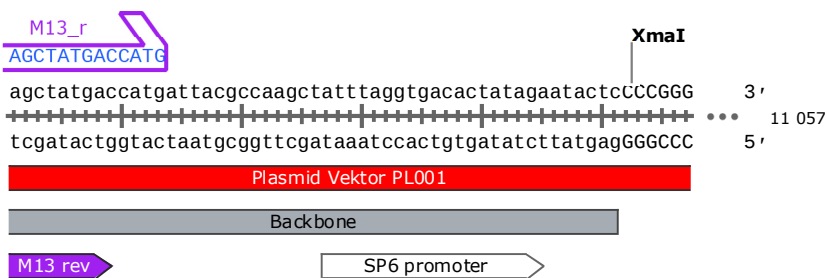
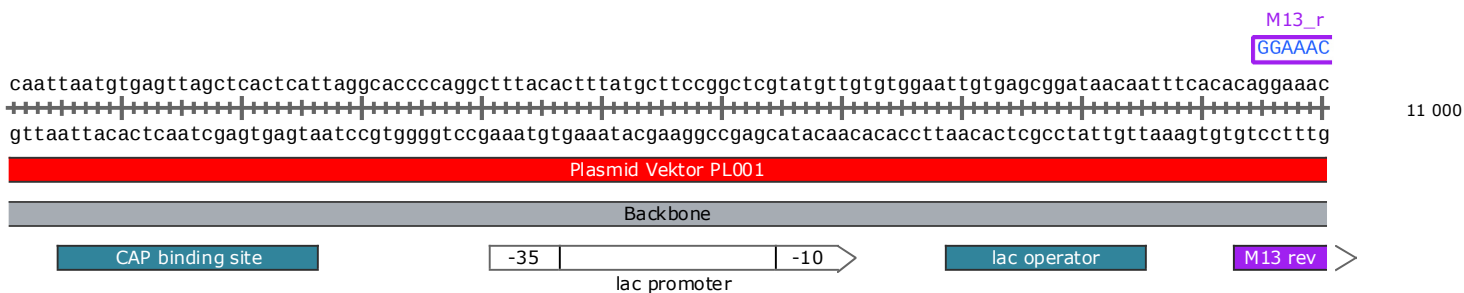
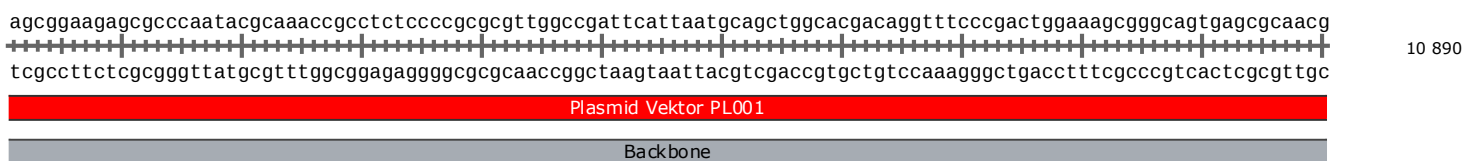
agcgtcgatTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGGCTTTTGTGGCTTTTGTCCACATGTT
TCGCAGTAAAACACTACGAGCAGTCCCCCGCTCGGATACCTTTTGGGTCGTGCGCCGGAAAATGCCAAGGACCGAAAACGACCGAAAACGAGTGTACAAG

10 670

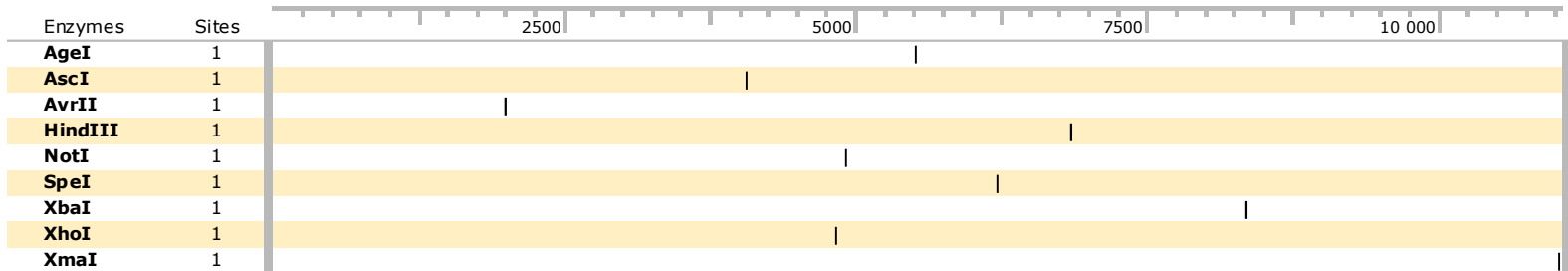
Plasmid Vektor PL001

Backbone





Enzymes	Sites	
AgeI	1	5520
AscI	1	4083
AvrII	1	2003
HindIII	1	6861
NotI	1	4935
SpeI	1	6222
XbaI	1	8363
XhoI	1	4838
XmaI	1	11 052

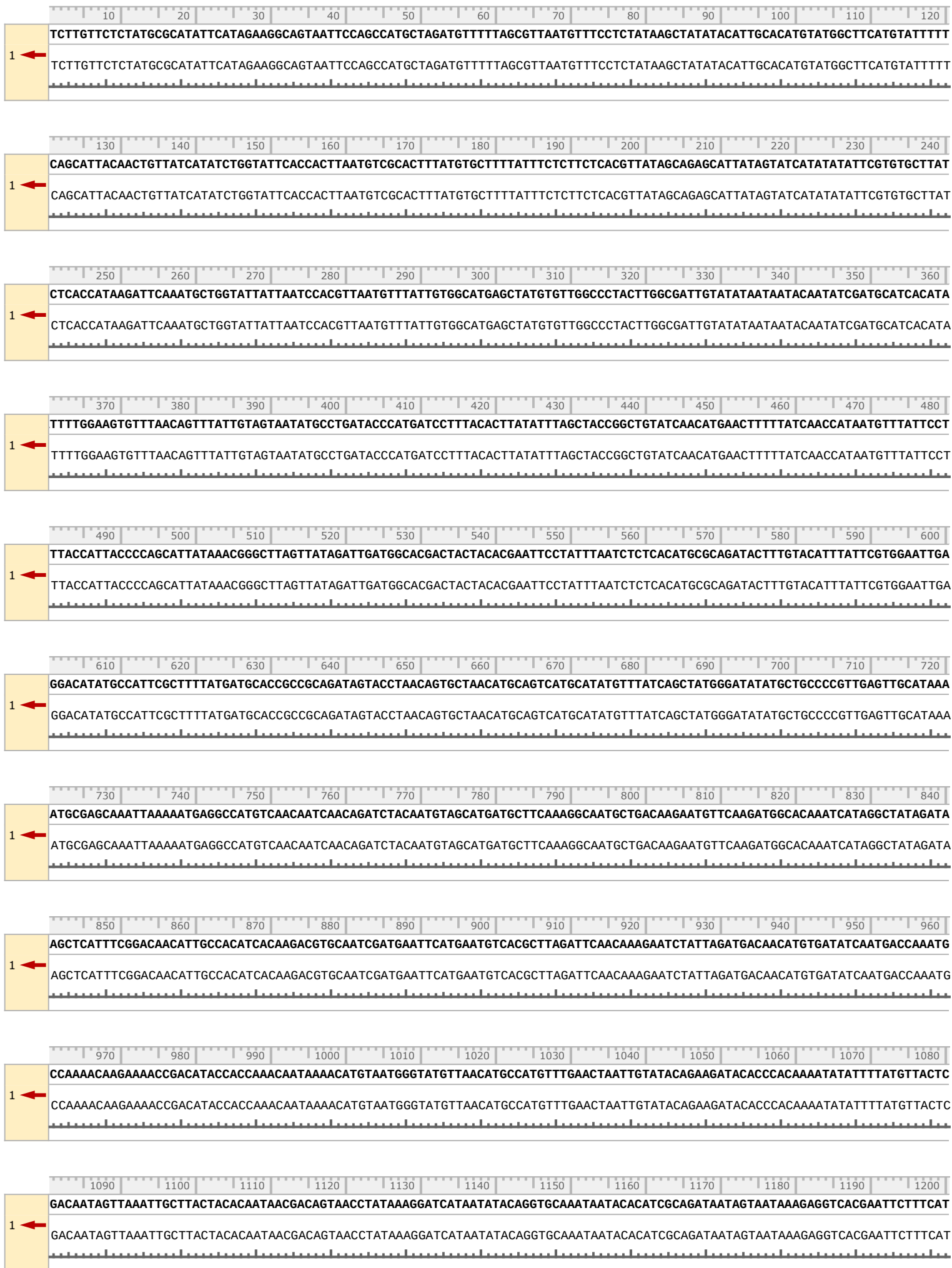


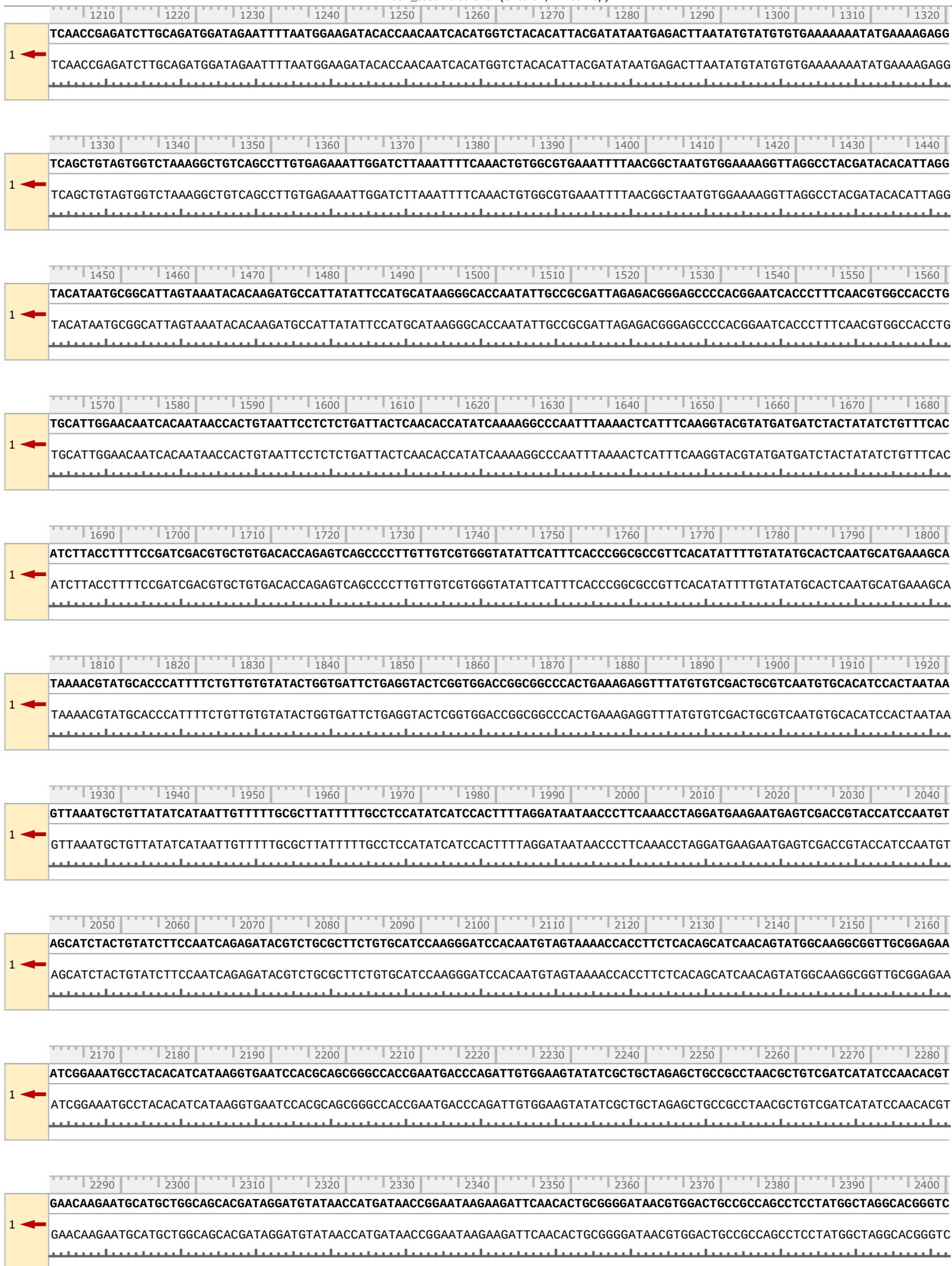
Feature	Location	Size	Color	Symbol	Type
✓ Knock-in cassette	1 .. 5519	5519 bp	Green	⎓	misc_feature
✓ 5' UTR Actin	1 .. 2002	2002 bp	Orange	⎓	misc_feature
✓ overhang_AvrII_5ACT	1985 .. 2008	24 bp	Grey	⎓	misc_feature
✓ Inzert A	2009 .. 4941	2933 bp	Yellow	⎓	misc_feature
✓ CDS Bdiv_035940c	2009 .. 4081	2073 bp	Purple	➔	CDS
▶ 2 segments = 2037 bp					
✓ intron	2824 .. 2859	36 bp	Black	⎓	intron
✓ GGGGS-linker	4091 .. 4105	15 bp	Cyan	➔	CDS
/locus_tag = GGGGS-linker /label = GGGGS-linker /translation = GGGGS 5 amino acids = 333,3 Da					
✓ GGGGS-linker	4106 .. 4120	15 bp	Cyan	➔	CDS
/locus_tag = GGGGS-linker(1) /label = GGGGS-linker(1) /translation = GGGGS 5 amino acids = 333,3 Da					
✓ mEGFP+3xHA	4121 .. 4930	810 bp	Light Green	➔	CDS
/locus_tag = mEGFP /label = mEGFP /translation = MSKGEELFTGVVPIVLVELDGDVNGHKFVSVEGEGDADYTKLTLKFICTTGKLPVWPVTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT RAEVKFEGLTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNVNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSTQSKLSKDPNEKRD HMLLEFVTAAGITHGMDLYKALEYYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYA 270 amino acids = 30,6 kDa					
✓ HA epitope (1)	4844 .. 4870	27 bp	Purple	➔	CDS
/note = note="HA" - complement(5968..5994) /translation = YPYDVPDYA 9 amino acids = 1,1 kDa					
✓ HA epitope (2)	4874 .. 4900	27 bp	Purple	➔	CDS
/translation = YPYDVPDYA 9 amino acids = 1,1 kDa					
✓ HA epitope (3)	4904 .. 4930	27 bp	Purple	➔	CDS
/translation = YPYDVPDYA 9 amino acids = 1,1 kDa					
✓ overhang_inzert_A	4928 .. 4941	14 bp	Grey	⎓	misc_feature
✓ Inzert B	4942 .. 6860	1919 bp	Yellow	⎓	misc_feature
✓ terminator CAM	4942 .. 5519	578 bp	Cyan	⎓	misc_feature
✓ overhang_inzert_B	4942 .. 4960	19 bp	Grey	⎓	misc_feature
✓ Resistance cassette	5526 .. 8362	2837 bp	Blue	⎓	misc_feature
✓ ef-tgt_p_promoter	5526 .. 6221	696 bp	Green	⎓	misc_feature
✓ hDHFR	6228 .. 6860	633 bp	Blue	➔	CDS
/translation = MVGSLNLCIVAVSQNMGIKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELAN KVDMMWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKNDIAIRCFEHIIRNQIVFGTYTISP* 210 amino acids = 24,2 kDa					
✓ Plasmid Vektor PL001	6861 .. 2008	6205 bp	Red	⎓	misc_feature
✓ overhang_HindIII_3CRT	6861 .. 6886	26 bp	Grey	⎓	misc_feature
✓ 3' UTR CRT	6867 .. 8362	1496 bp	Orange	⎓	misc_feature
✓ Backbone	8369 .. 11 051	2683 bp	Grey	⎓	misc_feature
✓ M13 fwd	8393 .. 8409	17 bp	Purple	←	primer_bind
/note = common sequencing primer, one of multiple similar variants					
✓ AmpR promoter	8883 .. 8987	105 bp	White	➔	promoter
/gene = bla					
✓ AmpR	8988 .. 9848	861 bp	Light Green	➔	CDS
▶ 2 segments					
/gene = bla /product = β-lactamase /note = confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics /translation = MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFA, HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLSNGKILESRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVT EKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFHNMGDHVTLRDRWPELNEAIPNDERDRTMPVAMPTTLRKLTLGELLTLASRQLIDWMEADKVA GPLLRSLPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIIVYITTSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW* 286 amino acids = 31,6 kDa					

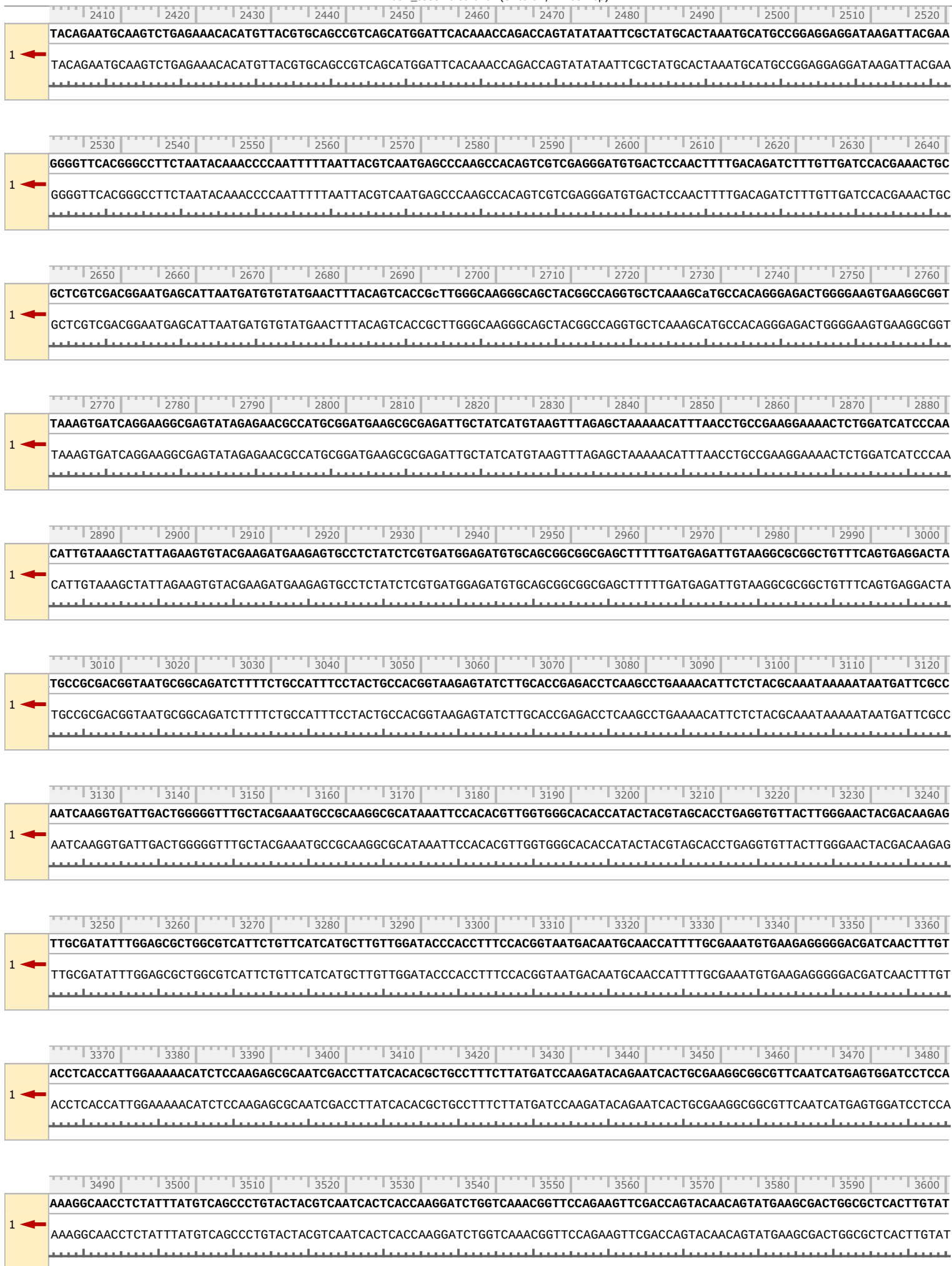
Feature	Location	Size			Type
✓ ori	10 019 .. 10 607	589 bp			rep_origin
/direction = RIGHT					
/note = high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication					
✓ CAP binding site	10 895 .. 10 916	22 bp			protein_bind
/bound_moiety = <i>E. coli</i> catabolite activator protein					
/note = CAP binding activates transcription in the presence of cAMP.					
✓ lac promoter	10 931 .. 10 961	31 bp			promoter
▶ 3 segments					
/note = promoter for the <i>E. coli lac</i> operon					
✓ lac operator	10 969 .. 10 985	17 bp			protein_bind
/bound_moiety = <i>lac</i> repressor encoded by <i>lacI</i>					
/note = The <i>lac</i> repressor binds to the <i>lac</i> operator to inhibit transcription in <i>E. coli</i> . This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).					
✓ M13 rev	10 993 .. 11 009	17 bp			primer_bind
/note = common sequencing primer, one of multiple similar variants					
✓ SP6 promoter	11 027 .. 11 045	19 bp			promoter
/note = promoter for bacteriophage SP6 RNA polymerase					

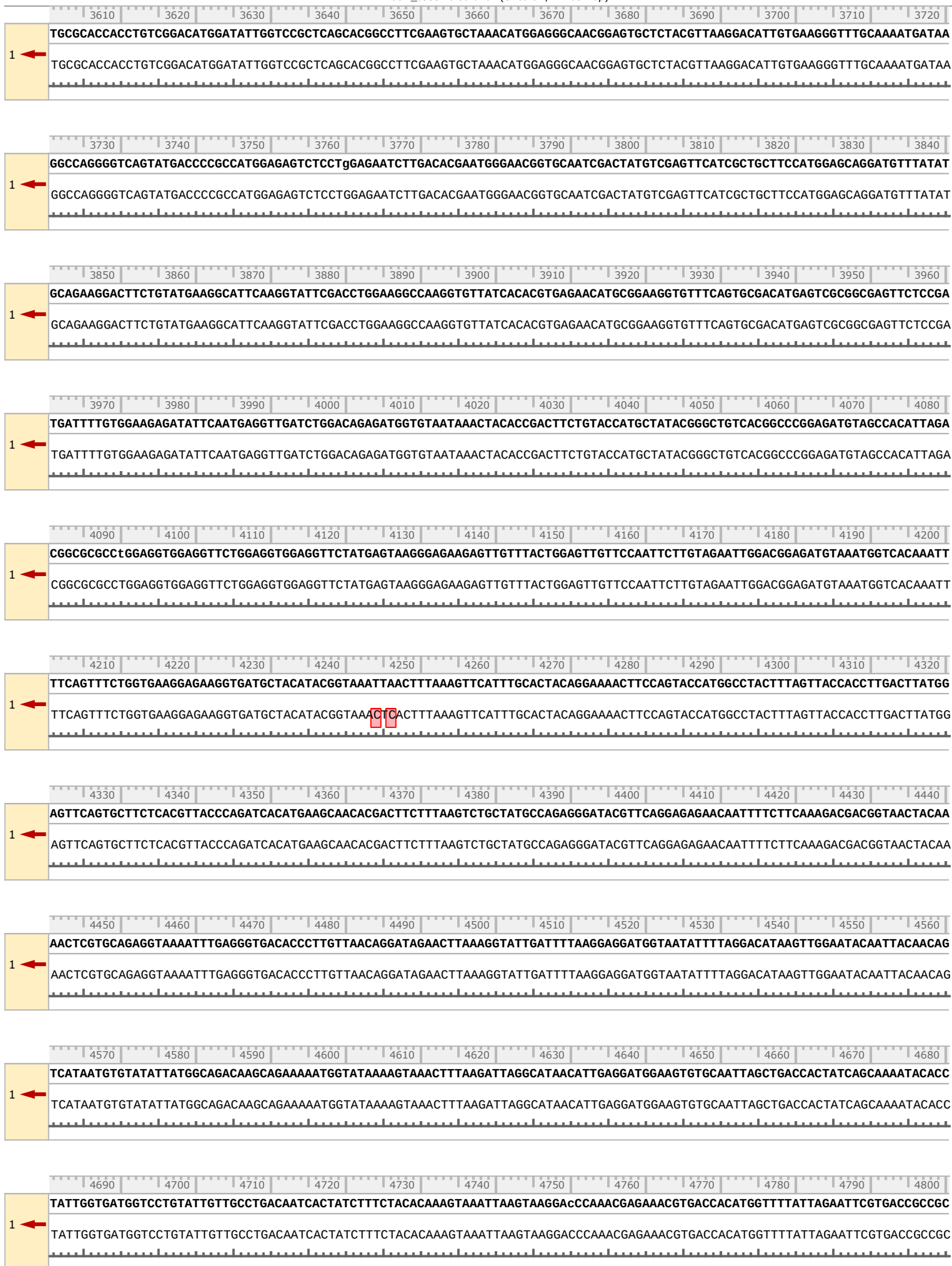
Primer	Length	Binding Sites	Tm	Date Added
✓ Bab_181	36-mer	1985 .. 2020	61°C	čtvrtek 28. bře 2024
/sequence =	GGATAATAACCCCTTCAAACCTAGGATGAAGAATGAG 39% GC / 11 134,4 Da			
✓ Bab_14	25-mer	2054 .. 2078	60°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	TCTTCCAATCAGAGATACGTCTGCG 48% GC / 7617,0 Da			
✓ Bab_96	20-mer	2223 .. 2242	53°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	GTGGAAGTATATCGCTGCTA 45% GC / 6172,1 Da			
✓ Bab_97	22-mer	2313 .. 2334	53°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	TTCCGGTTATCATGGTTATACA 36% GC / 6715,5 Da			
✓ Bab_15	26-mer	3988 .. 4013	60°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	TTACACCATCTCTGTCCAGATCAACC 46% GC / 7810,1 Da			
✓ Bab_46	25-mer	4205 .. 4229	59°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	CATCACCTTCTCCTTACCAGAAAC 48% GC / 7465,9 Da			
✓ Bab_44	21-mer	4705 .. 4725	54°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	GCCTGACAATCACTATCTTTC 43% GC / 6316,2 Da			
✓ Bab_183	15-mer	4928 .. 4942	62°C	čtvrtek 28. bře 2024
/sequence =	GCCTAAGCGGCCGCA 73% GC / 4563,0 Da			
✓ Bab_182	21-mer	4940 .. 4960	61°C	čtvrtek 28. bře 2024
/sequence =	CGGTCCAGTACACAGCAATGC 57% GC / 6400,2 Da			
✓ Bab_100	30-mer	5452 .. 5466 6831 .. 6860	45°C 61°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	CTACGGTGAGATAGTGTATGTGCCAAATAC 43% GC / 9270,1 Da			
✓ Bab_99	23-mer	6228 .. 6250	60°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	ATGGTTGGTTCGCTAAACTGCAT 43% GC / 7069,7 Da			
✓ Bab_99	23-mer	6228 .. 6250	60°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	ATGGTTGGTTCGCTAAACTGCAT 43% GC / 7069,7 Da			
✓ Bab_195	25-mer	6737 .. 6761	59°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	GTACTTAATGCCTTCTCCTCTGG 48% GC / 7550,0 Da			
✓ Bab_184	33-mer	6853 .. 6885	59°C	čtvrtek 28. bře 2024
/sequence =	CATTAAATCTGATATCGAAAAGCTTCTACGGTG 36% GC / 10 135,7 Da			
✓ M13_f	17-mer	8393 .. 8409	56°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	GTAAAACGACGGCCAGT 53% GC / 5228,5 Da			
✓ M13_r	19-mer	10 995 .. 11 013	52°C	středa 3. dub 2024
/sequence =	GGAAACAGCTATGACCATG 47% GC / 5845,9 Da			

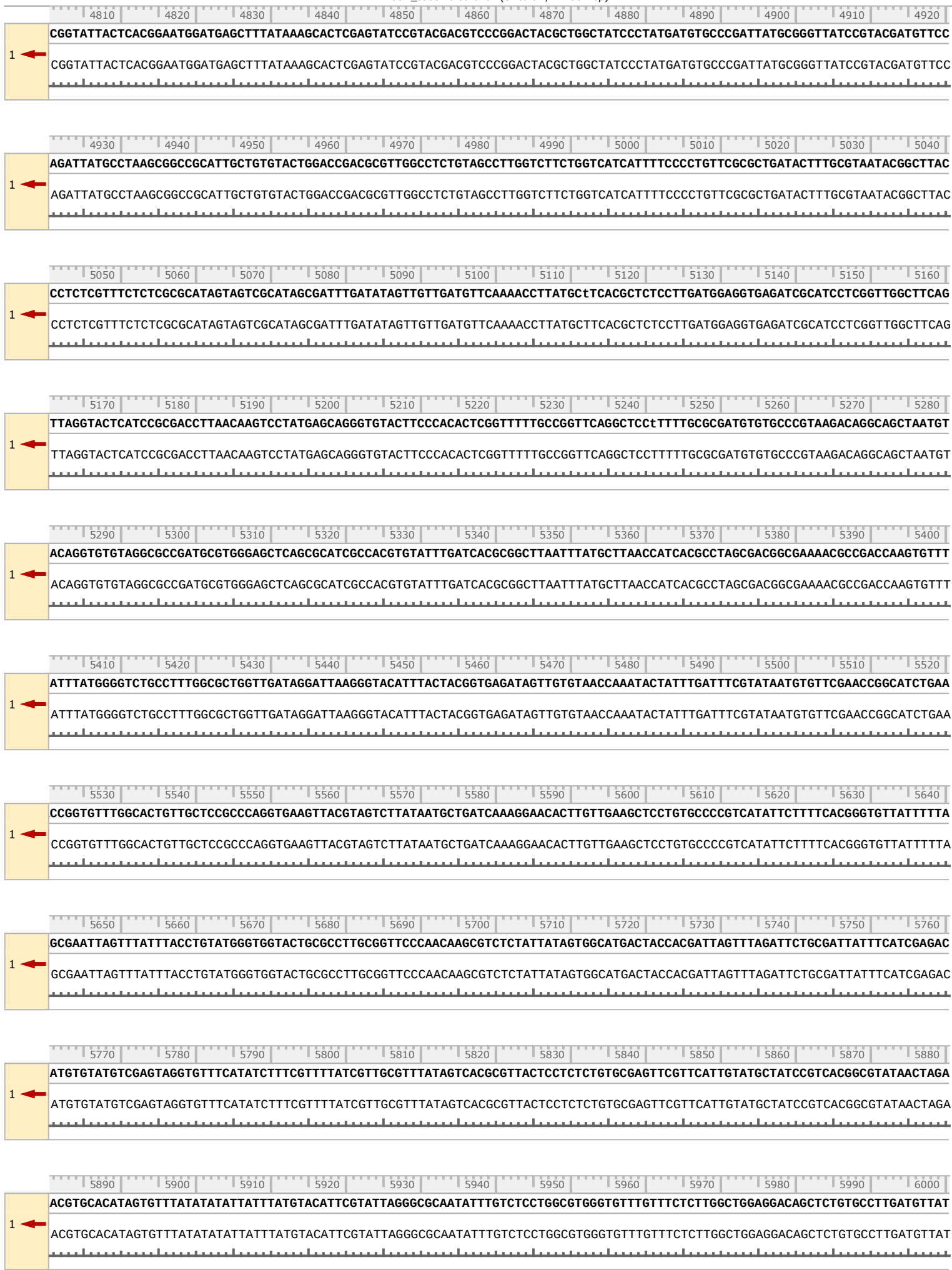
Příloha č. 3 – Aligment sekvence *in silico* klonování se sekvencí plasmidu z pozitivní kolonie

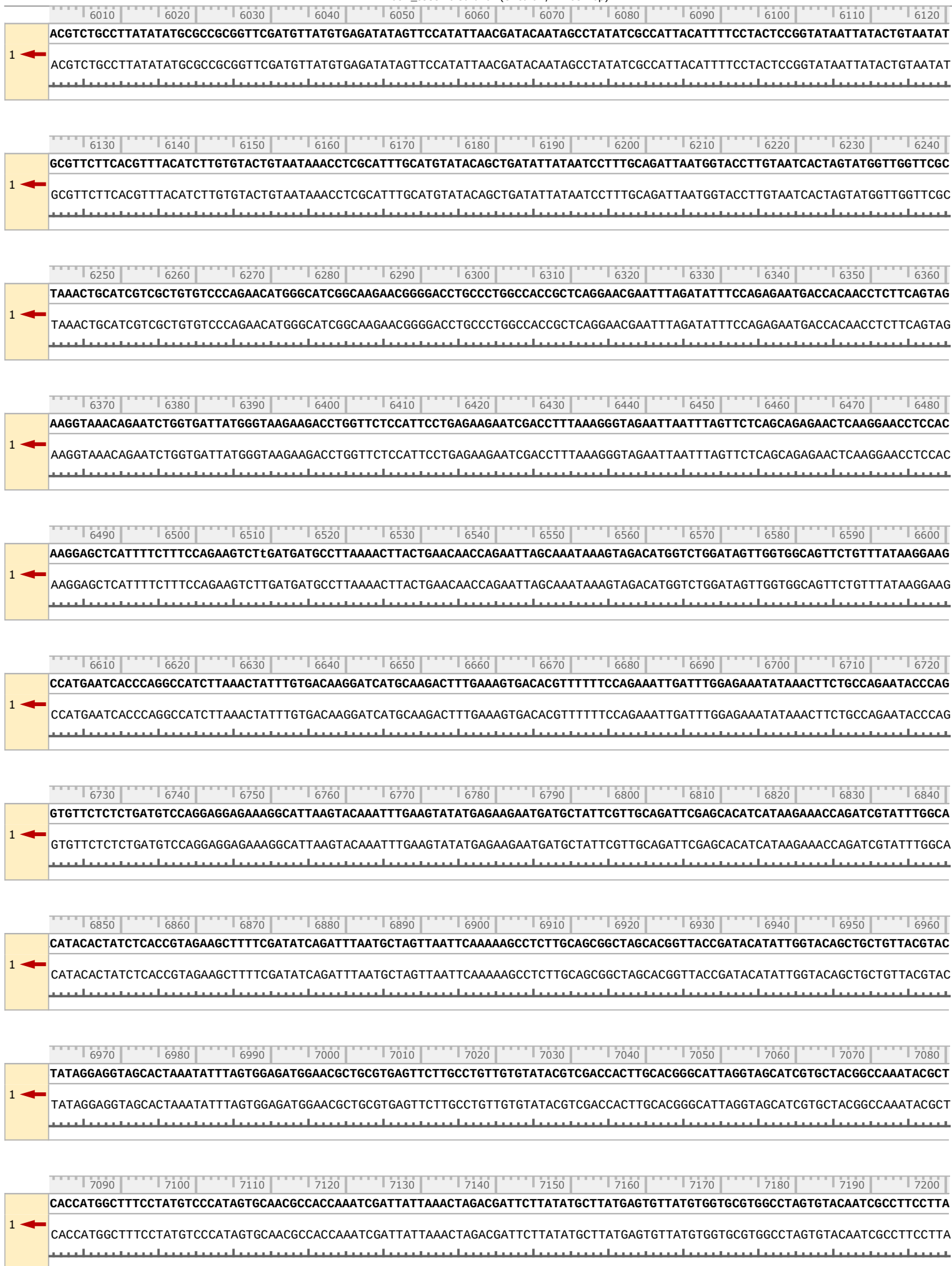


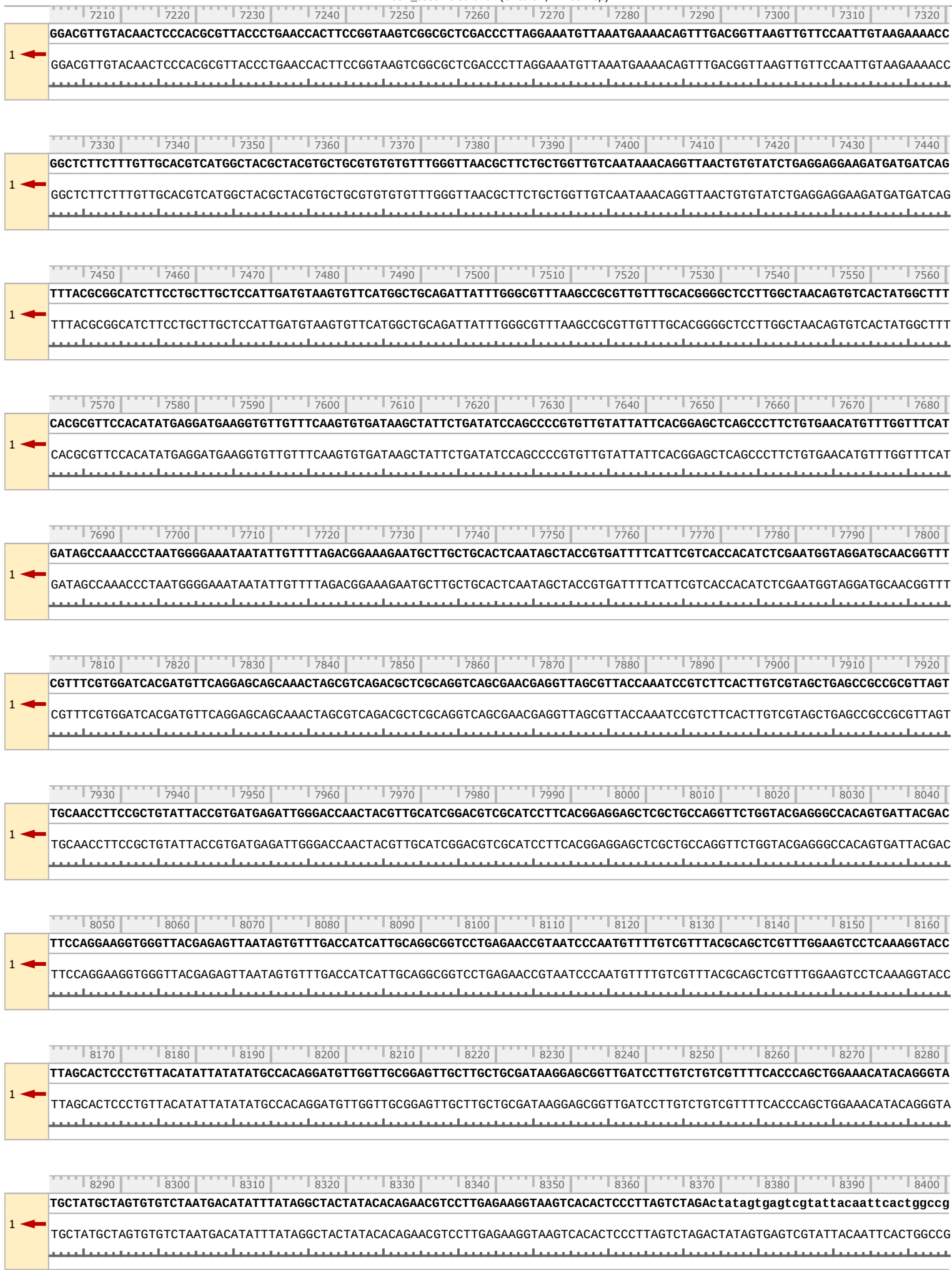


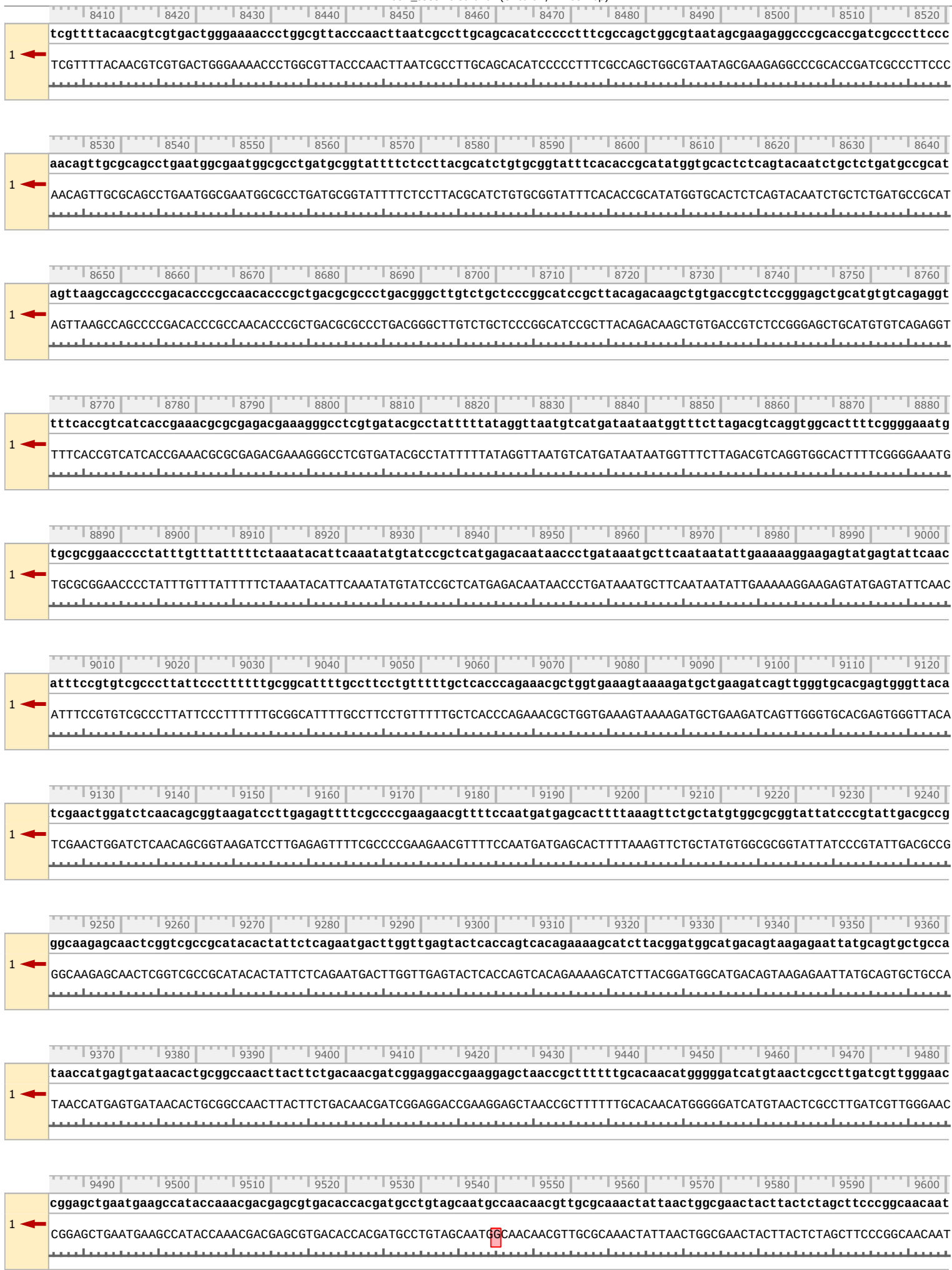


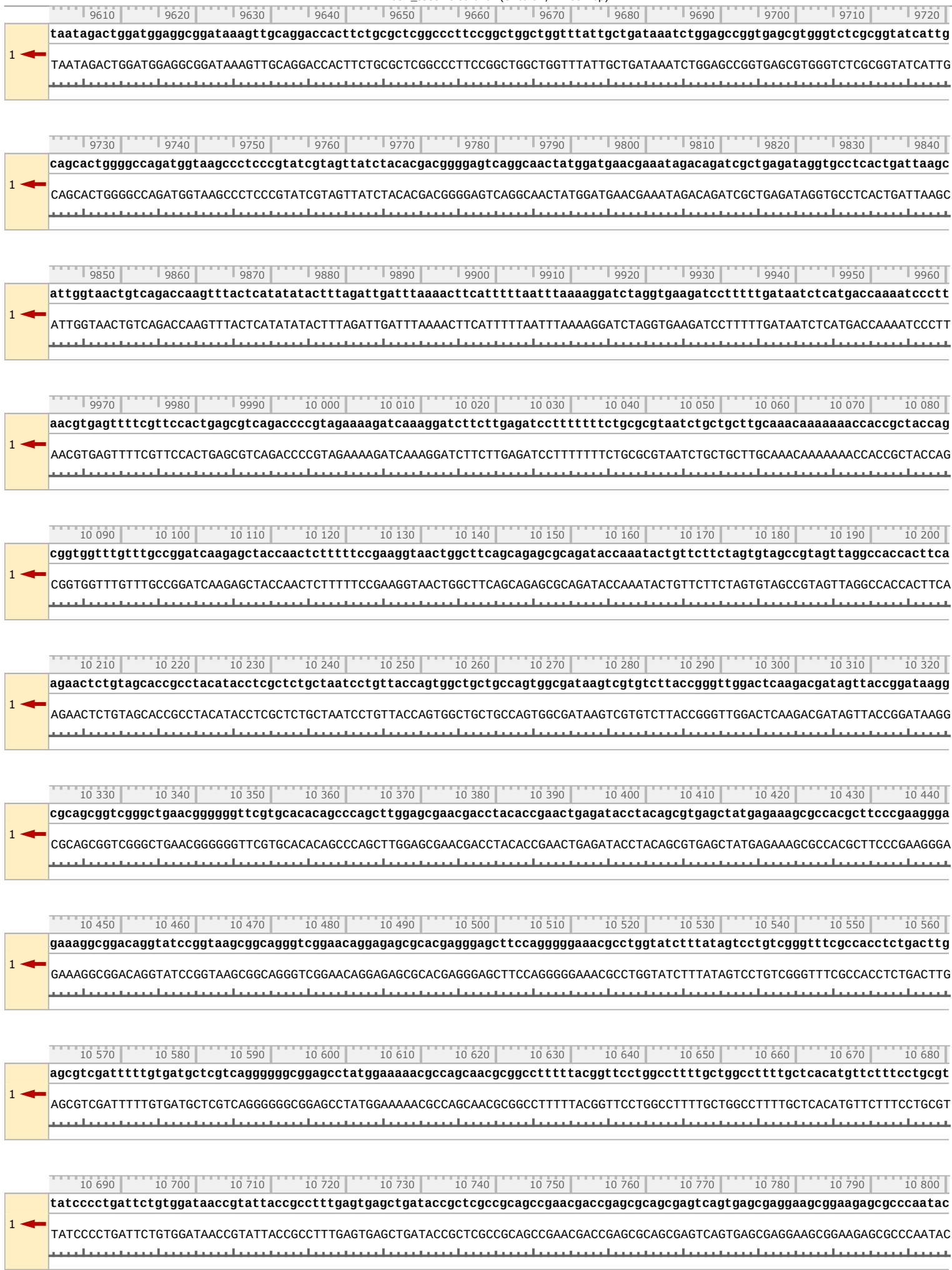


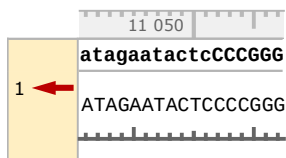
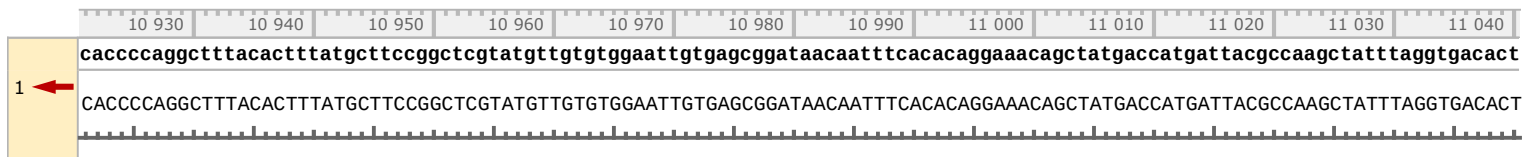
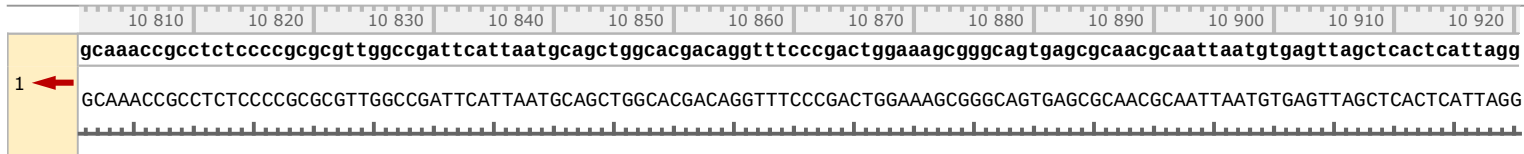












Original Sequence: PL032_assembled.dna

1 .. 11 057

seq_pl032.plasmid_assembly ←

11 057 bases

1 .. 11 057 (3 mismatches)