

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Bakalářská práce

**Riboswitch jako nová molekulární metoda regulace exprese genu
na úrovni mRNA v *Leishmania tarentolae***

Kateřina Švehlová

Vedoucí práce: Mgr. Silvie Trantírková, PhD.

České Budějovice, 2009

Švehlová K, 2009: Riboswitch jako nová molekulární metoda regulace exprese genu na úrovni mRNA v *Leishmania tarentolae* [Riboswitch as a new molecular method of gene expression regulation at the level of mRNA in *Leishmania tarentolae*] - 44 pp., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I tried to establish a new system for regulation of translation at the level of messenger RNA in *Leishmania tarentolae*. The system was based on a theophylline riboswitch. The riboswitch would represent an alternative regulation system to widely exploited RNA interference, particularly in those organisms that do not possess a functional RNA interference pathway.

Tato práce byla podpořena grantem uděleným Studentskou grantovou agenturou Přírodovědecké fakulty v roce 2008.

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 14. 5. 2009

.....

Kateřina Švehlová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Lukášovi a Silvě Trantírkovým za jejich cenné rady a vedení, Petře Sekyrové za její trpělivost a množství času, který mi věnovala, a neméně svým kolegům z Laboratoře strukturní biologie. Jejich cenné rady a pochopení mi často pomohly v náročných momentech.

Zvláštní díky patří vrchnímu komisaři kpt. Mgr. Jiřímu Paterovi a Honzovi Brabcovi, jejichž neustálá podpora a povzbuzení mi dávaly sílu pokračovat.

Hlavně ale děkuji Tobě, mami, za to, že jsi mi tohle vše umožnila a vždy mě ve všem podporovala.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Kinetoplastida jako modelové organizmy	1
1.2 Metody manipulace genové exprese	2
1.2.1 Knock-out	2
1.2.2 Knock-down	2
1.2.2.1 RNA interference	3
1.2.2.2 Regulace genové exprese na úrovni mRNA	5
1.2.2.2.1 Ribozymy	5
1.2.2.2.2 Riboregulátory	6
1.2.2.2.3 Aptamerové riboswitche	8
1.2.2.2.3.1 Theophyllinový riboswitch	8
1.2.2.2.3.2 Přirozené riboswitche	10
1.3 Cíle práce	11
1.4 Význam	12
2. Metody	13
2.1 Kultivace <i>L. tarentolae</i>	13
2.2 Testování cytotoxicity theophyllinu	13
2.3 PCR Amplifikace	13
2.4 Ligace do plazmidu pGEM-T Easy	14
2.5 Elektroforéza v agarózovém gelu	15
2.6 Ligace DNA fragmentů v low-melting agarózovém gelu	15
2.7 Transformace <i>E. coli</i> XL1 metodou heat-shock	15
2.8 Kultivace <i>E. coli</i> a izolace plazmidové DNA	16
2.9 Restrikce DNA	16
2.10 Annealing dvou komplementárních oligonukleotidů	17
2.11 Uchovávání kultur <i>E.coli</i> a <i>L. tarentolae</i>	17
2.12 Transfekce <i>L. tarentolae</i>	17
2.13 PCR Screening kolonií	19
2.14 SDS PAGE	19
2.15 Western Blot	19
3. Materiály	21
3.1 Organizmy	21
3.2 Vektory	21
3.3 Pufry a média	22
3.4 Ostatní chemikálie	24
4. Výsledky	25
4.1 Test cytotoxicity theophyllinu vůči <i>L. tarentolae</i>	25
4.2 Příprava plazmidu s inzertem riboswitch-eGFP	26
4.2.1 Klonování v plazmidu pGEM	26
4.2.2 Klonování do plazmidu pF4mcsX11.4dBhyg a transfekce <i>L. tarentolae</i>	30
4.3 Testování transfekovaných kultur na přítomnost inzertu	31

5. Diskuze	34
5.1 Úvod	34
5.2 Řešení projektu	34
5.3 Závěr	37
6. Literatura	38

1. Úvod

1.1 Kinetoplastida jako modelové organizmy

Kinetoplastida je řád eukaryotních diploidních organismů patřící do kmene Euglenozoa. Svůj název získala díky charakteristické jediné protáhlé mitochondrii s kinetoplastem. Do této skupiny Trypanosomatid patří mimo jiné dva parazitologicky významné rody: *Trypanosoma* a *Leishmania*.

Rod *Leishmania* je typický střídáním dvou hostitelů - obratlovců a hmyzu - během svého životního cyklu. Hmyzími přenašeči jsou komáři rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia*. Lidská onemocnění způsobené rodem *Leishmania* se souhrnně nazývají leishmaniózy (Čepička et al., 2007).

Kinetoplastida se jako modelové organizmy používají již od konce 80. let, kdy byl do těchto parazitů poprvé uměle vnesen bakteriální gen metodou transfekce (Laban et al., 1989), což umožnilo jejich další využití ke studiu funkce genů a buněčných pochodů. Metody knock-downu a knock-outu dovolily nahlédnout do biologie těchto parazitů na molekulární úrovni a zpřístupnily je tak dalšímu studiu. Osekvenování genomu *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major* v letech 2005 - 2007 (Peacock et al., 2007; Ivens et al., 2005) jejich studium dále usnadnilo. Další výhodou rodu *Leishmania* i ostatních kinetoplastid je jejich snadná kultivace a manipulace, zejména metoda transfekce homologní rekombinací.

Ačkoliv je v současnosti dostupných mnoho metod genetické manipulace s těmito organizmy, každá z nich má určitá omezení. Metoda knock-outu může být použita pouze u genů, které nejsou nezbytné pro přežití organismu, RNA interferenci není možné použít u organismů RNAi inaktivních jako je *L. major* nebo *T. cruzi* (DaRocha et al., 2004; Robinson et al., 2003). V následujícím přehledu uvádím nejdůležitější v současnosti dostupné metody či metody, které mají svým mechanismem souvislost s mou vlastní prací.

1.2 Metody manipulace genové exprese

1.2.1 Knock-out

Knock-out je metoda regulace exprese genu již na úrovni DNA, kdy je studovaný gen zcela nebo zčásti odstraněn z genomu. Využívá se zejména v případech, kdy potlačení produkce proteinu není dostatečně účinné metodou knock-downu (viz níže), či knock-down není u daného organismu použitelný (například RNA interference u *Trypanosoma cruzi*). U genů, které jsou pro parazity životně důležité, je ale tato metoda nevyužitelná. Tuto nevýhodu je možno eliminovat vložením plazmidu s inducibilním T7 promotorem a sekvencí cílového genu (Biebinger et al., 1997), který se pak v buňce vyskytuje epizomálně (tzn. jako kruhový plazmid, který se neintegruje do genomu). Zároveň musí organismus již obsahovat uměle vložený gen pro T7 polymerázu nebo do něj musí být současně vnesen. Zde se ale setkáváme s problémem příliš silného T7 promotoru, který i bez indukce tetracyklinem nemusí být absolutně inaktivní.

Metoda spočívá v záměně genu za antibiotickou rezistenci v genomu organismu. Díky vložené rezistenci je pak možné selektovat buňky, u kterých záměna proběhla. S úspěchem byla použita jak u *Trypanosoma brucei*, tak u *Trypanosoma cruzi* a rodu *Leishmania*. (Shi et al., 2004; Durand-Dubief et al., 2003; Zhang et al., 2003). Vzhledem k tomu, že kinetoplastida jsou diploidní, je metoda relativně náročná, protože gen musí být postupně vyměněn v obou alelách, a to postupně s použitím dvou různých antibiotických rezistencí.

1.2.2 Knock-down

Jako knock-down metody označujeme metody, u nichž je DNA sekvence genu zachována, jeho exprese je ale potlačena jinak, a to buď na úrovni translace či transkripce.

1.2.2.1 RNA interference

Nezastupitelnou roli v molekulární biologii kinetoplasid má RNA interference (RNAi). Metoda spočívá ve vnesení úseku DNA, která po přepisu do RNA tvoří dvouřetězcovou RNA (dsRNA) o stejné sekvenci jako je messenger RNA (mRNA) cílového genu. Tato dsRNA se následně stává substrátem pro enzym Dicer, který ji štěpí na 25 nukleotidů dlouhé produkty. Tyto úseky dsRNA, nazývané small interfering RNAs (siRNA), jsou nadále rozpleteny proteinem s helikázovou aktivitou, Slicerem, a dají vznik krátkým jednořetězcovým úsekům RNA (ssRNA). Tyto hybridizují s cílovou mRNA. Takto hybridizované úseky jsou následně degradovány doménou Sliceru zvanou Argonaut s RNázovou aktivitou. Tak je mRNA rozštěpena dříve, než by mohlo dojít k její translaci (Balaña-Fouce et al., 2007). Schéma procesu je na obrázku 1.1.



Obrázek 1.1: Schéma RNA interference u *Trypanosoma brucei*. Znázorněna je dsRNA, na kterou se váže enzym Dicer a štěpí ji na 25 nukleotidů dlouhé siRNAs. Po jejich rozpletení enzymem Slicer (AGO1) vznikají jednořetězcové ssRNAs. Tyto se vážají na komplementární sekvenci cílové mRNA a spouští její degradaci Slicerem a brání tak translaci v protein. Převzato z Balaña-Fouce et al. (2007).

Poprvé byla RNAi u kinetoplastid použita v roce 1998 u *Trypanosoma brucei*, kdy došlo k dočasnému utlumení produkce proteinu alfa-tubulinu vnesením dsRNA odpovídající sekvenci 5'UTR oblasti genu. (Ngô et al., 1998)

V současné době se využívají dva systémy RNA interference. V prvním případě jde o mechanismus, kdy se do genomu organismu vkládá sekvence shodná se sekvencí cílového genu a její invertovaná forma. Mezi ně je vložena nekomplementární sekvence. U tohoto systému je zapotřebí pouze jeden promotor. Po transkripci pak RNA vazbou mezi komplementárními částmi vytvoří tzv. stem-loop RNA, odtud název stem-loop RNAi (Shi et al., 2000). Tento systém je účinnější než následující druhý přístup (Durand-Dubief et al., 2003a). Připisuje se to faktu, že stem-loop RNA samovolně zaujímá strukturu vlásenky a je tak méně náchylná k degradaci RNázami (Motyka et al., 2004).

Naopak v druhém případě je použita pouze sekvence cílového genu obklopená dvěma T7 promotory. Při jejím přepisu tak vznikají dvě navzájem komplementární RNA, které následně hybridizují. Jak už jsem dříve zmínila, RNA produkty tohoto systému jsou náchylnější k degradaci RNázami. Navíc tato metoda vykazuje větší propustnost oproti předešlé, a to kvůli dvojici velmi silných T7 promotorů. Naopak výhodou tohoto přístupu je jeho účinnost dosahující 80% redukce produkované mRNA (Motyka et al., 2004). Tento přístup se s úspěchem používá jak u amastigotních, tak u promastigotních forem parazitů (Morris et al., 2001).

Tyto dva systémy mohou mít charakter inducibilní či konstitutivní produkce dsRNA. V prvním případě je tvorba příslušné polymerázy aktivována přidáním tetracyklinu do média a tím je spuštěna produkce dsRNA. V druhém případě je polymeráza tvořena neustále, tetracyklinem je naopak její produkce potlačena a tím RNA interference přerušena (Motyka et al., 2004).

Někdy se stává, že se kultura po několika dnech po účinné transfekci inzertem zbaví úseků důležitých pro správný průběh RNAi. Stává se tak delecí či mutací T7 promotoru nebo tetracyklinového operátoru, nejčastěji ale samotné sekvence cílového genu (Chen et al., 2003).

I přes jisté nevýhody byla RNAi s úspěchem použita v mnoha studiích, které pomohly odhalit například enzymatické funkce a mechanismus vzniku editozomu u RNA editingu (Rusché et al., 1997; Madison-Antenucci et al. 1998; Panigrahi et al.,

2001) nebo některé aspekty buněčného cyklu *T. brucei* (Li et al., 2003; Hammarton et al., 2003).

Funkční dráha RNA interference dosud nebyla prokázána v *Trypanosoma cruzi* a rodu *Leishmania* (kromě *L. brasiliensis*) (DaRocha et al., 2004; Robinson et al., 2003, Peacock et al., 2007). Důvod je třeba hledat v původní funkci RNAi v eukaryotech. Na základě studií na *T. brucei* se předpokládá, že původní funkcí RNAi je potlačovat přesuny transpozonů v genomu a fungovat jako ochrana proti virům produkujícím dsRNA (Shi et al., 2004a; Djikeng et al., 2001; Balaña-Fouce et al., 2007). U rodu *Leishmania* nebyly funkční transpozony stejně jako funkční RNAi dráha objeveny.

Výjimkou je *Leishmania brasiliensis*, u které byla analýzou osekvenovaného genomu nalezena skupina telomerových retrotranspozonů společně se sekvencí možné reverzní transkriptázy a integrázy. Spojitost mezi retrotranspozony a RNA interferencí dále podporuje i skutečnost, že v *L. brasiliensis*, narozdíl od *L. major* a *L. donovani* bez funkčních retrotranspozonů, byly identifikovány analogy dvou enzymů typických pro RNAi v *Trypanosoma brucei*. Jsou to Dicer-like protein s RNázovou aktivitou a obdoba enzymu Slicer s doménami s RNázovou aktivitou (Peacock et al., 2007; Shi et al., 2004b).

1.2.2.2 Regulace genové exprese na úrovni mRNA

V současné době jsou známy tři principy mechanismu regulace genové exprese na úrovni mRNA:

1. Ribozymy
2. Regulátory
3. Aptamerové riboswitche.

1.2.2.2.1 Ribozymy

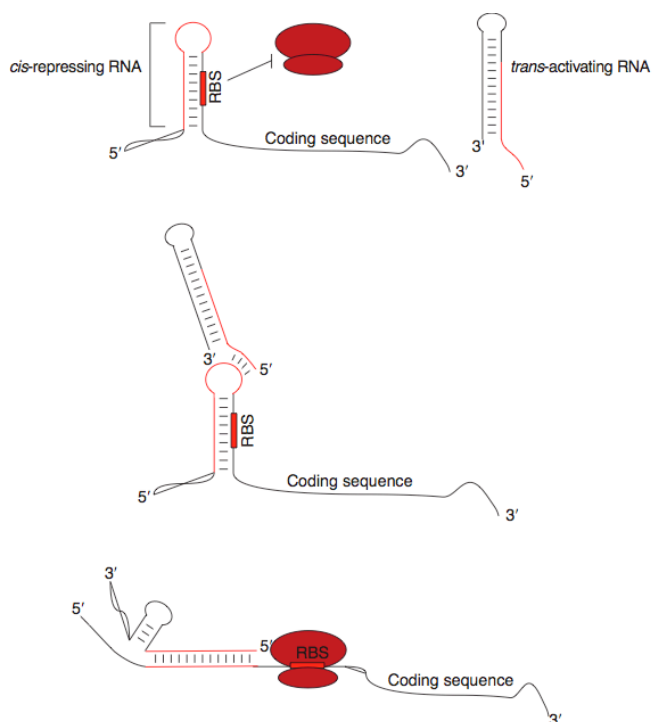
Ribozymy, obdoby proteinových enzymů, jsou RNA molekuly schopné katalyzovat hydrolýzu fosfoesterových vazeb RNA (Li et al., 1999). Dělí se do několika kategorií, které mají velmi konzervovaná jádra s katalytickou aktivitou (Tang et al., 2000). V přírodě se vyskytují jako součást rRNA, úseky RNA, které štěpí

introny, jejichž jsou sami součástí (Cech et al., 1981) či jako součást proteinového enzymu RNázy P v bakteriích, která zpracovává prekurzory transferových RNA (Guerrier-Takada et al., 1983). Přirozeně se vyskytující je také ribozym schopný regulace translace příslušného genu. Jedná se o ribozym, který je v 5'UTR oblasti genu *glmS* bakterie *Bacillus subtilis* a na základě přítomnosti či absence produktu tohoto genu je schopen zpětně regulovat jeho translaci. Princip mechanismu spočívá v navázání produktu na inaktivní ribozym, který je tímto aktivován a štěpí mRNA genu než dojde k její translaci (Winkler et al., 2004).

Ve studii Yena et al. (2004) byl do lidských embryonálních buněk ledvin vnesen ribozym přirozeně se vyskytující u motolice *Schistosoma mansoni*. Jeho sekvence byla uměle modifikována až se docílilo 1400-násobného potlačení hladiny exprese genu s tímto ribozymem v 5'UTR oproti genu s ribozymem inaktivním. Produkce genu mohla být opět spuštěna inaktivací ribozymu molekulou toyocamycinu s následnou expresí genu téměř shodnou s hladinou exprese genu s ribozymem inaktivním. Z Yenových experimentů je tedy zřejmé, že ribozymy jsou funkční metodou schopnou regulace exprese genu *in vivo*, a to i v savčích buňkách.

1.2.2.2 Riboregulátory

Riboregulátory jsou v současnosti další rychle se rozvíjející metodou regulace na úrovni RNA (Isaacs et al., 2004). Jedná se o malé molekuly RNA (tzv. small regulatory RNAs), které jsou u bakterií přirozeně produkovány jako odpověď na změnu podmínek (např. teplota, přítomnost toxinů) (Gottesman et al., 2004). Ve své podstatě jde o obdobu eukaryotických microRNA. Malé regulační RNA specificky interagují s odpovídající mRNA a inhibují tak jejich translaci. Konkrétně se malá regulační RNA váže na 5'UTR konec mRNA poblíž ribosome-binding site (RBS). Tím zabrání nasednutí ribozómu a následně je společně s navázanou mRNA degradována (Massé et al., 2003). Příkladem takového riboregulátoru v *E. coli* je RNA transkript genu *rhyB*, který reguluje proces ukládání železa v buňce (Massé et al., 2002).



Obrázek 1.2: Schéma funkce regulace translace riboregulátory podle Isaacs et al. (2004). Nahoře s překrytým RBS a tedy inaktivní. Dole hybridizovaná 5'UTR oblast s odkrytým RBS. Převzato z Davidson et al. (2005).

Stejně jako u jiných metod regulace exprese pomocí RNA, i u riboregulátorů je snaha vytvořit jejich pomocí umělé regulační mechanismy pro použití *in vivo*. Isaacs et al. (2004) se pokoušeli vyvinout takový regulační mechanismus v *Escherichia coli*, kdy malé regulační RNA naopak aktivují translaci genu. Do 5'UTR oblasti tohoto genu nejprve vložili krátkou *cis*-repressing sekvenci, která po přepsání do RNA tvoří sekundární strukturu překrývající RBS. Zároveň do organismu vložili nezávisle transkribovaný *trans*-activating úsek (malá regulační RNA), který je komplementární k *cis*-repressing sekvenci a samotý tvoří ne příliš pevnou vlásenkovou strukturu. Jestliže malá regulační RNA hybridizuje s inhibujícím úsekem v 5'UTR oblasti genu, celý komplex změní svou sekundární strukturu a odkryje tak RBS a ribozóm může nasednout a zahájit translaci (Obrázek 1.2).

Přestože exprese genu byla opravdu touto metodou potlačena, následná aktivace malými regulačními RNA měla pouze 40% účinnost oproti původní hladině exprese. Důvodem byla zřejmě větší náchylnost mRNA s upravenými 5'UTR oblastmi k degradaci RNázami (Isaacs et al., 2004).

Přínos této metody spočívá v tom, že sekvence regulačního elementu je nezávislá na kódující sekvenci genu a může tak být beze změn použita u různých genů, případně u několika genů zároveň.

1.2.2.2.3 Aptamerové riboswitche

Další z možných cest regulace exprese genů pomocí RNA je využití mechanismu riboswitche, který funguje na principu aptameru lokalizovaného v 5'UTR úseku odpovídajícího genu. Jde o úsek RNA, který je schopen za přítomnosti daného ligandu měnit svou konformaci (Werstuck et al., 1998) a tím funguje jako nástroj pro kontrolu produkce proteinů na úrovni translace.

První syntetický riboswitch pro kontrolu translace *in vivo* byl připraven Werstuckem a Greenem roku 1998 (Werstuck et al., 1998).

Samotný princip riboswitche spočívá v jeho vysoké specifitě pro vybraný ligand. Když ligand v médiu není přítomen, RNA tvoří sekundární strukturu, která překrývá startovací kodón či ribosome-binding site (RBS) a neumožní nasednout ribozómu a zahájit translaci, tzv. Off konformace. Naopak když je ligand přítomen, RNA s ním reaguje za vzniku sekundární struktury, která uvolní dříve blokový startovací kodón. Tím je kodón zpřístupněn ribozómu a ten na něj nyní může nasednout a zahájit translaci, tzv. On konformace (Mironov et al., 2002).

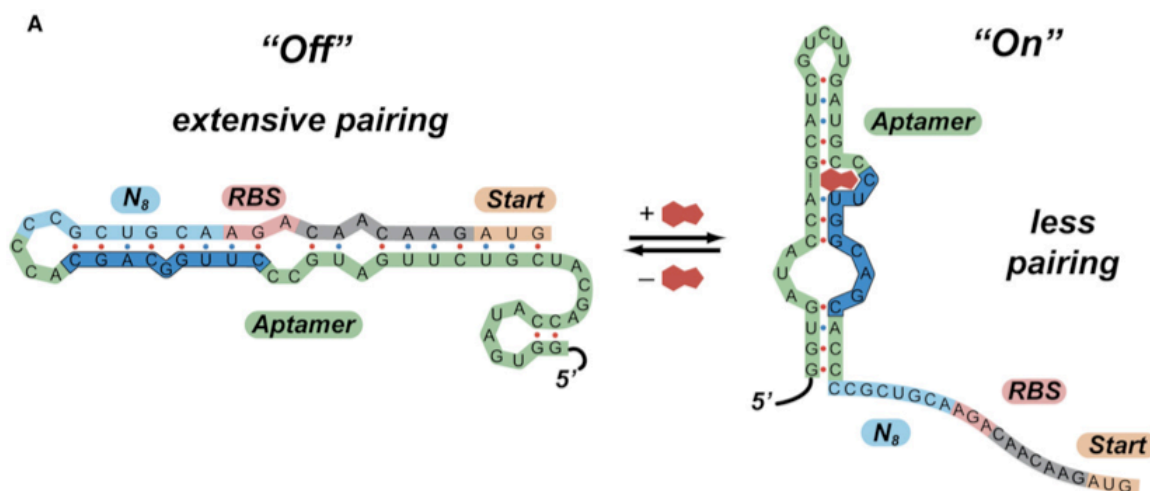
Některé riboswitche fungují na opačném principu - za přítomnosti ligandu je startovací kodón ribozómu přístupný, bez ligandu je překryt sekundární strukturou RNA (Hanson et al., 2005).

V současnosti metoda zvaná SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) umožňuje vyvinout syntetický riboswitch specifický pro prakticky jakoukoliv molekulu (Levine et al., 2007).

1.2.2.2.3.1 Theophyllinový riboswitch

Mezi syntetické riboswitche patří i theophyllinový riboswitch, tedy riboswitch jehož ligandem je theophylline. Na Obrázku 1.3 je zobrazen theophyllinový riboswitch používaný v experimentech Lynche et al. (2007). Ve své práci se zabývali několika problémy, se kterými se do té doby u syntetických riboswitchů potýkali: prvním

problémem byla relativně vysoká propustnost mechanismu v pozici riboswitchu Off, dále nedostatečný nárůst hladiny translace v pozici riboswitchu On a nakonec nedostatečné porozumění mechanismu funkce riboswitchu (Lynch et al., 2007).



Obrázek 1.3: Riboswitch podle Lynche et al. (2007). Vlevo je konformace Off, kdy je ribosome-binding site a startovací kodón pro ribozóm nepřístupný. Vpravo je konformace On s navázaným theophyllinem a tudíž dostupným RBS a startovacím kodómem. Konformace On proto umožňuje translaci. Převzato z Lynch et al. (2007).

Předchozí experimenty ukázaly, že délka a sekvence úseku riboswitchu mezi RBS a aptamerem - místem, které váže theophyllinový ligand - významně ovlivňuje účinnost potlačení translace cílového genu (Desai et al., 2004). Lynch proto provedl experimenty, kde testovali účinnost riboswitchů o různé délce a náhodné sekvenci (Lynch et al., 2007). Při nich srovnávali úroveň exprese genu beta-galaktosidázy bez a za přítomnosti theophyllinu. Tímto způsobem byli schopni identifikovat klon, u kterého byl zjištěn 36-tinásobný nárůst exprese genu za přítomnosti theophyllinu v médiu a velmi nízká hladina translace za jeho absence. Ve srovnání s přirozeně se vyskytujícími riboswitchem, které vykazují až 100-násobný nárůst hladiny translace genu (Winkler et al., 2002), je hodnota získaná Lynchem et al. relativně vysoká. Lynch et al. (2007) tak představili účinnou metodu, kterou lze vytvořit zcela syntetický a dostatečně účinný riboswitch s aptamerem specifickým pro zvolenou molekulu. Tento postup by se dal využít pro vývoj dalších riboswitchů pro studium genů nebo jako velmi citlivé senory na přítomnost látek v buňce.

Osekvenováním a analýzou programem Mfold (Zuker, 2003) byli Lynch et al. (2007) schopni předpovědět mechanismus, jakým theophyllinový riboswitch funguje. Jak je znázorněno na obrázku 1.3, bez přítomnosti ligandu RBS hybridizuje s úsekem aptameru a brání tak nesednutí ribozómu a zahájení translace, tzv. konformace Off. Pokud je v médiu ligand přítomen, váže se na sekvenci aptameru a posouvá tím termodynamickou rovnováhu ve prospěch konformace On. Skutečnost, že sekvence aptameru bez přítomnosti ligandu opravdu hybridizuje s RBS potvrdily i experimenty, kdy byla tato sekvence pozměněna (Lynch et al., 2007). V takovém případě se hladina exprese genu bez přítomnosti ligandu navýšila 5-krát. Když byla sekvence aptameru znovu mutována tak, aby byla komplementární k oblasti RBS a zároveň jiná než sekvence původní, účinnost riboswitchu potlačit expresi genu se obnovila. Aptamer již ale nevázal theophylline a ztratil schopnost aktivace přidáním ligandu. Tato studie ukazuje, že podmínkou, aby riboswitch v buňkách fungoval, musí aptamer nejen vázat zvolený ligand pro aktivaci, ale zároveň být i komplementární k sekvenci RBS, aby expresi genu účinně potlačil.

1.2.2.2.3.2 Přirozené riboswitche

Nyní je již známo, že riboswitche jsou přirozenou součástí regulace exprese v buňce a to jak u prokaryot tak u eukaryot. Například v *E. coli* je na principu riboswitchu zpětně regulována exprese koenzymu-B12 (Nahvi et al., 2004). Protein je zde zároveň produktem regulovaného genu a ligandem riboswitchu. Tak je zajištěna optimální hladina exprese v buňce. Příkladem u eukaryot je *Arabidopsis* s thiaminpyrofosfátovým riboswitchem lokalizovaným v 3'UTR oblasti genu (Sudarsan et al., 2004).

V některých případech mohou riboswitche fungovat také jako buňečné teploměry. Takto fungují například u *Listeria monocytogenes* či *Yersinia pestis* (Hoe et al., 1993; Johansson et al., 2002). Oba parazité pomocí teplotou indukované změny konformace RNA spouští expresi genů charakteristickou pro fázi kolonizace hostitele.

1.3 Cíle práce

Cílem mé práce bylo otestovat způsob zavedení a účinnost theophyllinového riboswitchu pro regulaci genové exprese v eukaryotním protozoálním organismu *Leishmania tarentolae*. Theophyllinový riboswitch jsem testovala prostřednictvím modifikace 5'UTR oblasti mRNA exogenního genu eGFP (enhanced green fluorescent protein). eGFP byl zvolen kvůli jednoduchosti monitorování overexprese tohoto proteinu pomocí fluorescencečních měření. *L. tarentolae* byla zvolena jako vhodný modelový organismus z několika důvodů: jedná se o eukaryotický RNAi inaktivní organismus, který je nepatogenní, a snadno se kultivuje. Dále se snadno geneticky manipuluje pomocí metody homologní rekombinace.

Specifické cíle projektu zahrnovaly:

1. testy cytotoxicity theophyllinu pro *L. tarentolae*
2. počítačem asistovanou predikci stability syntetického konstruktu: úpravu sekvence theophyllinového riboswitchu a výběr jeho umístění v 5'UTR oblasti mRNA genu eGFP
3. zaklonování syntetického fragmentu kódujícího riboswitch do 5'UTR oblasti genu eGFP
4. vnesení konstruktů do *L. tarentolae*
5. testy účinnosti riboswitchu pro regulaci overexprese eGFP: stanovení hladiny potlačení či zesílení exprese v důsledku odpovědi na koncentraci theophyllinu v médiu, sledování časové odpovědi a reverzibility procesu

1.4 Význam

Mechanismus regulace translace syntetickým theophyllinovým riboswitchem byl doposud s úspěchem testován v prokaryotech (př. Lynch et al., 2007).

Výhodou riboswitche by byla hlavně možnost využít tuto metodu u organizmů, u kterých není možné použít RNA interferenci (většina druhů rodu *Leishmania*, *T. cruzi*). Zároveň je přepínání exprese genu pomocí aktivace/inaktivace riboswitche rychlé a vratné. Pouhá záměna čistého média za médium s ligandem spouští translaci bez nutnosti syntézy dalších interakčních elementů, jak je tomu u mnoha knock-downových metod (Lynch et al., 2007). Tato vlastnost by nám umožnila přesně regulovat míru exprese genu, a to zejména u těch genů, které jsou pro studovaný organismus nezbytné a kde jediným pozorovatelným fenotypem knock-downu či knock-outu je smrt. Pokud by testy potvrdily, že theophyllinový riboswitch v *L. tarentolae* funguje, nabízelo by se jeho další využití přímo ke studiu funkce genů *Leishmania*, případně jeho další testování v jiných eukaryotických organizmech.

2. Metody

2.1 Kultivace *L. tarentolae*

Promastigotní stádia *L. tarentolae* byla kultivována v kultivačních lahvích (TPP) v BHI médiu obohaceném o hemin (10 µg.ml⁻¹), penicilin (50 U.ml⁻¹) a streptomycin (50 µg.ml⁻¹). Po transformaci bylo do média navíc přidáváno selekční antibiotikum hygromycin (100 µg.ml⁻¹).

Kultury byly pravidelně přeočkovávány při dosažení koncentrace 10⁷-10⁸ buněk.ml⁻¹. Ředěny byly v takovém poměru, aby výsledná koncentrace byla 10⁶ buněk.ml⁻¹. Kultivace probíhala za stálého třepání o frekvenci 60-80 rpm a při teplotě 26 °C.

2.2 Testování cytotoxicity theophyllinu

Kultury *L. tarentolae* byly testovány v médiu s theophyllinem o výsledné koncentraci 1, 2 a 5 mM. Počáteční koncentrace buněk byla 3.10⁶. Počet buněk byl dále měřen po 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 a 120 hodinách na přístroji Beckman Cellcounter Z1 (Beckman Coulter). Když dosáhly kultury hodnot 5.10⁷, byly 10x naředěny. Z naměřených koncentrací byly sestaveny růstové křivky.

2.3 PCR Amplifikace

Amplifikací genu eGFP z plazmidu pU44 (viz Materiál) byl získán ampikon, jehož správná velikost byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Primery (Sigma-Aldrich) byly navrženy tak, aby na koncích produktu vznikla restriční místa **MfeI** (5' konec) a **NotI** (3' konec) umožňující další ligaci a překlonování.

Použité primery:

eGFP Fw: 5' - **CAATTG**ATGGCTCGAGCGATGGTGAGCAAG - 3'

eGFP Rv: 5' - AGGAGGAGG**GCGGCCGCTT**TA - 3'

Složení reakce:

objem [μ l]	složka
2	templátová DNA
2	Primer Fw (o koncentraci 10pmol)
2	Primer Rv (o koncentraci 10pmol)
4	dNTP Mix (Takara)
5	10x PCR Buffer (Takara)
0.25	rTaq DNA polymeráza (Takara)
37.75	MilliQ voda

Reakce byla provedena v přístroji MiniCycler™ (MJ Research) v těchto podmínkách:

krok	teplota [$^{\circ}$ C]	čas
1. počáteční denaturace	95	5 minut
2. denaturace	95	1 minuta
3. nasedání primerů	68	40 sekund
4. elongace	72	1 minuta
5. konečná elongace	72	2 minuty

2. až 4. krok byl 35x zopakován.

2.4 Ligace do plazmidu pGEM-T Easy

Pro ligaci PCR amplikonu do pGEMu byla připravena reakce:

5 μ l 2x ligační pufr
1 μ l vektor pGEM-T Easy
1 μ l T4 DNA ligáza
35 ng PCR produkt (objem dle koncentrace)

doplnit destilovanou vodou do 10 μ l.

Reakce byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 $^{\circ}$ C.

2.5 Elektroforéza v agarózovém gelu

Plazmidy a DNA fragmenty byly analyzovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Agaróza v prášku byla varem rozpuštěna v TAE a po vychladnutí bylo přidáno barvivo SYBR Safe DNA gel stain v poměru 1:10.000. Jako měřítko velikosti fragmentů byl používán 2-log DNA Ladder. Separace fragmentů probíhalo za napětí dle potřeby 50-90 V. DNA byla poté vizualizována na Transiluminátoru Blue Light (Herolab) a zdokumentována na UV transiluminátoru (UVP).

2.6 Ligace DNA fragmentů v low-melting agarózovém gelu

Před ligací byly DNA fragmenty nejprve separovány na 1% low-melting agarózovém gelu. K přípravě gelu byla použita low-melting agaróza v prášku (Cambrex). DNA byla vizualizována na Transiluminátoru Blue Light (Herolab), který oproti UV světlu DNA nepoškozuje, a skalpelem byly vyříznuty fragmenty odpovídající velikosti. Kousky gelu s DNA byly rozpuštěny 10 minut ve vodní lázni o teplotě 65 °C. K 5 µl rozpuštěného inzertu byly přidány 0,5-2 µl vektoru. Směs byla doplněna do 13 µl destilovanou vodou a vrácena do 65-67 °C na dalších 10 minut. K ligační směsi 9 µl 2x Ligase Buffer a 1 µl T4 DNA Ligase bylo přidáno 10 µl inzertu s vektorem. Ligační reakce byla inkubována přes noc ve 4 °C. Před transformací byla směs opět vložena na 15 minut do 65-67stupňové vodní lázně a bylo přidáno 50 µl destilované vody.

2.7 Transformace *E. coli* XL1 metodou heat-shock

Zamražené kompetentní buňky byly pomalu rozmrazeny na ledě. Do mikrozkuřavky bylo napipetováno 7,5 µl ligační směsi a přidáno 50 µl kompetentních buněk. Suspenze byla ponechána 20 minut na ledu, 45 sekund ve vodní lázni o teplotě 42 °C a opět 2 minuty na ledu. Dále bylo přidáno 300 µl SOC či LB média a poté se buněčná kultura nechala rozrůst za třepání 45 minut v 37 °C na 210 rpm.

Vzhledem k tomu, že u kmene XL1 *E. coli* je možná modrobílá selekce, na předeřáté agarové misky s ampicilinem (100 µg.ml⁻¹) bylo přidáno 32 µl IPTG (25

mg.ml⁻¹) a 8 µl XGal (50 mg.ml⁻¹). Na misky bylo rozetřeno 150 µl transformovaných buněk a následně byly inkubovány přes noc ve 37 °C.

Další den byly vybrány bílé kolonie, u nichž byla kódující sekvence pro beta-galaktosidázu narušena vložením inzertu. Beta-galaktosidáza je enzym, který hydrolyzuje XGal. Jeden z produktů této reakce má modré zbarvení, které je charakteristické pro kolonie, kde inzert nebyl inkorporován. Bílé pozitivní kolonie byly přeočkovány na novou agarovou misku s ampicilinem (100 µg.ml⁻¹) a do zkumavek s LB médiem na další kultivaci (viz dále).

2.8 Kultivace *E.coli* a izolace plazmidové DNA

Pro získání většího množství bakterií k izolaci plazmidu byla vybraná kolonie kultivována ve zkumavkách se 4 ml LB média s ampicilinem (100 µg.ml⁻¹). Kultury byly třepány přes noc při 210 rpm a 37 °C.

Plazmidy byly následně izolovány metodou alkalické lýze:

Nejprve byly buňky stáčeny po 2 minuty na 16.000 rcf (Eppendorf Centrifuge 5415R). Pelet byl poté resuspendován v 50 µl TEGu. Do této suspenze bylo postupně přidáno 100 µl roztoku 1% SDS s 0,2M NaOH, 75 µl 3M acetátu sodného (pH = 5,6) a 225 µl 5M LiCl. Po každém kroku byla mikrozkušavka jemně promíchána. Směs byla centrifugována 10 minut při 16.000 rcf. Nyní byl do nové sady mikrozkušavek přenesen čirý supernatant obsahující plazmidy a přidáno 900 µl 96% etanolu o teplotě -20 °C. Tento roztok byl ponechán 5 minut v -20 °C a poté 15 minut centrifugován při 16.000 rcf. Pelet byl promyt 200 µl 70% etanolu o teplotě -20 °C a minutu centrifugován při 16.000 rcf. Nakonec byl pelet dokonale vysušen a rozpuštěn ve 40 µl destilované vody. Je-li rozpouštění peletu obtížné, je možné roztok zahřát na 37 až 50 °C. Následně byla na UV spektrometru (WPA Biowave II) změřena koncentrace plazmidu.

2.9 Restrikce DNA

Pro získání konkrétního úseku DNA z plazmidu či pro kontrolu přítomnosti inzertu v plazmidu byly používány restrikční reakce. Složení reakce o objemu 10 µl bylo následující:

1 μ l 10x příslušného pufru (New England BioLabs)
0,5 μ l restriční endonukleázy (New England BioLabs)
1 μ l 10x BSA pokud to enzym vyžaduje (New England BioLabs)
1 μ g DNA (objem dle koncentrace)
doplněno destilovanou vodou do objemu 10 μ l.

Reakce byly inkubovány 3 hodiny ve 37 °C.

2.10 Annealing dvou komplementárních oligonukleotidů

Jako budoucí riboswitch byly navrhnuty a uměle syntetizovány dva komplementární jednořetězcové oligonukleotidy (Sigma-Aldrich). Nejprve byly pro účely klonování hybridizovány, aby vytvořily dvouřetězcový úsek. Do 50 μ l reakce bylo přidáno 25 μ l oligonukleotidu Sense a 25 μ l oligonukleotidu Antisense, obojí o koncentraci 10 μ M. Tyto reakce byly vloženy do vodní lázně na 5 minut při teplotě 70 °C.

2.11 Uchovávání kultur *E. coli* a *L. tarentolae*

Buňky byly dlouhodobě uchovávány v -80 °C v roztoku glycerolu o konečné koncentraci 10 %. K 200 μ l 50% glycerolu bylo přidáno 800 μ l buněčné kultury. Kryozkumavky (Techno Plastic Products) byly vloženy do zařízení NALGENE™ Cryo Freezing Container (Nalgene) a v něm ponechány přes noc v -80 °C. Poté již mohly být v této teplotě skladovány v běžné papírové krabičce.

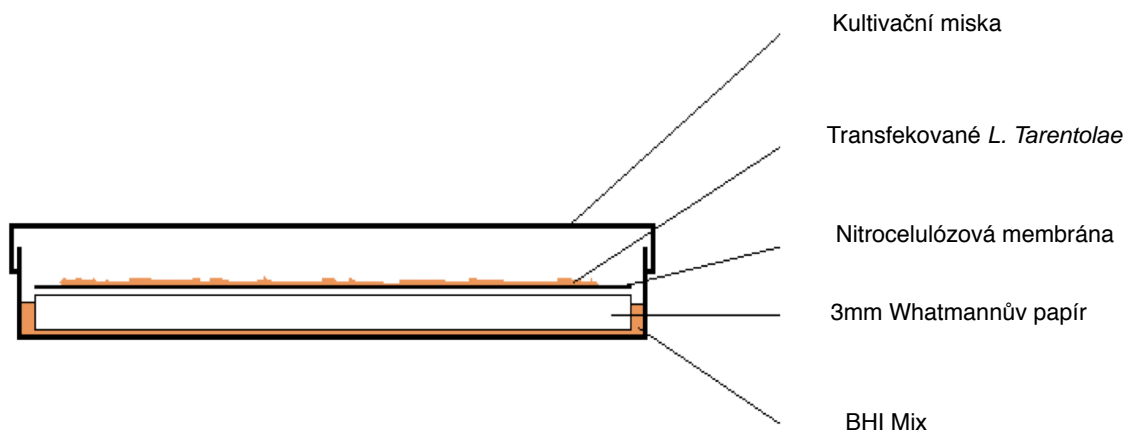
2.12 Transfekce *L. tarentolae*

Pro transfekci *L. tarentolae* elektroporací byla získána plazmidová DNA z 16 ml suspenzních kultur *E. coli* transformovaných finálními vektory. Plazmidy byly izolovány metodou alkalické lýze a inzerť byl pro transfekci linearizován enzymem Swal. DNA byla přečištěna přidáním 500 μ l 96% etanolu, centrifugací 15 minut při 16.000 rcf a promytím v 70% etanolu a opětnou centrifugací 1 minutu při 16.000 rcf. Pelet byl resuspendován v 15 μ l destilované vody.

Pro elektroporaci bylo centrifugováno 5×10^7 buněk *L. tarentolae* (5 minut,

2.000 rcf) a pelet resuspendován v 0,5 ml čerstvého BHI média. Koncentrace buněk při elektroporaci je tedy $1 \cdot 10^8$. Buněčná suspenze byla přenesena do elektroporační kyvety o vnitřní šířce 4 mm (BTX) a inkubována 10 minut na ledu. Před samotnou elektroporací bylo k buňkám přidáno 5-10 μg linearizovaného vektoru. Elektroporace probíhala za podmínek: napětí 1500 V, odpor 500 Ω a elektrická kapacita 25 μF v elektroporátoru ECM 630 (BTX). Byly aplikovány dva pulzy v 10-ti vteřinovém rozestupu. Následně byly kultury znovu inkubovány 10 minut na ledu a poté k nim bylo přidáno 5 ml čerstvého BHI Mix Média. Takto byly inkubovány ve 26 °C a po 20 hodinách bylo přidáno antibiotikum hygromycin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) pro selekci buněk s integrovaným vektorem.

Po dalších 20 hodinách bylo z kultivačních lahví odebráno 0,5 a 1 ml buněk, které byly centrifugovány 5 minut na 2.000 rcf. Pelet byl resuspendován ve 100 μl čerstvého BHI Mix média a rozetřen na kultivační misky (TPP) o průměru 10 cm. Nákres kultivační misky je na Obr 2.1. Whatmannův papír (Bio-Rad) i nitrocelulózová membrána (Pall Corp.) byly udržovány nasycené BHI mixem.



Obr 2.1: Nákres kultivační misky *L. tarentolae*

Po přibližně sedmi dnech se na membráně objevily první kolonie, které byly rozmíchány ve špičce se 150 μl BHI média s hygromycinem a přeneseny do 96-ti jamkové klonovací misky (TPP) a odtud po několika dnech do běžné kultivační láhve (TPP).

2.13 PCR Screening

Pro PCR Screening kultur bylo z kultivační láhve odebráno 1,5 ml kultury o hustotě přibližně $6 \cdot 10^6$ a centrifugováno (2000 g, 5 minut). K peletu bylo přidáno 30 μ l destilované vody s 0,1% Tween, suspenze na 10 minut vložena do 95 °C a krátce centrifugována. Jako templát byly použity 3 μ l supernatantu. Dále se postupovalo jako při výše popsané PCR. Jako primery byly použity EGFP FW a RV (Sigma-Aldrich, sekvence viz kapitola PCR amplifikace) a pro srovnání jako pozitivní kontroly dvojice 3274 LT-FPGS-rt_FW, 3275 LT-FPGS-rt_RV a 3207 calmArt1_FW, 3208 calmArt1_RV komplementární k částem genů FPGS (single-copy gen folypolyglutamát syntetázy, Fadili et al., 2002) a calmodulinu (multiple copy gen, Benaim et al., 1987).

Jejich sekvence jsou:

3274 LT-FPGS-rt_FW 5' - GTACCGTGAGGTGCCTTGTC - 3'

3275 LT-FPGS-rt_RV 5' - GCCACCTGTCTCGTAAATCC - 3'

3207 calmArt1_FW 5' - ATCGACTTCCCCGAGTTCTT - 3'

3208 calmArt1_RV 5' - CCTCCTCGTCTGTACGCTTC - 3'

2.14 SDS PAGE

Pro SDS PAGE byl použit 12% separační gel. Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně Owl;Hoefer. Použit byl SDS Running Buffer.

Do jamek bylo nanášeno přibližně 8 μ l vzorku (dle koncentrace proteinů) a proteinový marker. Elektroforéza probíhala zpočátku při napětí 80 V. Když vzorky dosáhly rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 150 V. Gel byl poté hodinu inkubován v barvicím roztoku Coomassie Blue a následně odbarven v odbarvovacím roztoku.

2.15 Western analýza

Po optimalizaci množství lyzátu buněk ve vzorku metodou SDS PAGE byla provedena SDS PAGE bez barvení gelu Coomassie Blue a tento ge byl použit pro analýzu Western Blotem.

Gel, 3mm blotovací papíry Whatmann (Bio-Rad) a nitrocelulózová membrána BioTraceNT (Pall Corp.) byly před přenesením inkubovány několik minut v transferovém pufru. Vše bylo poskládáno na elektroblot Semidry Blot (Bio-Rad) v pořadí:

3mm papír Whatmann

Nitrocelulózová Membrána

Akrylamidový gel

3mm papír Whatmann

Elektroblot probíhal po dobu 1 hodiny za velikosti proudu vypočítaného dle vzorce $I[\text{mA}] = 5,5 \times S [\text{cm}^2]$, kde S je plocha gelu. Membrána byla poté barvena 5 minut v Ponceau a následně odbravena v PBS s 0,05% Tween 20. Přes noc byla membrána blokována ve 4 °C v PBS Tween s 5% beztučným mlékem.

Druhý den byla membrána 5x po 5 minutách promyta v PBS Tween a zatavena do fólie s primární myšší anti-eGFP protilátkou (Sigma-Aldrich) naředěnou v PBS Tween v poměru 1:10.000. Za stálého míchání byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě. Následně byla membrána 5x po 5 minutách promyta v PBS Tween a hodinu inkubována se sekundární anti-myšší protilátkou (Sigma-Aldrich) naředěnou v PBS Tween v poměru 1:1000. Sekundární protilátka byla označena peroxidázou (Sigma-Aldrich). Poté byla membrána promyta 5x po 10 minutách v PBS Tween a na membránu byl nanesen roztok ECL (1 ml složky 1 a 1 ml složky 2; Pierce), který je substrátem pro peroxidázu. Po 1 minutě byl signál zachycen na detekčním systému Fuji.

3. Materiály

3.1 Organismy

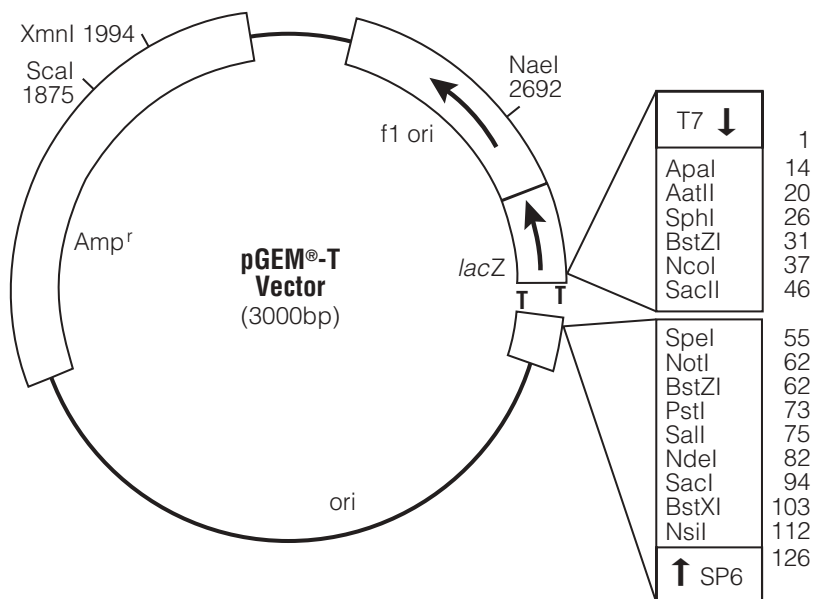
Leishmania tarentolae, kmen P10

Escherichia coli, kmen XL1

3.2 Vektory

p-GEM T-Easy (Promega, Obrázek 3.1):

plazmid použitý pro ligaci jednotlivých částí riboswitchového konstruktu. Nese rezistenci na ampicilin a fragment pro blue-white selekci kolonií se zainkorporovaným inzertem.



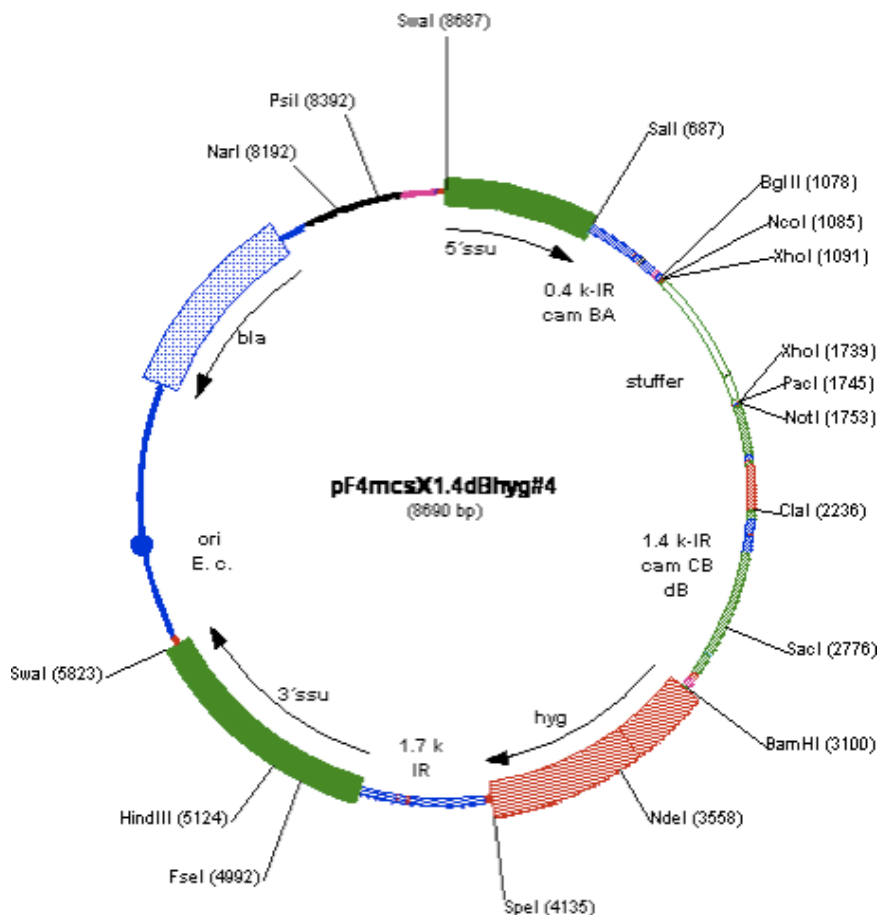
Obrázek 3.1: pGEM-T Easy

pF4mcsX11.4dBhyg (Reinhard Breitling et al. 2002, Obrázek 3.2):

plazmid s místy pro homologní rekombinaci do malé ribozomální podjednotky *L. tarentolae* a s rezistencí na hygromycin, dále nese gen pro rezistenci na ampicilin pro selekci v *E. coli*.

pB49 (laboratoř prof. Lukeše, Biologické centrum AV ČR):

plazmid s vloženým genem eGFP, který jsem použila jako templát pro amplifikaci tohoto genu.



Obrázek 3.2:

pF4mcsX11.4dBhyg

3.3 Pufry a média

Bakteriální půda:

2 g Tryptone casein Peptone (Amresco), 1 g Yeast Extract Bacteriological (Amresco), 2 g NaCl (Lach-Ner), 3 g Agar Bacteriological (Amresco) doplněny 200 ml destilované vody a roztok autoklávován. Po vychladnutí na přibližně 50 °C přidán ampicilin (Roth) na konečnou koncentraci 100 ug · ml⁻¹.

BHI médium:

37 g Brain Heart Infusion (Difco) rozpuštěno v 1 l destilované vody a autoklávováno. Po vychladnutí přidán Hemin (Fluka) o konečné koncentraci

10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Penicilin (Invitrogen, 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) a Streptomycin (Invitrogen, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pro selekci hygromycinem (Invitrogen) bylo přidáno antibiotikum (Jena Bioscience) o konečné koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

BHI Mix:

K 500 ml BHI s přidaným Penicilinem-Streptomycinem a Heminem přidáno 11,88 1M Hepes (Applichem) o pH 7,5, 94 ml 20% glukózy a 59,4 ml Foetal Bovine Serum (Invitrogen). Před přidáním séra byl Mix přefiltrován filtrem RAPID 500 (PES 0,2 μm ; TPP).

Coomassie Blue:

0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 (Lach-Ner) do 250 ml odbarvovacího roztoku (viz dále).

LB médium:

1 g Tryptone Casein Peptone, 0,5 g Yeast Extract Bacteriological, 1 g NaCl doplněno 100 ml destilované vody a autoklárováno. Před použitím byl přidán ampicilin o konečné koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

10x PBS:

40 g NaCl, 1 g KCl (Lach-Ner), 17,9 g Na_2HPO_4 (Lach-Ner), 1,2 g KH_2PO_4 (Lach-Ner), doplnit destilovanou vodou do objemu 500 ml, konečné pH 7,4.

5x Running Buffer (SDS PAGE):

15 g Tris (Lach-Ner), 72 g glycin (Roth), 5 g SDS (Roth), konečné pH 8,3.

Sample Buffer (SDS PAGE):

50mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol (Lach-Ner), 0,1% bromfenolová modř (Lach-Ner), 1M dithiotreitol (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Fluka).

SOB médium:

10 g Tryptone Casein Peptone, 2,5 g Yeast extract Bacteriological, 0,25 g NaCl, 5 ml 250mM KCl doplněno vodou na 500 ml. pH 7.

50x TAE:

242 g Tris-base, 57,1 ml ledové kyseliny octové (Lach-Ner) a 100 ml 0,5M EDTA doplněno destilovanou vodou na 1 l.

TEG:

25mM Tris-Hcl, 10mM EDTA, 50mM glukóza (Lach-Ner).

Odbarvovací roztok (SDS PAGE):

45% methanol (Lach-Ner), 10% kyselina octová.

Transferový pufr (Western Blot):

11,64 g Tris-HCl, 5,86 g glycinu, 7,5 g SDS, 400 ml methanolu a doplnit destilovanou vodou do objemu 2 l.

5% akrylamidový gel (zásobní roztok):

40 ml 30% akrylamid (AA:bisAA v poměru 29:1, Roth), 30,4 ml 1M Tris-HCl o pH 6,8, 2,4 ml 10% SDS a 168 ml destilované vody.

12% akrylamidový gel (zásobní roztok):

100 ml 30% akrylamid (AA:bisAA v poměru 29:1), 62,5 ml 1,5M Tris-HCl o pH 8,8, 2,5 ml 10% SDS a 82,5 ml destilované vody.

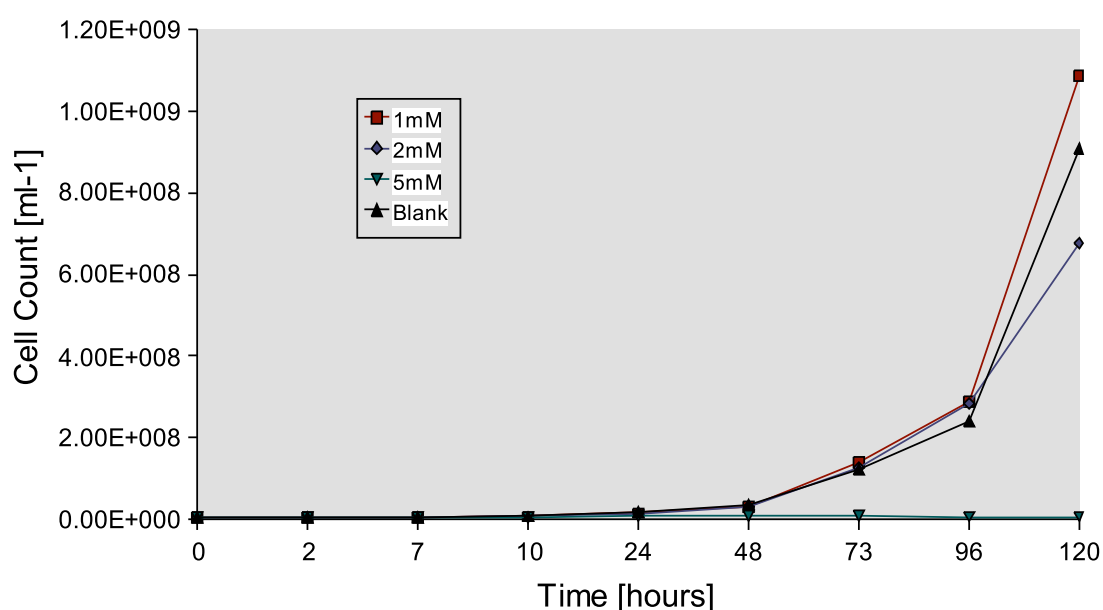
3.4 Ostatní chemikálie

2-log DNA Ladder (New England BioLabs), acetát sodný (Lach-Ner), agaróza (Serva), beztučné sušené mléko (Lach-Ner), BSA (New England BioLabs), DNA Loading Buffer (Takara), dNTPs (Takara), etanol (Lach-Ner), SYBR Safe (Invitrogen), IPTG (Roth), LiCl (Lach-Ner), NaOH (Lach-Ner), n-butanol (Lach-Ner), proteinové standardy Protein Standards - All Blue and Unstained (Bio-Rad), restriční endonukleázy a pufr (New England BioLabs), T4 DNA Ligáza a příslušný pufr (Promega), rTaq DNA Polymeráza a příslušný pufr (Takara), SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), TEMED (Sigma-Aldrich), Theophylline (Fluka), Tween 20 (Sigma), X-Gal (Duchefa Biochemie).

4. Výsledky

4.1 Test cytotoxicity theophyllinu vůči *L. tarentolae*

Pro svou práci jsem zvolila již existující sekvenci riboswitchu podle Lynch et al. (2007). Pokoušeli se vyvinout theophyllinový riboswitch s co nejvyšším aktivačním poměrem (poměr produkce proteinu bez a za přítomnosti theophyllinu) v bakteriích *E. coli*.



Graf 4.1: Růstové křivky kultur v médiu s theophyllinem o koncentraci 1, 2 a 5mM. Černá křivka odpovídá kontrolní kultuře bez theophyllinu. Z grafu je patrné, že rychlost růstu zůstává přibližně stejná při kultivaci v médiu s theophyllinem o koncentracích 1 a 2mM. Koncentrace theophyllinu v médiu 5mM je pro *L. tarentolae* smrtelná.

Základní podmínkou pro použití tohoto riboswitchu v *L. tarentolae* bylo, že theophylline pro ni není toxický. Nejprve jsem provedla testy cytotoxicity theophyllinu na kultuře *L. tarentolae*. Testované kultury jsem pěstovala v médiích s přidaným theophyllinem o výsledné koncentraci 1mM, 2mM a 5mM. Jejich růstové křivky jsem srovnala s růstovou křivkou kultury v čistém médiu.

Koncentrace jsem měřila po 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 a 120 hodinách. Test jsem třikrát zopakovala. Průměrné růstové křivky ze všech tří měření jsou vidět v Grafu 4.1.

Z grafu vyplývá, že theophylline neovlivňuje zásadním způsobem růst *L. tarentolae*, a to do koncentrace 2mM. Do těchto koncentrací rostou ve srovnání s kontrolní kulturou bez theophyllinu stejně rychle.

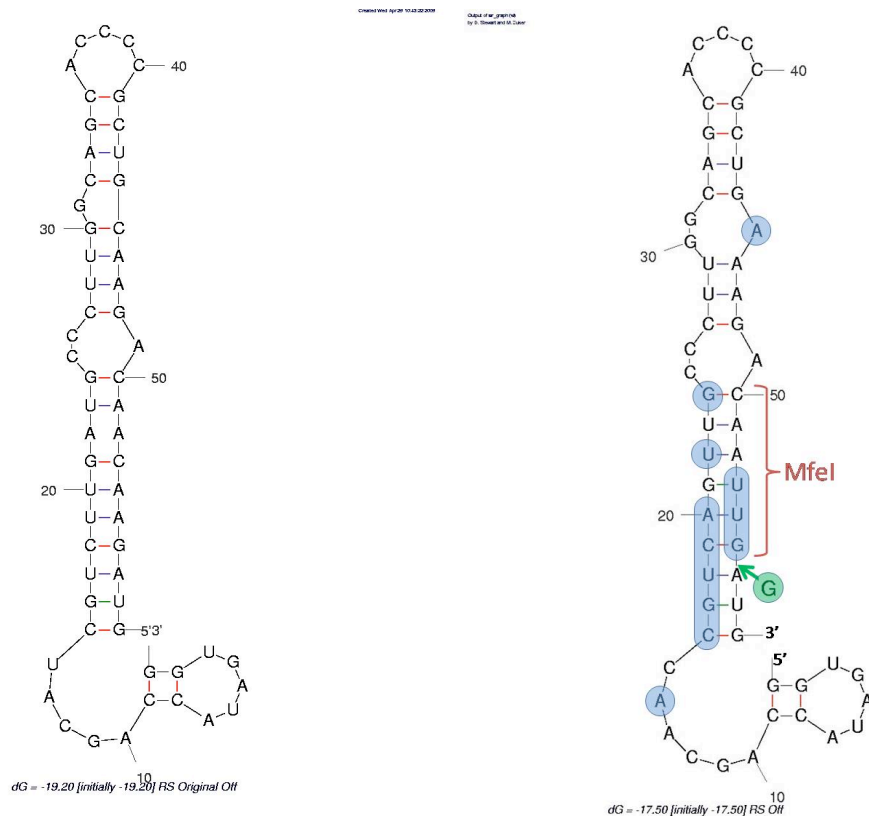
4.2 Příprava plazmidu s inzertem riboswitch-eGFP

4.2.1 Klonování v plazmidu pGEM

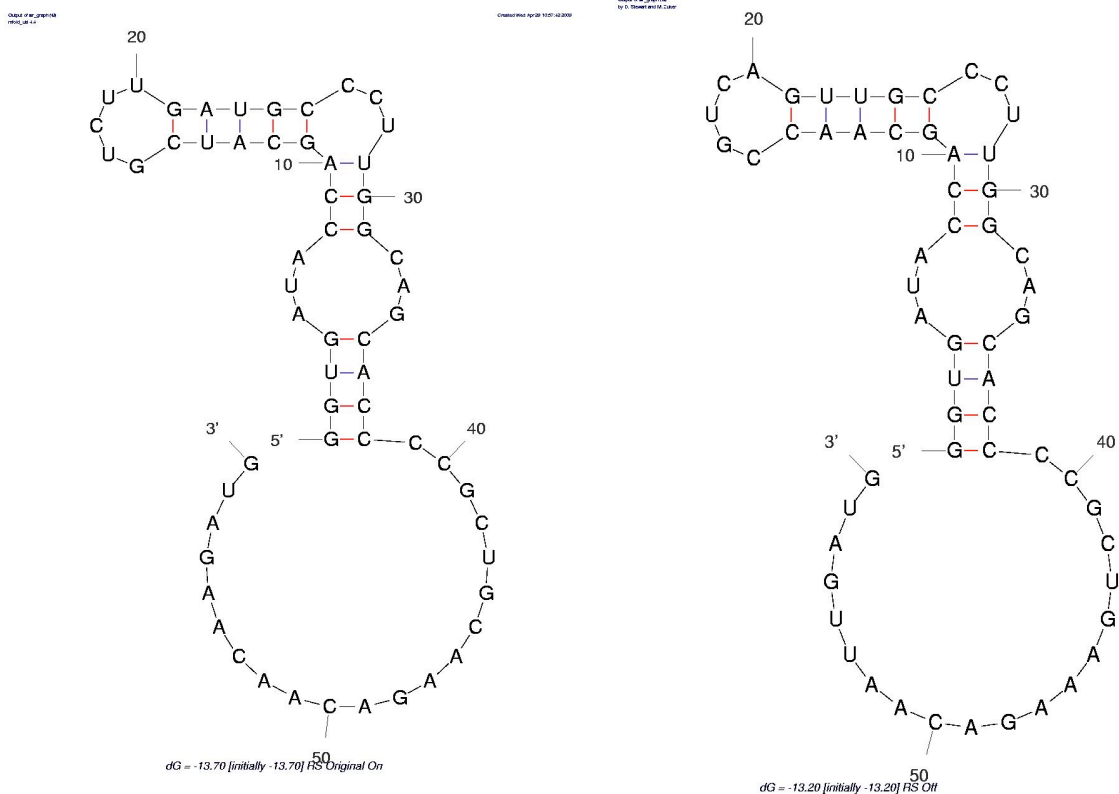
Sekvence riboswitchu, která se podle studie Lynch et al. (2007) jeví jako nejúčinnější (ve smyslu poměru hladiny exprese genu v konformaci On a Off) jsem upravila tak, aby na začátku a na konci obsahovala restriční místa pro klonování. Jelikož hladina genové exprese v *L. tarentolae* je ovlivněna sekvencí tripletu předcházejícího startovacímú kodónu ATG (Lukes et al., 2006), upravila jsem poslední triplet riboswitchu (tzn. triplet těsně předcházející startovacímú kodónu ATG genu eGFP) tak, aby u riboswitchu v pozici On byla exprese genu eGFP co nejvyšší.

Výslednou sekvenci jsem analyzovala v programu Mfold (Zuker, 2003) a dále ji upravila tak, aby i po předchozích změnách byl rozdíl mezi volnými energiemi konformací Off a On přibližně stejný jako u sekvence původní. Původní sekundární struktura a sekvence podle Lynch et al. (2007) je na Obrázku 4.1 a 4.2 vlevo, pro srovnání je zobrazena i upravená sekvence a její struktura (vpravo). Provedené změny jsou barevně vyznačeny na Obrázku 4.1.

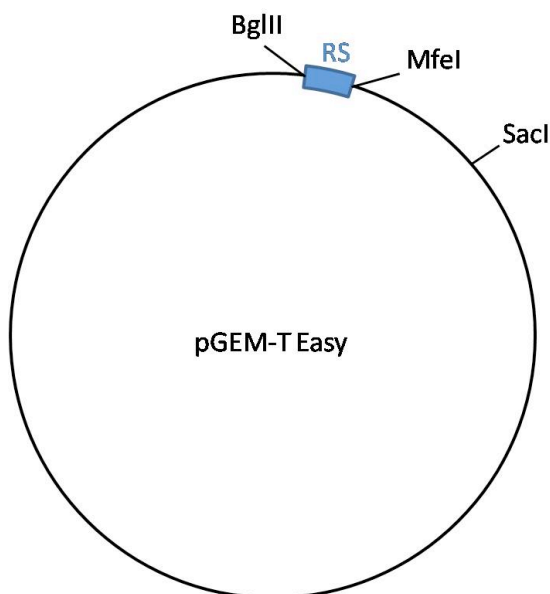
Komplementární DNA sekvence riboswitchu, obě s přidanými A-konci pro následné vložení do plazmidu pGEM-T Easy, jsem objednala jako jednořetězcové oligonukleotidy, 5 minut hybridizovala v 72 °C a metodou A/T klonování vložila do plazmidu pGEM-T Easy (viz nákres na obrázku 4.3).



Obrázek 4.1: Sekundární struktura původní sekvence theophyllinového riboswitchte podle Lynch et al. (2007; vlevo) a námi upravené sekvence (vpravo) v konformaci Off. RNA jsou bez navázaného ligandu, tudíž s překrytým startovacím kodónem (AUG) a ribosome-binding site. Barevně jsou vyznačeny úpravy oproti původní sekvenci. Modře jsou vyznačeny bodové mutace, zeleně delece a červeně je ohraničeno nově vzniklé restrikční místo MfeI.



Obrázek 4.2: Předpokládané sekundární konformace původního (vlevo) a námi upraveného theophyllinového riboswitchu v konformaci On. Z obrázku je vidět, že změna jednotlivých nukleotidů nezměnila strukturu ani v konformaci s navázaným ligandem.

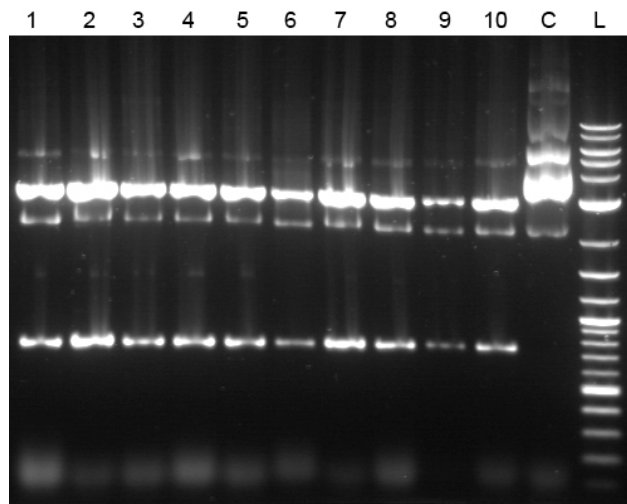
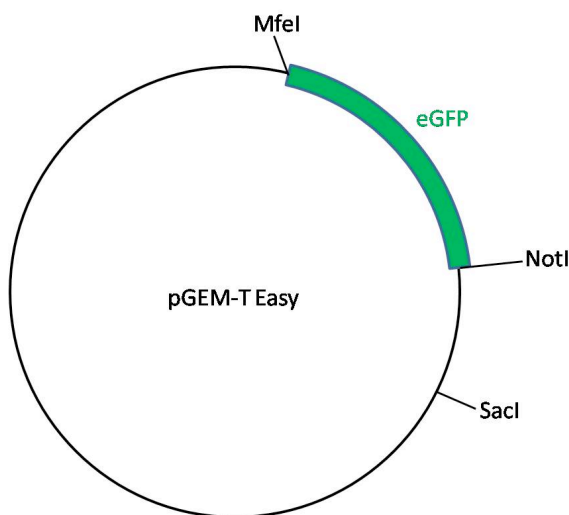


Obrázek 4.3: Schématický náčrt riboswitchu vloženého přes A-konce do vektoru pGEM-T Easy.

Jako další krok jsem amplifikovala eGFP z plazmidu pB49, který nám laskavě poskytl Mgr. Paris z laboratoře prof. Lukeše (Biologické centrum AVČR). Mapa plazmidu je na obrázku 3.2 v části Materiál. Primery jsem navrhla tak, aby těsně před starovacím kodónem genu vzniklo restrikční místo pro MfeI restriktazu a na 3' konci genu restrikční místo pro NotI. Jejich sekvence jsou také

uvedeny v části Metody.

Produkt PCR jsem opět přes A-konce vložila do plazmidu pGEM-T Easy a proces ověřila restrikční analýzou. Schématický náčrt vektoru a restrikční analýza elektroforézou na 1% agarózovém gelu jsou na Obrázku 4.4 a 4.5.

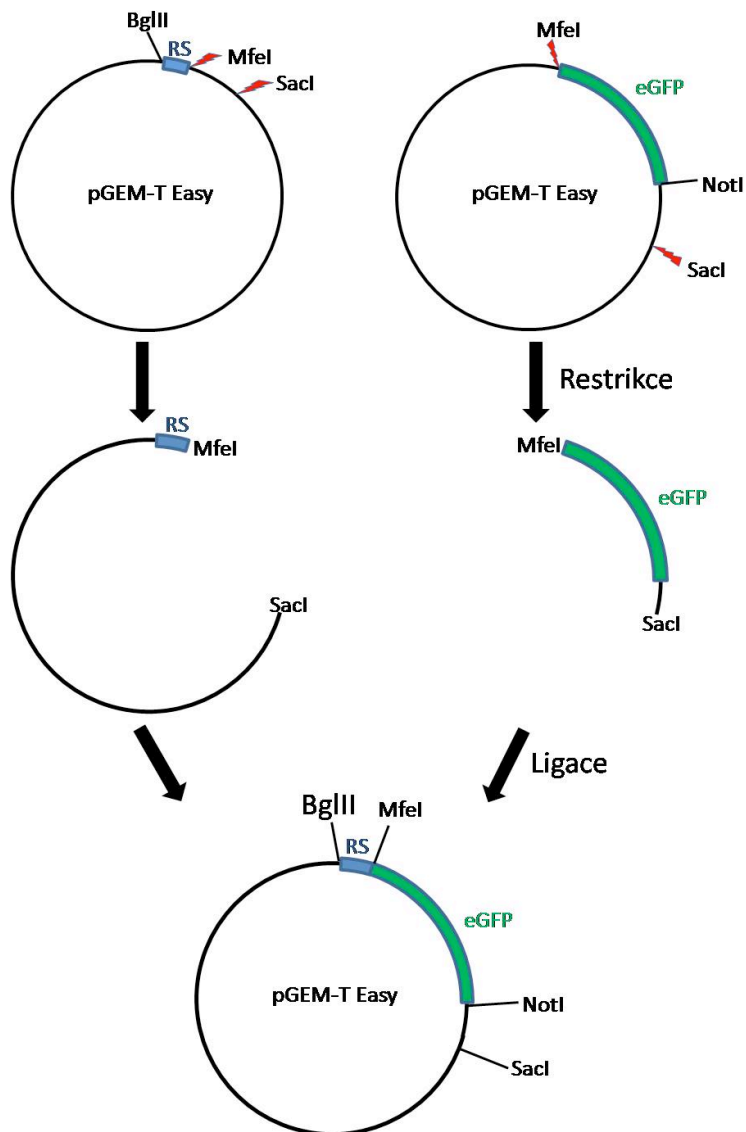


Obrázek 4.4: Schéma vektoru pGEM-T Easy s vloženým genem eGFP.

Obrázek 4.5: Restrikční analýza 10 kolonií transformovaných plazmidem pGEM-T Easy s inzertem eGFP. Nelinearizovaný plazmid je značen písmenem C. Jako restrikční enzymy byly použity MfeI a NotI. Velikost inzertu odpovídá velikosti eGFP s restrikčními místy: 756nt.

Jako další krok jsem oba vektory s vloženými inzerty štěpila enzymy MfeI a SacI. Tím vzniklo ve vektoru s riboswitchem místo pro vložení eGFP. V low-melting agaróze jsem přes vzniklé přesahy ligovala části vektor-riboswitch a eGFP. Schématický náčrt je na Obrázku 4.6.

Vložení eGFP jsem potvrdila restrikční analýzou a nechala osekvenovat firmou MacroGen.



Obrázek 4.6: Schéma restrikce a ligace vektorů pGEM-T Easy s inzerty riboswitch (RS, modře) a eGFP (zeleně). Po restrikci enzymy MfeI a SacI byly odpovídající části vyříznuty a ligovány v low-melting agaróze a daly vznik finálnímu vektoru pGEM-T Easy - RS - eGFP.

4.2.2 Klonování do plazmidu pF4mcsX11.4dBhyg a transfekce *L. tarentolae*

Inzert riboswitch-eGFP jsem přes restrikční místa BglIII a NotI překlonovala do finálního transfekčního vektoru pF4mcsX11.4dBhyg s rezistencí na hygromycin. Tento vektor byl nejprve linearizován restriktaázou SwaI a poté jsem jím metodou elektroporace transfekovala *L. tarentolae*, kmen P10. Sekvence plazmidu je navržena tak, aby se homologní rekombinací integroval do genomu *L. tarentolae* v

místě za promotorem pro RNA polymerázu I, která je zodpovědná za transkripci genu malé ribozomální podjednotky (Misslitz et al., 2000).

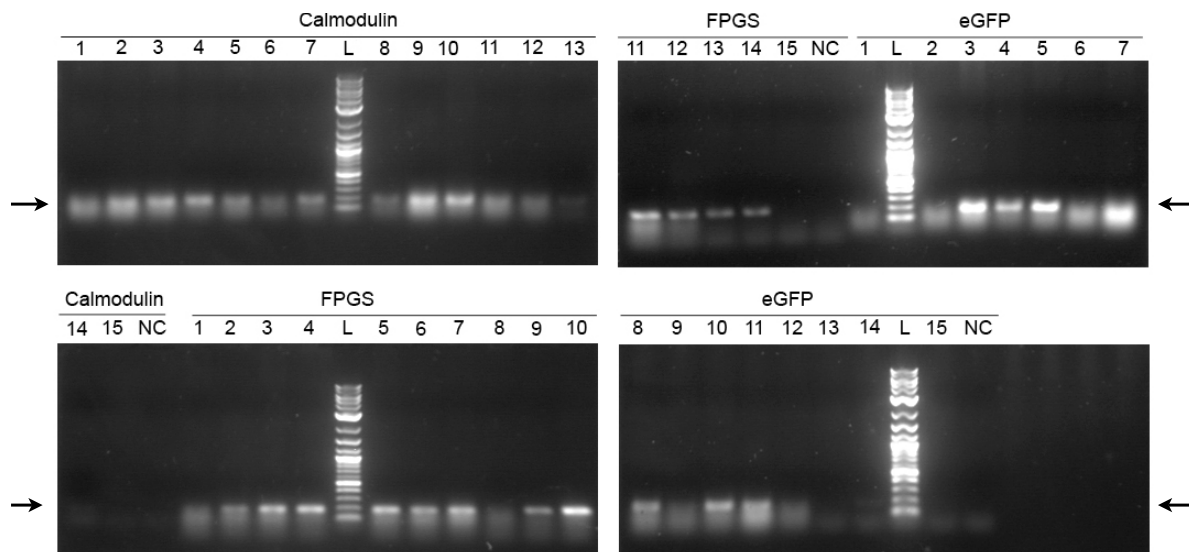
Pro výsledné srovnání hladiny produkce proteinu eGFP v kulturách bez riboswitchu a s riboswitchem jsem *L. tarentolae*, P10 zároveň transfekovala i vektorem obsahujícím pouze eGFP. Negativní kontrolu při následné selekci úspěšně transfekovaných kultur byla transfekce čistou vodou bez plazmidu.

Selekci transfekovaných klonů na antibiotickou rezistenci jsem prováděla na miskách s Whatmanovou membránou (viz Metody - Transfekce). Kultury transfekované vodou bez vektoru nepřežily.

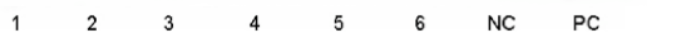
4.3 Testování transfekovaných kultur na přítomnost inzertu

Vybrané kolonie jsem rozpěstovala do 10ml kultur a provedla PCR test pomocí vnitřních eGFP primerů, jejichž sekvence jsou uvedeny v sekci Metody - PCR Screening. Ten přítomnost inzertu potvrdil (viz Obrázek 4.7). Zároveň jsem kolonie testovala i primery nasedajícími na okraj eGFP. Z těchto reakcí jsem nezískala žádný amplikon.

Přestože testy PCR vnitřními primery potvrdily přítomnost inzertu eGFP v kontrolních koloniích bez riboswitchu, ani po rozrostení kultur do 10 ml jsem nepozorovala typicky zelené zbervení proteinu eGFP. Rozhodla jsem se tedy jeho přítomnost analyzovat metodou Western Blotu. Ten produkci proteinu eGFP v kontrolních kulturách nepotvrdil. Analyzovala jsem lyzáty z pěti kultur transfekovaných vektorem pF4mcsX11.4dBhyg-riboswitch-eGFP a dvou kontrolních kultur transfekovaných vektorem pF4mcsX11.4dBhyg-eGFP. Jako negativní kontrolu jsem použila výchozí kulturu *L. tarentolae*, kmen P10 a jako pozitivní kontrolu izolovaný protein eGFP. Na obrázku 4.8 je vidět, že anti-eGFP protilátka se vážala pouze na pozitivní kontrolu a žádná z transfekovaných kultur protein eGFP neexprimuje.



Obrázek 4.7: PCR Screening 12 kultur *L. tarentolae* (očíslované od 4 do 15) po transfekci plazmidem pF4mcsX11.4dBhyg s vloženým inzertem riboswitch-eGFP a tří kontrolních kultur po transfekci vektorem pF4mcsX11.4dBhyg s vloženým genem pro eGFP (1 až 3). NC značí negativní kontrolu, kdy byla místo templátu použita voda. L je označením velikostního DNA markeru. PCR primery pro Calmodulin a FPGS slouží jako pozitivní kontrola. Použité primery u jednotlivých reakcí jsou vyznačeny nad obrázky. Šipky označují amplikon o správné velikosti 180nt.



Obrázek 4.8: Western Blot 5 kultur *L. tarentolae* po transfekci plazmidem pF4mcsX11.4dBhyg s inzertem riboswitch-eGFP (1 až 5), 1 kontrolní kulturu po transfekci vektorem pF4mcsX11.4dBhyg s eGFP (6) a původní kulturu *L. tarentolae* kmen P10 (NC). Pozitivní kontrola proteinu eGFP je označena PC. Z obrázku je patrné, že protein eGFP je přítomen pouze v pozitivní kontrole.

Současně s transfekcí *L. tarentolae* jsem poslala vektory pF4mcsX11.4dBhyg s inzerty riboswitch-eGFP a eGFP sekvenovat. Obdržené sekvence potvrdily neúspěšnou ligaci. Ukázaly, že část eGFP, na které nasedaly primery při PCR screeningu, je ve vektoru přítomna, ale několik desítek nukleotidů na 5' konci a plných 155 nukleotidů na 3' konci sekvence chybí. Následná analýza sekvencí potvrdila, že se jedná o původní plazmid pF4mcsX11.4dBhyg, součástí jehož "stuffer" je invertovaná a deletovaná sekvence eGFP přibližně stejné délky jako inzert riboswitch-eGFP.

5. Diskuze

5.1 Úvod

Cílem mé bakalářské práce byla realizace a testování theophyllinového riboswitchu v eukaryotním organizmu *Leishmania tarentolae*. Tento riboswitch byl testován v prokaryotní *Escherichia coli* (Lynch et al., 2007), nikdo se ale doposud nepokoušel vložit tento riboswitch do eukaryot.

V případě, že by riboswitchová regulace exprese genu v *L. tarentolae* fungovala, mohla by v budoucnu zastoupit či nahradit jiné metody regulace exprese genu na úrovni RNA, a to zejména RNA interferenci u těch zástupců rodu *Leishmania*, u kterých chybí dráha pro RNAi. Dalšími předpokládanými výhodami tohoto systému, které bych v následujících fázích práce testovala, je rychlost odpovědi buňky na přítomnost ligandu, a možnost snížení propustnosti systému v pozici Off oproti RNAi. Další potenciální výhodou je reverzibilita procesu, a to manipulací riboswitchu pouhou výměnou média. Jestliže by další testy tuto skutečnost potvrdily, byl by riboswitch vhodným nástrojem na studium genů, které jsou esenciální pro přežití organismu.

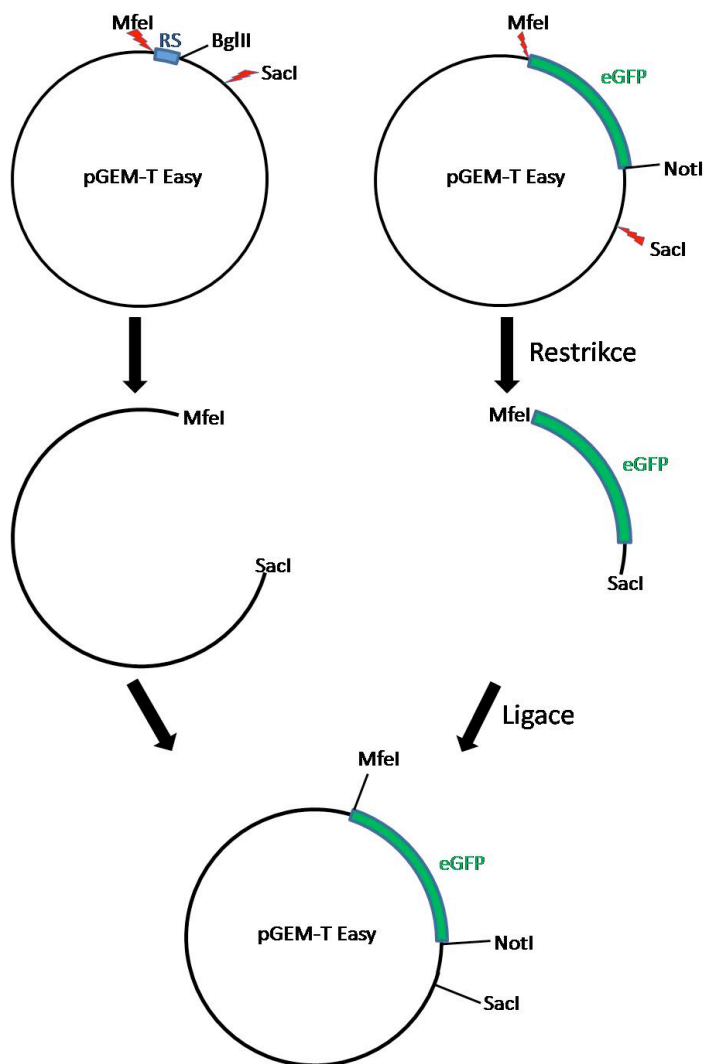
Naopak nevýhodou riboswitchu oproti výše zmíněné RNA interferenci je fakt, že jeho využití u genů s více kopiemi v genomu by bylo komplikované. Musela by se zde brát v potaz skutečnost, že každá kopie genu může mít jinou 5'UTR sekvenci a vkládání riboswitchového konstruktů homologní rekombinací by tedy vyžadovalo přizpůsobit konstrukty 5'UTR oblastem jednotlivým kopiím genu. Dále by regulace genu s více kopiemi vyžadovala selekci na antibiotickou rezistenci při vkládání riboswitchu před každou kopií genu, a to u obou alel jednotlivých kopií. Počet antibiotických rezistencí by zde mohl být limitujícím faktorem.

5.2 Řešení projektu

Prvním předpokladem pro celý projekt testování theophyllinového riboswitchu v *Leishmania tarentolae* byla tolerance theophyllinu jako ligandu organismem. V této fázi jsem srovnávala růstové křivky kultur pěstovaných v médiu bez theophyllinu a s

theophyllinem o různých koncentracích. Testy ukázaly, že organizmy látku snáší dobře, a to do koncentrace 2mM.

V dalším kroku jsem se pokusila vytvořit konstrukt riboswitch-eGFP a vložit ho do transfekčního vektoru pF4mcsX11.4dBhyg. Tuto část projektu se nepodařilo dokončit. Problém nastal již ve fázi, kdy jsem ligovala dvě části konstruktů: riboswitch a gen eGFP. Důvod neúspěšného klonování jsem zjistila při analýze sekvencí plazmidů. Sekvence inzertu riboswitchu v plazmidu pGEM-T Easy ukázala, že inzerť byl vložen v opačné orientaci, než kterou jsem uvažovala při návrhu projektu. Proto další navržený postup, tedy restrikce enzymy MfeI a SacI a následné vložení genu eGFP za riboswitch, pouze zaměnil sekvenci eGFP za riboswitch (viz Obr. 5.1). K ověření jsem použila metodu restrikčních analýz enzymy BglII a NotI, které měly podle návrhu experimentu v tuto chvíli ohraničovat celý inzerť riboswitch-eGFP (813nt). Při analýze elektroforézou na 1% agarózovém gelu byl vidět vyštěpený úsek DNA o velikosti přibližně 813 nukleotidů. Ve skutečnosti šlo ale o samotný gen eGFP bez riboswitchu vyštěpený enzymem NotI, a to jak na 5'-, tak na 3'-konci, kde jsou restrikční místa původní součástí polylinkeru plazmidu pGEM-T Easy. Dohromady s částmi polylinkerů na obou koncích genu eGFP je celková velikost tohoto úseku 792 nukleotidů. Rozdíl ve velikosti o 21 nukleotidech nebylo možné na 1% agarózovém gelu rozeznat a chybně jsem tak předpokládala, že se jedná o námi požadovaný konstrukt.



Obr. 5.1.: Schéma restikce a ligace riboswitchu a eGFP. Jak je na obrázku vidět, opačná orientace riboswitchu způsobila, že restrikční enzymy MfeI a SacI došlo pouze k záměně inzertů riboswitchu a eGFP oproti plánovanému vložení genu eGFP za riboswitch.

Tento inzert jsem posléze vložila do transfekčního vektoru pF4mcsX11.4dBhyg a elektroporací vnesla do *Leishmania tarentolae*. Stejně jsem postupovala při transfekci samotným genem eGFP. Kultury s integrovaným genem eGFP měly sloužit jako kontrola exprese genu při následném testování účinnosti riboswitchu. Po zaintegrování konstruktů do

genomu homologní rekombinací jsem přítomnost genu eGFP v transfekovaných kulturách testovala metodou PCR, která přítomnost testovaného úseku o velikosti 180 nukleotidů potvrdila. Zároveň jsem kultury testovala metodou PCR s pomocí okrajových primerů, tento test přítomnost inzertu nepotvrdil.

Ani u kontrolních kultur transfekovaných samotným genem eGFP jsem ale nezaznamenala produkci proteinu eGFP, která by byla pouhým okem patrná ze zelené barvy densních kultur. Paralelně s PCR testy jsem provedla analýzu Western Blotem. Testovala jsem čtyři kultury s inzertem riboswitch-eGFP a dvě kontrolní kultury se samotným eGFP. Jako pozitivní kontrolu jsem použila izolovaný protein eGFP. Výsledek potvrdil, že v žádné testované kultuře protein eGFP není přítomen. Anti-eGFP protilátka se vážala pouze na pozitivní kontrolu izolovaného proteinu.

Že je ale v transfekčním plazmidu gen eGFP neúplný, potvrdily až výsledky sekvenace. Ty ukázaly, že ve skutečnosti se jednalo o původní plazmid. Jako “stuffer” mezi polylinkery zde totiž slouží invertovaná a deletovaná sekvence eGFP. Je zde přítomen i úsek, na který byly navrženy vnitřní primery pro eGFP, kterými jsem transfekované kultury testovala. Tuto skutečnost dokládá také negativní výsledek testování kultur PCR s použitím okrajových eGFP primerů.

5.3 Závěr

Ve své práci jsem ověřila, že riboswitchový ligand theophylline není pro *L. tarentolae* toxický do koncentrace 2mM v médiu. Při realizaci konstruktů riboswitch-eGFP jsem se setkala s dvěma hlavními problémy, které nedovolily projekt dokončit. Sekvence riboswitchu byla do plazmidu pGEM-T Easy vložena obráceně oproti původnímu záměru, a proto se mi následnou restrikcí a ligací nepodařilo připojit gen eGFP. Došlo pouze k jeho záměně za riboswitch. Druhým problémem bylo vložení inzertu do finálního vektoru pF4mcsX11.4dBhyg, kde se nepodařila výměna kódující sekvence eGFP za původní “stuffer”.

Pro další práci na tomto projektu navrhuji následující postup. Nejprve zopakuji klonování, tak abych získala fúzní komplex riboswitch-eGFP. Po úspěšném vložení tohoto konstruktů do vektoru pF4mcsX11.4dBhyg, vnesu plazmid elektroporací do *L. tarentolae* a klony budu znovu testovat metodou PCR a Southern Blot na přítomnost celého konstruktů. U klonu s přítomným inzertem přistoupím k testování funkce riboswitchu.

Úroveň transkripce eGFP stanovím metodou Northern Blot a množství proteinu eGFP metodou Western Blot. Obojí bude provedeno v pozici riboswitchu On za přítomnosti theophyllinu a v pozici Off bez ligandu v médiu. Výsledky budou srovnány s výsledky stejných testů provedených na kontrolních kulturách *L. tarentolae* stabilně exprimujících protein eGFP.

6. Literatura

Balaña-Fouce R, Reguera RM. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids?. *Trends Parasitol* (2007) vol. 23 pp. 348-351.

Benaim G, Szabo V, Cornivelli L. Isolation and characterization of calmodulin from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. *Acta Cient Venez* (1987) vol. 38 pp. 289-291.

Biebinger S, Wirtz LE, Lorenz P, Clayton C. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* (1997) vol. 85 pp. 99-112.

Cech TR, Zaugg AJ, Grabowski PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* (1981) vol. 27 pp. 487-496.

Chen Y, Hung CH, Burdener T, Lee GS. Development of RNA interference revertants in *Trypanosoma brucei* cell lines generated with a double stranded RNA expression construct driven by two opposing promoters. *Mol Biochem Parasitol* (2003) vol. 126 pp. 275-279.

Čepička I, Lukeš J, Vávra J. Protozoologie. In: Volf P, Horák P. (Eds.), *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha (2007) pp. 50-137.

DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* (2004) vol. 133 pp. 175-186.

Davidson EA, Ellington AD. Engineering regulatory RNAs. *Trends Biotechnol* (2005) vol. 23 pp. 109-112.

Desai SK, Gallivan JP. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc* (2004) vol. 126 pp. 13247-13254.

Djikeng A, Shi H, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* (2001) vol. 7 pp. 1522-1530.

Drew ME, Morris JC, Wang Z, Wells L, Sanchez M, Landfear SM, Englund PT. The adenosine analog tubercidin inhibits glycolysis in *Trypanosoma brucei* as revealed by an RNA interference library. *J Biol Chem* (2003) vol. 278 pp. 46596-46600.

Durand-Dubief M, Bastin P. TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol* (2003) vol. 1 pp. 2.

Durand-Dubief M, Kohl L, Bastin P. Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* (2003a) vol. 129 pp. 11-21.

Fadili AE, Kundig C, Ouellette M. Characterization of the folylpolyglutamate synthetase gene and polyglutamylolation of folates in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* (2002) vol. 124 pp. 63-71.

Gottesman S, The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* (2004) vol. 58 pp. 303-328.

Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* (1983) vol. 35 pp. 849-857.

Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* (2003) vol. 278 pp. 22877-22886.

Hanson S, Bauer G, Fink B, Suess B. Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA* (2005) vol. 11 pp. 503-511.

Hoe NP, Goguen JD. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* (1993) vol. 175 pp. 7901-7909.

Isaacs FJ, Dwyer DJ, Ding C, Pervouchine DD, Cantor CR, Collins JJ. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol* (2004) vol. 22 pp. 841-847.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RMR, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* (2005) vol. 309 pp. 436-442.

Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* (2002) vol. 110 pp. 551-561.

Laban A, Wirth DF. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) vol. 86 pp. 9119-9123.

Levine HA, Nilsen-Hamilton M. A mathematical analysis of SELEX. *Comput Biol Chem* (2007) vol. 31 pp. 11-35.

Li Y, Breaker RR. Deoxyribozymes: New players in the ancient game of biocatalysis. *J Am Chem Soc* (1999) vol. 121 pp. 5364-5372.

Li Z, Wang CC. A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* (2003) vol. 278 pp. 20652-20658.

Lynch SA, Desai SK, Sajja HK, Gallivan JP. A High-Throughput Screen for Synthetic Riboswitches Reveals Mechanistic Insights into Their Function. *Chem Biol* (2007) vol. 14 pp. 173-184.

Madison-Antenucci S, Sabatini RS, Pollard VW, Hajduk SL. Kinetoplastid RNA-editing-associated protein 1 (REAP-1): a novel editing complex protein with repetitive domains. *EMBO J* (1998) vol. 17 pp. 6368-6376.

Massé E, Escorcía FE, Gottesman S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* (2003) vol. 17 pp. 2374-2383.

Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) vol. 99 pp. 4620-4625.

Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam

D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* (2005) vol. 309 pp. 436-442.

Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* (2002) vol. 111 pp. 747-756.

Misslitz et al. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania amastigotes*. *Mol Biochem Parasitol* (2000) vol. 107 pp. 251-261.

Morris JC, Wang Z, Drew ME, Paul KS, Englund PT. Inhibition of bloodstream form *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using the pZJM dual T7 vector. *Mol Biochem Parasitol* (2001) vol. 117 pp. 111-113.

Motyka SA, Englund PT. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* (2004) vol. 7 pp. 362-368.

Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR. Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* (2004) vol. 32 pp. 143-150.

Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) vol. 95 pp. 14687-14692.

Panigrahi AK, Gygi SP, Ernst NL, Igo RP, Palazzo SS, Schnauffer A, Weston DS, Carmean N, Salavati R, Aebersold R, Stuart KD. Association of two novel proteins, TbMP52 and TbMP48, with the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex. *Mol Cell Biol* (2001) vol. 21 pp. 380-389.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LRO, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* (2007) vol. 39 pp. 839-847.

Robinson KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* (2003) vol. 128 pp. 217-228.

Rusché LN, Cruz-Reyes J, Piller KJ, Sollner-Webb B. Purification of a functional enzymatic editing complex from *Trypanosoma brucei* mitochondria. *EMBO J* (1997) vol. 16 pp. 4069-4081.

Shi H, Djikeng A, Mark T, Wirtz E, Tschudi C, Ullu E. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA* (2000) vol. 6 pp. 1069-1076.

Shi H, Djikeng A, Tschudi C, Ullu E. Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol* (2004a) vol. 24 pp. 420-427.

Shi H, Ullu E, Tschudi C. Function of the Trypanosome Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain. *J Biol Chem* (2004b) vol. 279 pp. 49889-49893.

Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* (2003) vol. 9 pp. 644-647.

Tang J, Breaker RR. Structural diversity of self-cleaving ribozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) vol. 97 pp. 5784-5789.

Thompson KM, Syrett HA, Knudsen SM, Ellington AD. Group I aptazymes as genetic regulatory switches. *BMC Biotechnol* (2002) vol. 2 pp. 21.

Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* (1998) vol. 282 pp. 296-298.

Winkler WC, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* (2002) vol. 419 pp. 952-956.

Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* (2004) vol. 428 pp. 281-286.

Yen L, Svendsen J, Lee J, Gray JT, Magnier M, Baba T, D'amato RJ, Mulligan RC. Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* (2004) vol. 431 pp. 471-476.

Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J* (2003) vol. 22 pp. 6016-6026.

Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* (2003) vol. 31 pp. 3406-3415.