

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Lenka Pacáková

4. ročník, Biologie

**Povrchové glykokonjugáty leishmanií a jejich
interakce s imunitním systémem hostitele**

**Surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites and their
interactions with immune system of vertebrate host**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tereza Leštinová, Ph.D.

Praha 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 05. 2017

Lenka Pacáková

Poděkování

Mé poděkování patří vedoucí bakalářské práce RNDr. Tereze Leštinové, Ph.D. nejen za cenné rady a věnovaný čas, ale také za pomoc při výběru zajímavého tématu.

Seznam použitých zkratk:

APC – antigen prezentující buňka

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GIPL – glykoinositolfosfolipid

gp – glykoprotein

GPI – glykofosfatidylinositol

IFN – interferon

IL – interleukin

iNOS – inducibilní NO syntáza

KMP – kinetoplastový membránový protein

L. – *Leishmania*

LPG – lipofosfoglykan

LPS – lipopolysacharid

mPPG – membránově vázaný proteofosfoglykan

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NETs – neutrofilní extracelulární past

NO – oxid dusnatý

PG – fosfoglykan

PKC – protein kináza C

PSG – sekreční gel promastigotů

ROS – reaktivní formy kyslíku

Th – pomocné T lymfocyty

TNF – tumor nekrotizující faktor

V. – *Viannia*

WHO – Světová zdravotnická organizace

Abstrakt

Leishmanie musí po vstupu do obratlovčího hostitele čelit obranným mechanismům hostitelské imunity a proniknout do cílové buňky – makrofága, kde jejich vývoj pokračuje. Evoluční strategií leishmanií vyvinutou k přelstění imunitního systému obratlovce, jsou mimo jiné jejich povrchové glykokonjugáty. Mezi nejvýznamnější povrchové glykokonjugáty patří lipofosfoglykany, glykoinositolfosfolipidy, membránově vázané proteofosfoglykany a metaloproteázy gp63, které leishmaniím pomáhají odolávat lýzi komplementem, antimikrobiálním účinkům produktů neutrofilů a zprostředkovat vazbu na makrofágy. Intracelulárně pak moduluji signalizační dráhy, které vedou k produkci cytokinů, směřujících polarizaci imunitní odpovědi ve prospěch Th2. Výsledkem tohoto přesměrování je vyhnutí se účinkům toxického NO, čímž je ustanovena chronicita infekce. Glykokonjugáty jsou rozsáhle zkoumány jako účinná složka potenciálních vakcín, chránících obratlovce před nákazou či bránících zpětnému přenosu leishmanií na bezobratlého vektora, čímž zamezují dalšímu šíření infekce.

Klíčová slova: leishmanie, lipofosfoglykan, glykoinositolfosfolipid, proteofosfoglykan, gp63, imunitní odpověď, makrofág

Abstract

Leishmania parasites have to overcome host immune defence mechanisms upon entering a vertebrate host and penetrating into the target cell – a macrophage where their development continues. The evolutionary strategy of leishmania parasites developed to evade immune system of the vertebrate is among others based on their surface glycoconjugates. The most important glycoconjugates are lipophosphoglycans, glycoinositolphospholipids, metalloproteases gp63 and membrane-bound proteophosphoglycans, which help leishmania parasites to withstand lysis by complement, antimicrobial products of neutrophils, and mediate binding to macrophages. Intracellularly, they modulate signaling pathways that lead to the production of cytokines targeting the immune response polarization in favour of Th2. The result of this redirection is evasion of toxic NO effects leading to establishment of the chronicity of the infection. Glycoconjugates are extensively investigated as an efficient component in the development of vaccines to protect vertebrates from infection or to inhibit the reverse transfer to an invertebrate host and thereby prevent further infection spread.

Keywords: leishmania, lipophosphoglycan, glycoinositolphospholipid, proteophosphoglycan, gp63, immune response, macrophage

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CHARAKTERISTIKA LEISHMANIÍ	3
3	KLASIFIKACE POVRCHOVÝCH GLYKOKONJUGÁTŮ	6
3.1	LIPOFOSFOGLYKAN	6
3.1.1	Struktura a variabilita lipofosfoglykanu	7
3.1.2	Interakce lipofosfoglykanu s imunitním systémem	8
3.2	GLYKOINOSITOLFOSFOLIPID	9
3.2.1	Struktura a variabilita glykoinositolfosfolipidu	10
3.2.2	Interakce glykoinositolfosfolipidu s imunitním systémem	10
3.3	GP63	11
3.3.1	Struktura a biosyntéza gp63	12
3.3.2	Interakce gp63 s imunitním systémem	12
3.4	MEMBRÁNOVĚ VÁZANÝ PROTEOFOSFOGLYKAN	14
3.4.1	Struktura membránově vázaného proteofosfoglykanu	15
3.4.2	Interakce proteofosfoglykanu s imunitním systémem	15
4	LÉČBA, PROFYLAXE A ROLE GLYKOKONJUGÁTŮ VE VÝVOJI VAKCÍN	16
5	ZÁVĚR	18
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	20

1 Úvod

Leishmanióza patří podle světové zdravotnické organizace (WHO) spolu s malárií, spavou nemocí a Chagasovou chorobou mezi nejvíce zanedbávaná parazitární onemocnění světa způsobená prvoky. Leishmaniózu způsobují prvoci rodu *Leishmania* a její rozšíření je spojeno s výskytem přenašečů, flebotomů, žijících převážně v tropických a subtropických oblastech celého světa. Nejblíže se s leishmaniózou můžeme setkat v oblasti Středozemního moře. Čím dál častěji jsou hlášeny případy onemocnění i ve vyspělých zemích. Na vině tomu je rozvoj cestování do tropických oblastí a nedostatečná ochrana před flebotomy (shrnutí v Oryan a Akbari, 2016).

Boj s leishmaniózou je soustředěn do několika okruhů. Příkladem je snaha o snížení počtu flebotomů za použití insekticidů či bránění kontaktu člověka s potenciálně nakaženým hmyzem za pomoci ochranných sítí a repelentů. Usiluje se také o snížení počtu infikovaných rezervoárových hostitelů, např. vakcinací psů na území jižní Evropy. Největší naděje jsou v současnosti vkládány především do vývoje účinné vakcíny pro člověka (WHO, 2016).

Kontakt leishmanií s imunitním systémem hostitele je zprostředkován skrze jejich povrch, specifický přítomností membránově vázaných glykokonjugátů, které sehrávají důležitou roli jak v bezobratlém, tak v obratlovčím hostiteli (shrnutí v Assis et al., 2012). V této bakalářské práci se zaměřím na čtyři hlavní povrchové glykokonjugáty leishmanií, na rozdíly v jejich zastoupení a chemické struktuře u dvou hlavních morfologických forem střídajících se v životním cyklu tohoto parazita. Jmenovitě se budu zabývat lipofosfoglykany, glykoinositolfosfolipidy, metaloproteázou gp63 a membránově vázanými proteofosfoglykany. Zaměřím se na jejich působení v těle obratlovčího hostitele od doby, kdy do něj byly leishmanie inokulovány prostřednictvím hmyzího vektora.

Nejdůležitějšími funkcemi povrchových glykokonjugátů v obratlovčím hostiteli je odolávání lytickým účinkům komplementu a pomoc při adhezi na hostitelskou buňku, již bývají většinou nejdříve neutrofilů, které se k místu inokulace dostávají jako první a posléze makrofágy, které jsou pro leishmanie buňkami cílovými (shrnutí v Morais et al., 2015). V makrofázích se poté leishmanie brání prostřednictvím těchto glykokonjugátů destruktivním dějům jako je oxidativní vzplanutí či okyselení parazitoforní vakuoly oddálením fúze s

pozdními endozómy. Dále glykokonjugáty zamezují produkci zánětlivých cytokinů a pomáhají leishmaniím čelit dalším antimikrobiálním zbraním imunitního systému.

Na závěr se budu zabývat současným stavem výzkumu vakcín proti leishmanióze souvisejícím s využitím glykokonjugátů jako cílových molekul. Důležitost těchto molekul a jejich výše zmíněných funkcí, svědčí o jejich způsobilosti stát se předmětem výzkumu pro vývoj očkování a případně i vznik budoucích léčiv.

2 Charakteristika leishmanií

Rod *Leishmania* patří spolu s dalšími příslušníky čeledi Trypanosomatidae mezi jednobuněčná eukaryota vyznačující se dvouhostitelským parazitickým způsobem života. K přenosu leishmanií na obratlovčího hostitele dochází prostřednictvím samiček drobného dvoukřídleho hematofágního hmyzu rodu *Phlebotomus* s výskytem ve Starém Světě a rodu *Lutzomyia* v Novém Světě (shrnutí v Sharma a Singh, 2008; Steverding, 2017).

V životním cyklu leishmanií se střídají dvě základní morfologické formy. V bezobratlém hostiteli se paraziti nachází ve formě pohyblivých promastigotů, s bičíkem umístěným v přední části buňky, zatímco v obratlovčím hostiteli jsou leishmanie lokalizovány intracelulárně především ve fagolysosomech makrofágů. Tyto zdánlivě nepohyblivé formy kulatého tvaru, postrádající viditelný bičík, se nazývají amastigoti (shrnutí v Liévin-Le Moal a Loiseau, 2015). Leishmanie se mohou kromě makrofágů vyskytovat také uvnitř dalších profesionálních fagocytů, např. neutrofilů a dendritických buněk (shrnutí v Feijó et al., 2016).

Životní cyklus začíná nasátím infikovaných makrofágů flebotomem. V jeho střevě je po nasátí vylučována chitinózní vrstva, obalující nasátou krev, známá pod názvem peritrofická matrix (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Uvnitř této kapsule jsou amastigoti uvolněni z makrofágů a prodělávají diferenciaci na procyklické promastigoty (uvedeno například v Teixeira et al., 2013; Inbar et al., 2017). Procykličtí promastigoti se po degeneraci peritrofické matrix diferencují na nektomonádní promastigoty (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Nektomonádní forma promastigotů se vyvíjí již mimo peritrofickou matrix a uchycuje se ke střevnímu epitelu. Tímto způsobem se promastigoti vyhnou defekaci s nestrávenými zbytky krve. Časem je vazba ke střevnímu epitelu uvolněna a promastigoti migrují do přední části střeva, kde se z nich stávají leptomonádní promastigoti (Rogers et al., 2002). Tito promastigoti pak dávají vzniknout buďto haptomonádám, přichyceným bičíkem ke stomodeální valvě (Killick-Kendrick et al., 1974), nebo se diferencují na vysoce pohyblivé metacyklické promastigoty. Metacykličtí promastigoti infikují obratlovčího hostitele při sání nakaženého flebotoma (Gossage et al., 2003). Spolu s leishmaniami jsou do hostitele vpraveny i sliny flebotoma, u nichž byl prokázán efekt usnadňující uchycení infekce (tzv. enhancing efekt slin) (Titus a Ribeiro, 1988), obsah exosomů leishmanií a sekreční gel promastigotů (tzv. PSG) (Stierhof et al., 1999; Atayde et al., 2015). Tento gel je produkován leptomonádami v přední části zažívacího traktu hmyzího vektora a díky němu mají leishmanie

větší šanci dostat se do obratlovčího hostitele. Je to dáno tím, že se nakažený hmyz snaží sát opakovaně v důsledku ucpaného trávicího traktu (Rogers et al., 2002).

Po inokulaci do obratlovčího hostitele musí promastigoti odolávat sérovým složkám imunity, navázat se na hostitelskou buňku a indukovat fagocytózu. Podle hypotézy trojského koně slouží neutrofilů jako prozatímní úkryt zprostředkující leishmaniím tichý vstup do makrofágů (Peters et al., 2008). V rozporu s touto hypotézou je strategie trojského králíka, kdy leishmanie unikají z apoptotizujícího neutrofilu a napadají namigrované makrofágy (Ritter et al., 2009). Uvnitř fagocytů vzniká tzv. parazitoformní vakuola, kde specifické podmínky jako vyšší teplota a nižší pH, spouští diferenciaci promastigotů na amastigoty. Tyto kulaté formy se uvnitř makrofágů množí, dokud nedojde k jeho ruptuře a uvolnění amastigoti mohou být fagocytováni dalšími makrofágy v okolí (shrnutí v Sharma a Singh, 2008).

Leishmanie mohou způsobovat řadu patologických projevů souhrnně označovaných leishmanióza. Na základě odlišných symptomů infekce byly popsány tři základní formy: kutánní (kožní), muko-kutánní (kožně-slizniční) a viscerální (útrobní). Klinický průběh onemocnění závisí nejen na druhu leishmanie, ale např. i na genetické predispozici a stavu imunitního systému hostitele (shrnutí v Pace, 2014).

Nejlehčí průběh mívá zpravidla forma kutánní, při níž infikované makrofágy zůstávají lokalizovány v kůži. Projevuje se kožní lézí, která se po čase většinou sama zhojí a zanechává jizvu s častým negativním psychosociálním dopadem pro postižené osoby (shrnutí v David a Craft, 2009). S kožní leishmaniózou jsou obvykle spojovány druhy *Leishmania (L.) major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. Viannia (V.) braziliensis*, *L. panamensis* a *L. amazonensis* (shrnutí v Monge-Mailo, 2013, Akhoundi et al., 2016).

Muko-kutánní forma, nazývaná také espundia, je nejčastěji působená druhem *L. (V.) braziliensis* a mívá zpočátku stejný průběh jako forma kožní. Po čase však napadá i měkké chrupavčité tkáně, což může vést k jejich vážné destrukci (shrnutí v David a Craft, 2009).

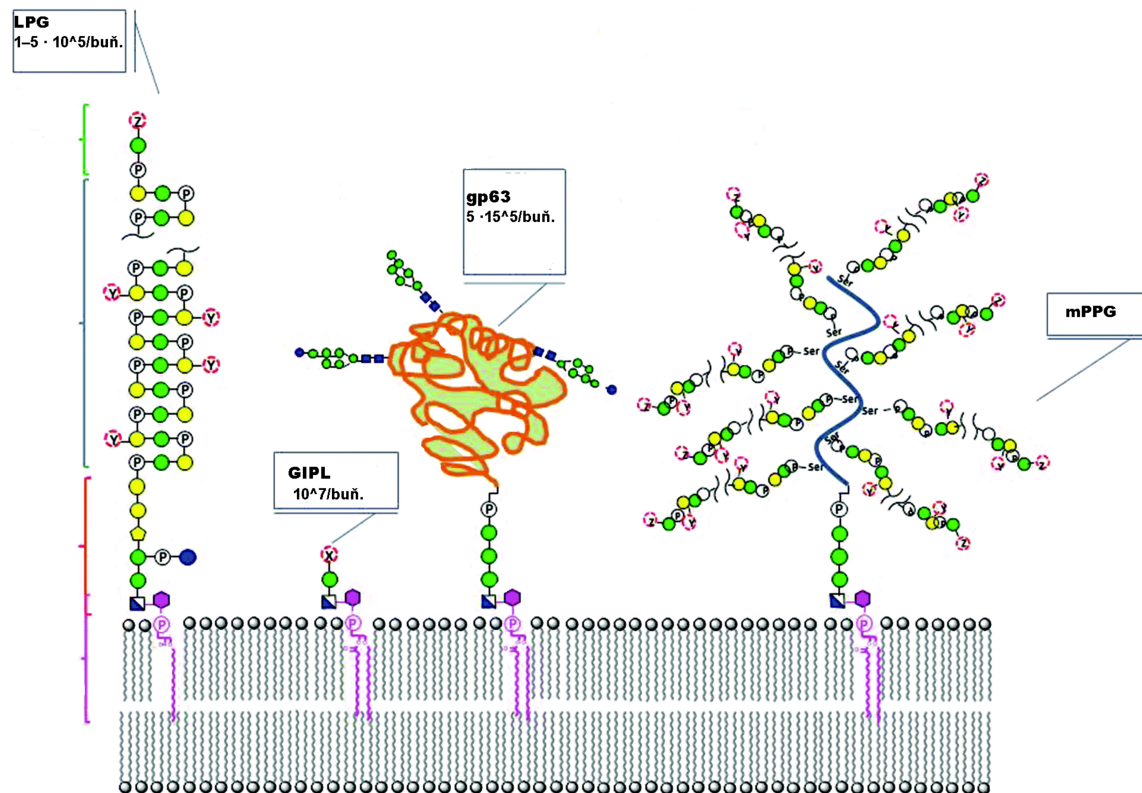
Nejzávažnější projevy mívá zpravidla forma viscerální, známá také pod názvem kala-azar. Napadené makrofágy jsou zaneseny krevním řečištěm do vnitřních orgánů (zejména jater, sleziny a kostní dřeně), kde leishmanie po namnožení napadají další makrofágy. Viscerální leishmanióza je často spojována s druhy *L. donovani* a *L. infantum* a pokud není léčena, zpravidla končí smrtí (WHO, 2013). Po prodělání viscerální leishmaniózy se může projevit post-kala-azar kožní leishmanióza, která se projevuje rozestými papulami v kůži

sloužícími jako významný zdroj infekce pro flebotomy (shrunuto v David a Craft, 2009; WHO, 2012; Pace, 2014).

Leishmanióza je rozšířena na území 98 států a má na svědomí 20–40 tisíc úmrtí ročně. Více než 90 % nových případů je uváděno z Afghánistánu, Alžírsko, Bangladéše, Bolívie, Brazílie, Kolumbie, Etiopie, Indie, Iránu, Peru, Jižního Súdánu, Súdánu a Sýrie (WHO, 2016). Geografické rozšíření všech forem leishmaniózy se prolíná, může se ale lišit rozloha zasaženého území (Alvar et al., 2012).

Úspěšnost leishmanií závisí na ochranných mechanismech, které si tyto parazité vyvinuli v průběhu evoluce. Jednou z mnoha zbraní těchto parazitů jsou glykokonjugáty zasazené do povrchové membrány a měnící své poměrné zastoupení a chemické složení v závislosti na prostředí, ve kterém se právě vyskytují tak, aby jim pomáhaly překonat nepříznivé podmínky, které jsou projevem hostitelské imunitní odpovědi.

3 Klasifikace povrchových glykokonjugátů



obrázek převzat a upraven z review Cabezas et al., 2015

3.1 LIPOFOSFOGLYKAN

Všechny druhy leishmanií exprimují na svém povrchu lipofosfoglykan (LPG) vázaný glykofosfatidylinositolovou (GPI) kotvou k membráně parazita. Zatímco u promastigotů jde o nejhojněji exprimovaný povrchový glykokonjugát, u amastigotů je tvorba LPG výrazně redukována a u některých druhů dokonce zcela chybí (McConville a Blackwell, 1991). Tato molekula se uplatňuje v útrokách hmyzího hostitele – flebotoma, v němž sehraává roli například při adhezi na jeho střevní stěnu, čímž se brání vypuzení z těla hmyzu spolu s nestrávenými zbytky krve (Pimenta et al., 1992). Toto tvrzení však platí pouze pro specifického přenašeče, jelikož u permissivního přenašeče plní tuto úlohu jiné molekuly

leishmanií (Myšková et al., 2007). Více je o LPG ovšem známo ve spojitosti s obratlovčím hostitelem, kde se tento glykokonjugát účastní dějů podmiňujících virulenci leishmanií (shrnutí v Forestier et al., 2014).

3.1.1 Struktura a variabilita lipofosfoglykanu

Komplexní makromolekula LPG je složená ze čtyř domén, kterými jsou GPI kotva, glykanové jádro, lineární fosfoglykanový (PG) řetězec a terminální oligosacharidová čepička (shrnutí v Forestier et al., 2014).

Zatímco určité části LPG jsou u všech druhů leishmanií identické (lipidová kotva, glykanové jádro a lineární PG) (shrnutí v Forestier et al., 2014), některé komponenty se mohou ve struktuře LPG lišit na úrovni mezidruhové, vnitrodruhové či dokonce interstadiální (shrnutí v Forestier et al., 2014). Častými rozdíly jsou modifikace postranních řetězců PG a složení oligosacharidové čepičky (shrnutí v Assis et al., 2012).

V souvislosti se změnou prostředí z bezobratlého na obratlovčího hostitele, a nutností se tomuto prostředí přizpůsobit, prochází struktura LPG během metacyklogeneze výraznou metamorfózou (McConville et al., 1992). Nárůstá počet jednotek PG v molekule LPG, čímž se celá molekula LPG u metacyklických promastigotů dvojnásobně prodlouží a v poměru k této délce se glykokonjugát jeví řídkěji glykosylován (Sacks et al., 1990). Změnou prochází také koncová sacharidová čepička, u které dochází k výměně galaktosidových zbytků za arabinopyranosidové. Cukerná proměna má význam při uvolnění vazby z receptorů na střevním epitelu flebotoma (Sacks et al., 1990; McConville et al., 1992; Sacks et al., 1995). Odlišnosti druhů a kmenů leishmanií ve složení LPG se projevují schopností infikovat vždy pouze několik konkrétních druhů bezobratlého hostitele. Jeden druh či kmen leishmanií infekční pro určitý druh flebotoma tedy nemusí být infekční pro jiný druh tohoto hmyzu (McConville et al., 1992; Sacks et al., 1995; Mahoney et al., 1999; Soares et al., 2002; 2004; Dobson et al., 2003). V obratlovčím hostiteli se tato proměna sacharidového zakončení LPG projevuje nově nabytou schopností vázat se na makrofágy (Sacks et al., 1990; McConville et al., 1992; Sacks et al., 1995). V závislosti na povaze koncových cukerných zbytků a pozici substituentů na PG byly popsány 3 typy LPG (shrnutí v Forestier et al., 2014). U druhu *L. donovani* je například známo, že její LPG nemá žádné postranní substituenty, a tak zůstává její řetězec nevětvený (Sacks et al., 1995). Oproti tomu má *L. tropica* LPG glykosylovaný

na C₃ pozici galaktózy a u druhu *L. aethiopica* je LPG obvykle manosylován na pozici C₂ manózy (McConville et al., 1995).

3.1.2 Interakce lipofosfoglykanu s imunitním systémem

Metacykličtí promastigoti, kteří disponují prodlouženým LPG (viz kapitola 3.1.1.), jsou na rozdíl od procyklických forem odolní proti působení komplementu. Lytický pór komplementové kaskády se na povrchu metacyklů sice sestaví, ale délka LPG neumožní póru, složeného z podjednotek C5b-C9, dosáhnout až k membráně parazita a způsobit jeho lýzi (Puentes et al., 1990).

Navázaný komplement na povrchu parazita působí jako opsonin a usnadňuje leishmaniím, díky vazbě na komplementový receptor makrofágů (CR3), internalizaci do těchto fagocytů (Blackwel, 1985; Blackwell et al., 1985). K vazbě na makrofágy leishmaniím přispívá také vazba LPG skrze lektinové receptory (Handman a Goding, 1985).

Pro optimální fungování metabolismu leishmanií uvnitř fagozómu vyžadují promastigoti a amastigoti odlišné podmínky prostředí. Zatímco promastigoti leishmanií prosperují při neutrálním pH, amastigoti jsou přizpůsobeni k životu za nižšího, kyselého pH (4–5,5) (Mukkada et al., 1985). Aby promastigoti zamezili okyselení prostředí parazitoforní vakuoly, využívají LPG (repetitivních jednotek glykanového jádra). Tyto jednotky jsou schopny oddálit fúzi parazitoforní vakuoly s pozdními endozómy a lysozómy, jenž obsahují hydrolázy nebezpečné pro promastigoty (Desjardins a Descoteaux, 1997; Dermine et al., 2000). Dochází k tomu tak, že LPG způsobuje akumulaci F-aktinu kolem fagozómu a tím mechanicky brání fúzi s endozómem (Holm et al., 2001). Po přeměně na amastigota se schopnost fúze fagozómu s endozómy obvykle obnoví depolymerizací perifagozomálního F-aktinu (Allen a Aderem, 1995). Neplatí to však pro všechny druhy leishmanií, např. promastigoti *L. donovani* nejsou schopni inhibovat rozpad perifagozomálního F-aktinu, a tak u nich dochází k normální maturaci fagozómu (Winberg et al., 2007).

LPG se podílí na inhibici produkce superoxidových iontů, které jsou pro leishmanie toxické. Superoxidové anionty jsou produkovány v ději zvaném oxidační vzplanutí, jehož se účastní enzymový komplex NADPH oxidáza. Tento komplex enzymů je složený z jedné s membránou asociované jednotky a tří volných cytosolických jednotek, které se po aktivaci makrofágu sestaví na membráně fagozómu a tvoří zde funkční komplex (shrnuto v Moradin a

Descoteaux, 2012). LPG konkrétně zabraňuje sestavení podjednotek NADPH oxidázy na membráně fagozómu odloučením cytosolických složek komplexu z membrány (Frankenburg et al., 1990; Vilhardt a Van Deurs, 2004; Lodge et al., 2006).

Během fagocytózy se molekuly LPG z povrchu leishmanie dostávají na povrch vnitřní membrány fagozómu (Tolson et al., 1990), kde se začleňují do lipidových raftů (struktur bohatých na cholesterol), zapříčiňují jejich rozpad a brání jejich dalšímu vzniku (Dermine et al., 2005). Tyto membránové struktury mají význam v mnohých procesech: jsou v nich například soustředěny proteiny podílející se na již zmíněné fúzi dvou membrán, na přenosu signálu, uspořádání F-aktinu a oxidativním vzplanutí. Při narušení lipidových mikrodomén proto dochází ke snížení produkce kyslíkových radikálů a oslabení dalších obranných protiparazitických složek imunity (Holm et al., 2001; Vilhardt a Van Deurs, 2004).

Proudfoot et al. (1996) zjistili, že LPG má za následek snížení exprese indukibilní NO syntázy (iNOS) a s tím související produkce oxidu dusnatého (NO), avšak pouze za předpokladu, že makrofág nebyl předem stimulován bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). V takovém případě byl účinek opačný a přidaný LPG vyvolal zvýšenou expresi iNOS a s tím související produkci NO (Proudfoot et al., 1996).

Výše popsané imunomodulační schopnosti LPG nemusí být platné pro všechny druhy leishmanií. Názorným příkladem je LPG druhu *L. mexicana*, kdy mutanti *L. mexicana*, kteří neexprimovali LPG, byli stejně virulentní jako leishmanie téhož druhu se zachovalým genem pro LPG (Ilg, 2000).

3.2 GLYKOINOSITOLFOSFOLIPID

Glykoinositolfosfolipidy (GIPL) jsou povrchové glykokonjugáty strukturou blízce příbuzné LPG. U promastigotů druhů *L. (V.) panamensis* a *L. (V.) braziliensis* lze pozorovat sníženou expresi LPG. Tuto ztrátu však kompenzuje zvýšená exprese GIPL, což nasvědčuje o vzájemné zastupitelnosti těchto dvou glykokonjugátů (Zawadzki et al., 1998; Silveira et al., 2005). V návaznosti na zjištění deficitu LPG bylo u druhu *L. (V.) braziliensis* popsáno, že asi 85 % jejich povrchových GIPL je lokalizováno v lipidových raftech, jejichž význam byl popsán výše (viz kapitola 3.1.2.). Při rozpuštění lipidových raftů detergentem byla prokazatelně snížena životaschopnost zkoumaného druhu (Yoneyama et al., 2006). Vysoká

přítomnost GIPL v lipidových raftech druhů leishmanií, které pozbývají LPG, nasvědčuje tomu, že by tyto molekuly mohly nahrazovat funkce LPG i v těchto strukturách.

Expresie GIPL je na povrchu promastigotů i amastigotů přibližně stejná ($1-2 \cdot 10^7$ kopií/buňka) (McConville a Blackwell 1991; Winter et al., 1994). Po přeměně na amastigota jsou GIPL nejzastoupenějším glykokonjugátem v membráně. Dochází u nich také k bližšímu kontaktu těchto molekul s okolním prostředím, což je způsobeno sníženou expresí strukturně delšího LPG, které u promastigotů stericky brání dostupnosti GIPL (Winter et al., 1994).

3.2.1 Struktura a variabilita glykoinositolfosfolipidu

Stejně jako molekuly LPG jsou i GIPL strukturami obsahujícími konzervativní a variabilní části. Konzervativní struktura sestává ze 4–6 sacharidových zbytků, které jsou prostřednictvím fosfatidylinositolového zbytku vázány na lipidovou část obvykle složenou z alkylacylglycerolu nebo z lysoalkylglycerolu (McConville et al., 1990).

Podle toho, na kterém uhlíku proximálně postavené manózy jsou vázány manózové zbytky rozlišujeme tři skupiny GIPL. První typ, označovaný GIPL I, má navázaný substituent na C6 manózy. Typ II se vyznačuje substituentem na C3. Třetí rozlišovaná skupina GIPL je kombinací předchozích dvou typů (substituenty jsou na C3 i na C6), a proto se jí také říká hybridní (shrnutí v Assis et al., 2012).

Podobně jako u LPG jsou i u GIPL známy mezidruhové rozdíly ve struktuře vedoucí k odlišné manifestaci onemocnění. Například u *L. infantum* byly prokázány GIPL typu I, zatímco *L. braziliensis* exprimuje GIPL typu II. Tyto malé rozdíly v pozici sacharidů se projevují například lepší schopností GIPL *L. braziliensis* potlačovat produkci NO makrofágem ve srovnání s GIPL purifikovaného z *L. infantum* (Assis et al., 2012). Na jedné buňce parazita může být exprimováno zároveň více typů GIPL, jejichž poměrné zastoupení se může lišit např. u různých linií téhož druhu leishmanie. Příkladem mohou být různé poměry v zastoupení GIPL typu I a II u *L. major* (Schneider et al., 1994).

3.2.2 Interkace glykoinositolfosfolipidu s imunitním systémem

GIPL jsou stejně jako LPG díky obsahu manózy cílem pro manózu vázající protein, který se vyskytuje v savčím séru. Amastigoti s tímto navázaným proteinem jsou velmi atraktivní pro makrofágy (Green et al., 1994). Manózu vázající protein je díky své schopnosti

aktivovat komplement klasickou cestou jednou z antimikrobiálních zbraní imunitního systému (Ikeda et al., 1987). Jeho význam pro leishmanie však spočívá v urychlení vstupu do cílové buňky (Green et al., 1994).

U GIPL leishmanií byla prokázána schopnost tlumit produkci NO a prozánětlivého cytokinu IL-12 v makrofázích, který během počáteční fáze infekce ovlivňuje polarizaci buněčné odpovědi směrem k Th1 (Proudfoot et al., 1995; 1996; Assis et al., 2012). Naproti tomu GIPL *L. shawi* a *L. mexicana* indukoval zvýšenou produkci protizánětlivého IL-10, který pomáhá leishmaniím udržovat chronicitu infekce a bránit hojení (Buxbaum et al., 2013; Passero et al., 2015). Produkce výše zmiňovaného IL-12 je indukována především skrze vazbu GIPL na receptory TLR4 a v menší míře také TLR2 (Assis et al., 2012).

Jedním z prokázaných účinků GIPL je inhibice protein kinázy C (PKC). Konkrétně je za tuto inhibici zodpovědný alkylacylglycerolipid, který je součástí struktury tohoto glykokonjugátu. Na PKC signální dráze je závislá exprese transkripčního faktoru c-Fos, schopného zasahovat do genové exprese a ovlivňovat tak produkci cytokinů, klíčových pro spuštění oxidativního vzplanutí (McNeely et al., 1989; Chawla a Vishwakarma, 2003).

Bylo prokázáno, že GIPL se stejně jako LPG (viz kapitola 3.1.2) podílejí na procesu bránicímú správnému sestavování komplexu NADPH oxidázy (viz kapitola 3.1.2) (Proudfoot et al., 1995; 1996; Tachado et al., 1997; Chawla a Vishwakarma, 2003; Lodge et al., 2006).

3.3 GP63

Glykoprotein 63 (gp63) je enzym, který se svou strukturou řadí do rodiny zinkových proteáz, vyznačujících se zinečnatým iontem v aktivním místě (Schlagenhauf et al., 1998). Tento název získal enzym ve vztahu ke své velikosti a možnosti glykosylace. Poprvé byl enzym gp63 popsán v průběhu osmdesátých let jako majoritní povrchový antigen promastigotů u vybraných druhů leishmanií (Colomer-Gould et al., 1985). Až po bližším zařazení mezi zinkové proteázy byl tomuto enzymu mezinárodním společenstvím pro biochemii a molekulární biologii přidělen název leishmanolysin (shrnuto v Isnard et al., 2012). Avšak pro účely této bakalářské práce budu v dalším textu využívat pouze názvu gp63.

Přítomnost metaloproteázy gp63 byla prokázána nejen u leishmanií, ale i u dalších druhů parazitujících na lidech: např. *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* (Bordier et al., 1986; Ma et al., 2011a) a *Trichomonas vaginalis* (Ma et al., 2011b). Gp63 se vyskytuje u promastigotů i amastigotů (Colomer-Gould et al., 1985). U obou stádií je exprimováno více izoform gp63, které se mezi vývojovými stádii liší chemickou strukturou, mírou exprese a lokalizací v rámci buňky (Medina-Acosta et al., 1989; Streit et al., 1996; Hsiao et al., 2008). Amastigoti vykazují na svém povrchu pouze necelé 1 % proteolytické aktivity gp63 v porovnání s promastigoty (Schneider et al., 1992). U promastigotů jsou izoformy gp63 obvykle N-glykosylovány, zatímco u většiny izoform amastigotů glykosylace chybí. Většina gp63 promastigotů je rovnoměrně rozmístěna na povrchu membrány, do které je ukotvená GPI kotvou, zatímco u amastigotů je většina gp63 lokalizováno ve flagelární kapse a nachází se volně v cytosolu, vezikulech nebo dalších organelách (Hsiao et al., 2008).

3.3.1 Struktura a biosyntéza gp63

Velikost gp63 se pohybuje v rozmezí 60-66kDa v závislosti na dané izoformě a míře její glykosilace (Chang et al., 1986). Proteáza je syntetizována jako inaktivní prekurzor, který se aktivuje procesem maturace (Macdonald et al., 1995). Maturovaný enzym je složen ze tří domén: N-terminální, centrální a C-terminální (Schlagenhauf et al., 1998). Aktivní místo enzymu se nachází mezi N-koncovou a centrální doménou (Schlagenhauf et al., 1998; Razzazan et al., 2008). Na N-terminální doméně se nachází motiv HExxH, který je pro zinkové proteázy typický. Postranní řetězce histidinů tohoto motivu slouží jako ligandy pro Zn^{2+} iont (Schlagenhauf et al., 1998). C-terminální doména je tvořena převážně antiparalelními beta strukturami, které jsou obohaceny o šest disulfidických vazeb a svojí N-terminální částí je doména připojena ke GPI kotvě (Schlagenhauf et al., 1998).

3.3.2 Interakce gp63 s imunitním systémem

Díky gp63 jsou extracelulární promastigoti i intracelulární amastigoti chráněni před nepříznivými vlivy prostředí (shrnuto v Isnard et al., 2012). Z hlediska proteolytické aktivity má gp63 pro leishmanie význam zejména v prostředí obratlovčího hostitele. Chaudhuri a Chang (1988) v experimentech prokázali zvýšenou proteolytickou aktivitu gp63 za fyziologického pH krevní plasmy a tělesné teploty typické pro savce (37 °C) v porovnání s teplotou těla mimikující hmyzího hostitele (přibližně 27 °C).

Účinnou zbraní na zabíjení mikrobů neutrofilů jsou síťovité struktury NETs (neutrophil extracellular traps), které se skládají z uvolněného chromatinu a specifických granulárních proteinů (shrnutí v Brinkmann a Zychlinsky, 2012). Promastigoti leishmanií spouští uvolňování NETs a zachytávají se v těchto strukturách, což usnadňuje pohlcení parazitů fagocyty v místě inokulace (Guimarães-Costa et al., 2009). Ukázalo se, že samotný gp63 nemá na formování NETs vliv (Gabriel et al., 2010), ale chrání leishmanie před cytolytickým efektem některých složek tohoto hostitelského obranného mechanismu (např. před antimikrobiálními peptidy či histony H2A a H2B) (Kulkarni et al., 2006).

Proteáza gp63 může fungovat jako účinný aktivátor komplementu i bez využití vlastní proteolytické aktivity (Brittingham et al., 1995). Tato aktivace komplementu probíhá alternativní cestou a je započatá navázáním gp63 na C3 složku komplementu, jejíž podjednotku C3b proteolyticky rozkládá na inaktivní iC3b složku. Podjednotka iC3b zabraňuje aktivaci komplementové kaskády a zároveň vyniká opsonizační funkcí, díky níž se leishmanie lépe vážou na komplementový receptor Mac-1 exprimovaný na povrchu lidských makrofágů (Russel, 1987). Silnější adhezi a následnou internalizaci parazita však umožňuje až vazba gp63 přes fibronectinový receptor (Brittingham et al., 1999). Promastigoti *L. major* defektní v gp63 projevovali zvýšenou náchylnost vůči lýzi komplementem v porovnání s promastigoty hyperexprimujícími gp63, dokazující klíčovou úlohu metaloproteázy proti komplementovému ataku (Joshi et al., 2002). Nepřítomnost gp63 u leishmanií a jím zprostředkovaná rezistence vůči komplementu se při infekci *L. major* a *L. amazonensis* na myším modelu projevila pozdějším formováním kožní léze a její menší velikostí (Joshi et al., 2002; Thiakaki et al., 2006).

Proteolytický účinek gp63 byl prokázán u mnoha substrátů, které zastávají důležité funkce v regulaci signálních drah a v dalších antimikrobiálních a zánětlivých procesech. Krátce po infikování buňky štěpí gp63 podjednotky c-Jun transkripčního faktoru AP-1 podílejícího se na transkripci genů kódujících některé antimikrobiální funkce (Contreras et al., 2010). Dále gp63 štěpí protein tyrozin fosfatázy, což má za následek snížení produkce prozánětlivých cytokinů a dalších mikrobicidních produktů makrofágů (Hallé et al., 2009). Gp63 také způsobuje odštěpení podjednotky NF- κ B (p65RelA), která putuje do jádra a indukuje produkci chemokinů, lákajících další imunitní buňky k místu infekce a tím urychlují internalizaci dalších parazitů do buněk (Gregory et al., 2008).

Proteolytická aktivita gp63 usnadňuje promastigotům migrovat podkožím po inokulaci do hostitele, za což vděčí schopnosti gp63 degradovat některé složky tvořící extracelulární matrix; např. kolagen typu IV či fibronektin (McGwire et al., 2003). Metaloproteázy jsou v extracelulární matrix přítomné i za normálních okolností a jsou běžnou součástí imunitní odpovědi proti infekcím, při níž se rozvolněním extracelulární matrix vytváří prostor pro rychlejší migraci imunitních buněk ke zdroji infekce (shrnutí v Elkington et al., 2005). Inkubace neutrofilů a makrofágů s gp63 však ukázala, že tento glykoprotein je schopný inhibovat chemotaxi těchto imunitních buněk za vybranými chemokiny (Sørensen et al., 1994). Vysoká aktivita metaloproteáz, degradujících matrix, může souviset s vnějšími projevy infekce (shrnutí v Elkington et al., 2005), zvláště pak, pokud s těmito přirozeně se vyskytujícími metaloproteázami spolupůsobí gp63.

Také amastigotům pomáhá gp63 k vyšší životaschopnosti uvnitř hostitelské buňky (Chen et al., 2000). Bylo prokázáno, že gp63 chrání promastigoty *L. mexicana* před cytolytickými účinky produktů fagolysosomů v průběhu jejich diferenciaci na amastigoty a amastigoty následně během vývoje a množení uvnitř buňky (Chaudhuri et al., 1989; Seay et al., 1996).

Dalším způsobem, kterým gp63 pomáhá amastigotům uvnitř buněk přežít, je ovlivnění signalizačních drah imunitních buněk. Výsledkem je modulace produkovaných cytokinů, jejímž následkem dochází ke snížené produkci toxických sloučenin dusíku a kyslíku, související s úspěšným uchycením a replikací parazita (např. Olivier et al., 1992; Guizani-Tabbane et al., 2004; Contreras et al., 2010; Jaramillo et al., 2011).

Dosud nejsou známy všechny substráty pro gp63, a tak je další bádání nad možnostmi působení proteázy gp63 nezbytností. Detailnější poznatky o působení gp63 mohou vést k vývoji nových terapeutických či profylaktických prostředků založených na inhibici tohoto enzymu a tím přispět k usnadnění boje imunity proti infekci (shrnutí v Isnard et al., 2012). Získané poznatky o využití gp63 ve vývoji vakcín jsou uvedeny níže (viz kapitola 4).

3.4 MEMBRÁNOVĚ VÁZANÝ PROTEOFOSFOGLYKAN

Membránově vázaný proteofosfoglykan (mPPG) patří mezi dosud nejméně probádané hlavní povrchové glykokonjugáty leishmanií (shrnutí v Rogers, 2012). Podstatně více je známo o funkci jeho sekretované a filamentární formy ve vztahu k hmyzímu vektorovi, kde

filamentární forma tvoří složku sekrečního gelu promastigotů (PSG) zvyšujícího efektivitu přenosu infekce do obratlovčího hostitele (Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002).

3.4.1 Struktura membránově vázaného proteofosfoglykanu

Opakujícími se jednotkami fosfoglykanu a mírou glykosilace je mPPG podobný LPG. Stejně jako všechny výše popsané povrchové glykokonjugáty leishmanií jsou i mPPG ukotveny v membráně GPI kotvou (Ilg et al., 1999).

3.4.2 Interakce proteofosfoglykanu s imunitním systémem

Při knock-outování genu pro syntézu LPG byla pozorována zvýšená syntéza mPPG i jeho sekretovaných forem, dokazující fakt, že zvýšená exprese mPPG může být prvkem zastupujícím některé funkce LPG u amastigotů (Ilg, 2000). Napovídají tomu i studie Ilga et al. (1999) a Pianiho et al. (1999), dle kterých je mPPG faktorem usnadňujícím amastigotům vazbu a vstup do makrofágů, poté, co tuto funkci přestává plnit LPG.

4 Léčba, profylaxe a role glykokonjugátů ve vývoji vakcín

Boj s leishmaniózou je v současnosti omezen zejména na léky na bázi pětimocného antimonu, které jsou však spojeny s řadou potíží souvisejících s jejich toxicitou. Příkladem těchto léků je miltefosin, amfotericin B a paromomycin (shrnuto v Oryan a Akbari, 2016). Kromě již zmiňované toxicity je problémem stále vznikající rezistence, která úzce souvisí s ekonomickou stránkou věci. Léky nejsou pro lidi v chudých endemických oblastech cenově dostupné, a to má za následek mnohdy nedostatečně vysoké dávkování nebo příliš časně ukončení léčby vedoucí ke vzniku rezistentních kmenů leishmanií (Chakravarty a Sundar, 2010).

Vakcíny proti leishmanióze se dají rozdělit do tří skupin podle typu použitých antigenů. Vakcíny 1. generace jsou založeny na směsi nespécifikovaných antigenů ze zlyzovaných buněk leishmanií. Jejich výhodou je levná výroba, ale mají i nevýhodu, již je nemožnost zajistit stejný obsah a chemické složení antigenů v každé dávce. Oproti tomu je obsah antigenů vakcín 2. generace chemicky přesně definován (shrnuto v Mendonça, 2016). Podle typu použitých antigenů je možné vakcíny rozdělit na ty, které obsahují oslabené (atenuované) parazity, celé usmrčené parazity, vakcíny obsahující rekombinantní geny, směs vybraných antigenů a vakcíny s obsaženou chimerickou DNA (shrnuto ve Srivastava et al., 2016). Typem vakcín, někdy označovaném jako vakcíny 3. generace, jsou DNA vakcíny (shrnuto v Allahverdiyev et al., 2010).

K výzkumu vakcín jsou někdy využívány glykokonjugáty leishmanií. Zvláštním typem, spadajícím k vakcínám 2. generace, je LPG, podávaný intranasálně BALB/c myším. Takto aplikovaná vakcína měla za úkol chránit před kutánní leishmaniózou působenou *L. amazonensis*. Výsledkem u takto ošetřených myší bylo pomalejší formování léze ve srovnání s kontrolami, jenž svědčí o účinné imunizaci takto očkovaných živočichů vedoucí k částečné protekci (Pinheiro et al., 2007).

Příkladem častých experimentů s glykokonjugáty je také vývoj vakcín 3. generace soustředěný na úseky DNA, které tyto molekuly leishmanií kódují. První taková vakcína byla orálně podávána myším a obsahovala bakterie *Salmonella typhimurium* s vloženým genem pro gp63 z *L. major* (Yang et al., 1990). DNA vakcína proti *L. donovani*, využívající jako antigen DNA kódující gp63, byla testována na myších BALB/c, jimž poskytla pouze částečnou

ochranu proti onemocnění (Kaur et al., 2016). Předpokládá se, že díky mezidruhové podobnosti tohoto glykoproteinu by tato vakcína mohla účinkovat i proti viscerální leishmanióze způsobené jinými druhy než *L. donovani* (Sinha et al., 2011). Jako nejvíce imunogenní se ukázala vakcína, využívající gen kódující N-terminální doménu PPG *L. donovani*, testovaná u zlatých křečků a poskytující až 80% ochranu proti viscerální leishmanióze (Samant et al., 2009). Další vakcína, která by měla účinkovat jako profylaxe proti viscerální leishmanióze působené druhem *L. infantum*, je založená na genu pro LPG 3, jehož produktem je chaperon nezbytný pro syntézu LPG (Descoteaux et al., 2002). Nicméně, stejně jako u předchozích vakcín, dochází v laboratorních testech jen k částečné ochraně (Pirdel et al., 2014). Tentýž gen, avšak pocházející z *L. major*, byl testován u BALB/c myši, které jsou k tomuto druhu leishmanií vnímavé (Launois et al., 1997). Vakcinace těchto myši ukázala, že fragment proteinu LPG 3 i samotná DNA, způsobuje taktéž nedostatečnou ochranu (Abdian et al., 2011).

Jinou možností, jak bojovat s leishmaniózou než chránit přímo očkovaného jedince, je vakcína bránící přenosu leishmanií z nakaženého obratlovčího hostitele na jejich přenašeče. Účinnost tohoto způsobu očkování byla zkoumána studiiemi na BALB/c myších imunizovaných LPG, gp63, rekombinantním gp63 a atenuovanými parazity. Experiment spočíval v tom, že se druh *Phlebotomus duboscqi* nechal sát na imunizovaných myších, v polovině bylo sání flebotomů přerušeno a na dokončení sání jim byly nabídnuty myši infikované *L. major*. Výsledkem tohoto experimentu bylo snížení výskytu metacyklů ve flebotomech, kteří sáli na imunizovaných myších, v porovnání s flebotomy sátými přímo na infikovaných zvířatech (Tonui et al., 2001a). Při opakovaném sání těchto flebotomů na neinfikovaných BALB/c myších se nižší obsah přenesených metacyklických promastigotů projevil menšími lézemi ve srovnání s kontrolami (Tonui et al., 2001b).

5 Závěr

Povrchové glykokonjugáty jsou jedním z mnoha studovaných virulenčních faktorů leishmanií, které ovlivňují průběh infekce v obratlovčím hostiteli. Pro leishmanie jsou povrchové glykokonjugáty nástrojem, s jehož pomocí dokáží přelstít hostitelskou imunitu a kvůli tomu dlouhodobě setrvávat v těle obratlovce.

Nejprostudovanějším glykokonjugátem leishmanií je LPG, u něhož byla zjištěna široká škála působnosti. Ačkoliv se LPG jeví jako nejdůležitější glykokonjugát pro přežití těchto parazitů, není tomu tak u všech druhů leishmanií. Svědčí o tom úplná nahraditelnost LPG u *L. mexicana*. Další glykokonjugáty mohou funkci LPG doplňovat či úplně nahrazovat při proměně promastigota na stádium amastigota, čemuž nasvědčuje i strukturní příbuznost některých glykokonjugátů. Struktura glykokonjugátů je proměnlivá nejen během životního cyklu, ale liší se často mezidruhově i vnitrodruhově. Tato proměnlivost souvisí s potřebou přizpůsobit se životu ve velmi odlišných prostředích dvou typů hostitelů a s přechodem z extracelulární formy na intracelulární.

Mimo LPG, GIPL, gp63 a mPPG jsou na membráně leishmanií exprimovány i další molekuly, které v této bakalářské práci nebyly zmiňovány, a to z důvodu, že jejich funkce, podporující přežití leishmanií uvnitř obratlovčího hostitele, není příliš prostudovaná. Jsou jimi např. gp46 a kinetoplastový membránový protein (KMP11), který byl také využit v experimentech s vakcínami. Konkrétně šlo o rekombinantní vakcínu, namířenou proti viscerální leishmanióze, působené *L. infantum*. Tato vakcína, založená na nepatogenním druhu *L. tarentolae* exprimujícím KMP11, vyvolávala produkci prozánětlivého interferonu- γ (IFN- γ), ale i protizánětlivého IL-4. Důležité však je, že po opakované stimulaci, 4 týdny od vakcinace, produkce IFN- γ vzrostla, zatímco IL-4 byl produkován jen v menší míře. To svědčí o směřování buněčné imunitní odpovědi k protektivnímu Th1 typu, díky čemuž je KMP11 považován za vhodného kandidáta na vakcínu (Nasiri et al., 2016). Tento protein je u většiny pozitivních pacientů dobře rozpoznáván protilátkami IgG (Ramírez et al., 1998) a to z něj zároveň činí vhodný sérodiagnostický prvek viscerální leishmaniózy (Passos et al., 2005).

Dosud proběhlo mnoho experimentů využívajících buďto DNA kódující některý z glykokonjugátů, glykokonjugát samotný, či nepatogenní organismus exprimující některou z těchto molekul. Všechny tyto experimenty ale poskytovaly pouze částečnou

ochranu, která se většinou projevila nižší parazitémií. Již tyto malé úspěchy svědčí o důležitosti pokračovat v intenzivním výzkumu těchto molekul a jejich funkcí. Z různého složení a zastoupení glykonjugátů u odlišných druhů leishmanií je patrné, že nejspíše nebude možné aplikovat stejnou kombinaci antigenů proti všem druhům tohoto parazita. Z těchto důvodů je nutné se nadále zabývat zastoupením a funkcí glykokonjugátů. Důraz by měl být kladen zejména na mezidruhové rozdíly a testování různých kombinací antigenů v závislosti na získaných poznatcích o těchto molekulách. Na druhé straně je nutné zkoumat i mechanismy obratlovčího imunitního systému namířené proti leishmaniím, aby bylo možné porozumět interakcím hostitel-parazit v plné šíři.

Z mého pohledu je velkým úskalím testování vakcín na zvířecích modelech, a to z důvodu odlišností ve fungování jejich imunitního systému. Vlivem těchto odlišností se může leishmaniová infekce i účinky testovaných vakcín projevit jinak u každého testovaného zvířete a tím spíše se může reakce na testovanou vakcínu lišit i u člověka.

6 Seznam použité literatury

- ABDIAN, N., E. GHOLAMI, F. ZAHEDIFARD, N. SAFAEE a S. RAFATI. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2011, 127(3), 627–636.
- AKHOUNDI, M., K. KUHL, A. CANNET, J. VOTÝPKA, P. MARTY, P. DELAUNAY a D. SERENO. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016, 10(3), e0004770.
- ALLAHVERDIYEV, A., M. BAĞIROVA, R. ÇAKIR KOÇ, O. N. ÖZTEL, S. ELÇİÇEK, S. C. ATEŞ a T. D. KARACA. Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2010, 34(2), 122–130.
- ALLEN, L. H. a A. ADEREM. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995, 182(3), 829–840.
- ALVAR, J., I. D. VÉLEZ, C. BERN, M. HERRERO, P. DESJEUX, J. CANO, J. JANNIN a M. DEN BOER. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012, 7(5), e35671.
- ASSIS, R. R., I. C. IBRAIM, P. M. NOGUEIRA, R. P. SOARES a S. J. TURCO. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1820(9), 1354–1365.
- ASSIS, R. R., I. C. IBRAIM, F. S. NORONHA, S. J. TURCO a R. P. SOARES. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012, 6(2), e1543.
- ATAYDE, V. D., H. A. SUAÚ, S. TOWNSEND, K. HASSANI, S. KAMHAWI a M. OLIVIER. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Reports*. 2015, 13(5), 957–967.
- BLACKWELL, J. M. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunology Letters*. 1985, 11(3 – 4), 227–232.

BLACKWELL, J. M., R. A. EZEKOWITZ, M. B. ROBERTS, J. Y. CHANNON, R. B. SIM a S. GORDON. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *The Journal of Experimental Medicine*. 1985, 162(1), 324–331.

BORDIER, C., R. J. ETGES, J. WARD, M. J. TURNER a M. L. CARDOSO DE ALMEIDA. *Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycophospholipid membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986, 83(16), 5988–5991.

BRINKMANN, V. a A. ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of Cell Biology*. 2012, 198(5), 773–783.

BRITTINGHAM, A., G. CHEN, B. S. MCGWIRE, K. P. CHANG a D. M. MOSSER. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunity*. 1999, 67(9), 4477–4484.

BRITTINGHAM, A., C. J. MORRISON, W. R. MCMASTER, B. S. MCGWIRE, K. P. CHANG a D. M. MOSSER. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology*. 1995, 155(6), 3102–3111.

BUXBAUM, L. U. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013, 7(5), e2224.

CABEZAS, Y., L. LEGENTIL, F. ROBERT-GANGNEUX, F. DALIGAULT, S. BELAZ, C. NUGIER-CHAUVIN, S. TRANCHIMAND, CH. TELLIER, J. GANGNEUX, V. FERRIERES. *Leishmania* cell wall as potent targets for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015, 13(31), 8393 – 8404.

COLOMER-GOULD, V., L. QUINTAO, J. KEITHLY a N. NOGUEIRA. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. *The Journal of Experimental Medicine*. 1985, 162(3), 902–916.

CONTRERAS, I., M. A. GÓMEZ, O. NGUYEN, M. T. SHIO, R. W. MCMASTER a M. OLIVIER. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathogens*. 2010, 6(10), e1001148.

DAVID, C. V. a N. CRAFT. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatology and Therapy*. 2009, 22(6), 491–502.

DESCOTEAUX, A., H. A. AVILA, K. ZHANG, S. J. TURCO a S. M. BEVERLEY. *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *The EMBO Journal*. 2002, 21(17), 4458–4469.

DESJARDINS, M. a A. DESCOTEAUX. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997, 185(12), 2061–2068.

DERMINE, J. F., G. GOYETTE, M. HOUDE, S. J. TURCO a M. DESJARDINS. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cellular Microbiology*. 2005, 7(9), 1263–1270.

DERMINE, J. F., S. SCIANIMANICO, C. PRIVÉ, A. DESCOTEAUX a M. DESJARDINS. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cellular Microbiology*. 2000, 2(2), 115–126.

DOBSON, D. E., B. J. MENGELING, S. CILMI, S. HICKERSON, S. J. TURCO a S. M. BEVERLEY. Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modifications of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(31), 28840–28848.

DOSTÁLOVÁ, A. a P. VOLF. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*. 2012, 5(276), 1–12.

ELKINGTON, P. T., C. M. O'KANE a J. S. FRIEDLAND. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2005, 142(1), 12–20.

FEIJÓ, D., R. TIBÚRCIO, M. AMPUERO, C. BRODSKYN a N. TAVARES. Dendritic cells and *Leishmania* infection: adding layers of complexity to a complex disease. *Journal of Immunology Research*. 2016, 3967436, 1–9.

FRANKENBURG, S., V. LEIBOVICI, N. MANSBACH, S. J. TURCO a G. ROSEN. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *The Journal of Immunology*. 1990, 145(12), 4284–4289.

FORESTIER, C. L., Q. GAO a G. J. BOONS. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014, 193(4), 1–7.

GABRIEL, C., W. R. MCMASTER, D. GIRARD a A. DESCOTEAUX. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology*. 2010, 185(7), 4319–4327.

GOSSAGE, S. M., M. E. ROGERS a P. A. BATES. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*. 2003, 33(10), 1027–1034.

GREEN, P. J., T. FEIZI, M. S. STOLL, S. THIEL, A. PRESCOTT a M. J. MCCONVILLE. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994, 66(2), 319–328.

GREGORY, D. J., M. GODBOUT, I. CONTRERAS, G. FORGET a M. OLIVIER. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *European Journal of Immunology*. 2008, 38(4), 1071–1081.

GUIMARÃES-COSTA, A. B., M. T. NASCIMENTO, G. S. FROMENT, R. P. SOARES, F. N. MORGADO, F. CONCEIÇÃO-SILVA a E. M. SARAIVA. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, 106(16), 6748–6753.

GUIZANI-TABBANE, L., K. BEN-AISSA, M. BELGHITH, A. SASSI a K. DELLAGI. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infection and Immunity*. 2004, 72(5), 2582–2589.

HALLÉ, M., M. A. GOMEZ, M. STUIBLE, H. SHIMIZU, W. R. MCMASTER, M. OLIVIER a M. L. TREMBLAY. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(11), 6893–6908.

HANDMAN, E. a J. W. GODING. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *The EMBO Journal*. 1985, 4(2), 329–336.

HOLM, A., K. TEJLE, K. E. MAGNUSSON, A. DESCOTEAUX a B. RASMUSSEN. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation. *Cellular Microbiology*. 2001, **2001**(3(7)), 439–447.

HSIAO, C. H., C. YAO, P. STORLIE, J. E. DONELSON a M. E. WILSON. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008, 157(2), 148–159.

CHAKRAVARTY, J. a S. SUNDAR. Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010, 2(2), 167–176.

CHANG, C. S., T. J. INSERRA, J. A. KINK, D. FONG a K. P. CHANG. Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986, 18(2), 197–210.

CHAUDHURI, G. a K. P. CHANG. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1988, 27(1), 43–52.

CHAUDHURI, G., M. CHAUDHURI, A. PAN a K. P. CHANG. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264(13), 7483–7489.

CHAWLA, M. a R. A. VISHWAKARMA. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. *The Journal of Lipid Research*. 2003, 44(3), 594–600.

CHEN, D. Q., B. K. KOLLI, N. YADAVA, H. G. LU, A. GILMAN-SACHS, D. A. PETERSON a K. P. CHANG. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infection and Immunity*. 2000, 68(1), 80–86.

IKEDA, K., T. SANNOH, N. KAWASAKI, T. KAWASAKI a I. YAMASHINA. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(16), 7451–7454.

ILG, T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *The EMBO Journal*. 2000, 19(9), 1953–1962.

ILG, T., J. MONTGOMERY, Y. D. STIERHOF a E. HANDMAN. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274(44), 31410–31420.

INBAR, E., V. K. HUGHITT, L. A. L. DILLON, K. GHOSH, N. M. EL-SAYED a D. L. SACKS. The transcriptome of *Leishmania major* developmental stages in their natural sand fly vector. *MBio*. 2017, 8(2), e00029–17.

ISNARD, A., M. T. SHIO a M. OLIVIER. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012, 2 (72), 1–9.

JARAMILLO, M., M. A. GOMEZ, O. LARSSON, SHIO M. T., TOPISIROVIC I., CONTRERAS I., LUXENBURG R., ROSEFELD A., COLINA R., MCMASTER R. W., OLIVIER M., COSTA-MATTIOLI M. a SONENBERG N.. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host & Microbe*. 2011, 9(4), 331–341.

JOSHI, P. B., B. L. KELLY, S. KAMHAWI, D. L. SACKS a W. R. MCMASTER. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002, 120(1), 33–40.

KAUR, S., T. KAUR a J. JOSHI. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccine against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Journal of Biomedical Research*. 2016, 30(4), 304–313.

KILLICK-KENDRICK, R., D. H. MOLYNEUX a R. W. ASHFORD. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1974, 187(1089), 409–419.

KULKARNI, M. M., W. R. MCMASTER, E. KAMYSZ, W. KAMYSZ, D. M. ENGMAN a B. S. MCGWIRE. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular Microbiology*. 2006, 62(5), 1484–1497.

LAUNOIS, P., I. MAILLARD, S. PINGEL, SWIHART K. G., XÉNARIOS I., ACHA-ORBEA H., DIGGELMANN H., LOCKSLEY R. M., MACDONALD H. R. a LOUIS J. A.. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*. 1997, 6(5), 541–549.

LIÉVIN-LE MOAL, V. a P. M. LOISEAU. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. *The FEBS Journal*. 2015, 283(4), 598–607.

LODGE, R., T. O. DIALLO a A. DESCOTEAUX. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular Microbiology*. 2006, 8(12), 1922–1931.

MA, L., K. CHEN, Q. MENG, Q. LIU, P. TANG, S. HU a J. YU. An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. *Parasitology Research*. 2011, 109(4), 1075–1084, a.

MA, L., Q. MENG, W. CHENG, Y. SUNG, P. TANG, S. HU a J. YU. Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*. 2011, 109(1), 71–79,b.

MACDONALD, M. H., C. J. MORRISON a W. R. MCMASTER. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995, 1253(2), 199–207.

MAHONEY, A. B., D. L. SACKS, E. SARAIVA, G. MODI a S. J. TURCO. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*. 1999, 38(31), 9813–9823.

MCCONVILLE, M. J. a J. M. BLACKWELL. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991, 266(23), 15170–15179.

MCCONVILLE, M. J., S. W. HOMANS, J. E. THOMAS-OATES, A. DELL a A. BACIC. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265(13), 7385–7394.

MCCONVILLE, M. J., L. F. SCHNUR, C. JAFFE a P. SCHNEIDER. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*. 1995, 310(3), 807–818.

MCCONVILLE, M. J., S. J. TURCO, M. A. FERGUSON a D. L. SACKS. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO Journal*. 1992, 11(10), 3593–3600.

MCGWIRE, B. S., K. CHANG a D. M. ENGMAN. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity*. 2003, 71(2), 1008–1010.

MCNEELY, T. B., G. ROSEN, M. V. LONDNER a S. J. TURCO. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochemical Journal*. 1989, 259, 601–604.

MEDINA-ACOSTA, E., R. E. KARESS, H. SCHWARTZ a D. G. RUSSELL. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1989, 37(2), 263–273.

MENDONÇA, S. C. F. Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. *Parasites & Vectors*. 2016, 9(492), 1–9.

MORADIN, N. a A. DESCOTEAUX. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012, 2 (121), 1–7.

MORAIS, C. G. V., A. K. C. LIMA, R. TERRA, R. F. SANTOS, S. A. G. DA-SILVA a P. M. L. DUTRA. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* infection. *BioMed Research International*. 2015, 324915, 1–19.

MYSKOVA, J., M. SVOBODOVA, S. M. BEVERLEY a P. VOLF. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*. 2007, 9(3), 317–324.

MONGE-MAILLO, B. a R. LÓPEZ-VÉLEZ. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*. 2013, 73(17), 1889–1920.

MUKKADA, A. J., J. C. MEADE, T. A. GLASER a P. F. BONVENTRE. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*. 1985, 229(4718), 1099–1101.

NASIRI, V., A. DALIMI, F. GHAFARIFAR a A. BOLHASSANI. Immunogenicity and efficacy of live *L. tarentolae* expressing KMP11-NTGP96-GFP fusion as a vaccine candidate against experimental visceral leishmaniasis caused by *L. infantum*. *Iranian Journal of Parasitology*. 2016, 11(2), 144–158.

OLIVIER, M., R. W. BROWNSEY a N. E. REINER. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992, 89(16), 7481–7485.

ORYAN, A. a M. AKBARI. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016, 9(10), 925–932.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 2014, 69, S10–S18.

PASSERO, L. F. D., R. R. ASSIS, T. N. F. DA SILVA, P. M. NOGUEIRA, D. H. MACEDO, N. L. PESSOA, M. A. CAMPOS, M. D. LAURENTI s R. P. SOARES. Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitology International*. 2015, 64(4), 32–35.

PASSOS, S., L. P. CARVALHO, G. ORGE, S. M. JERÔNIMO, G. BEZERRA, M. SOTO, C. ALONSO a E. M. CARVALHO. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2005, 12(10), 1164–1167.

PETERS, N. C., J. G. EGEN, N. SECUNDINO, DEBRABANT A., KIMBLIN N., KAMHAWI S., LAWYER P., FAY M. P., GERMAIN R. N. a SACKS D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008, 321(5891), 970–974.

PIANI, A., T. ILG, A. G. ELEFANTY, J. CURTIS a E. HANDMAN. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes and Infection*. 1999, 1(8), 589–599.

PIMENTA, P. F., S. J. TURCO, M. J. MCCONVILLE, P. G. LAWYER, P. V. PERKINS a D. L. SACKS. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 1992, 256(5065), 1812–1815.

PINHEIRO, R. O., E. F. PINTO, H. L. DE MATOS GUEDES, O. A. FILHO, K. A. DE MATTOS, E. M. SARAIVA, S. C. DE MENDONÇA a B. ROSSI-BERGMANN. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine*. 2007, 25(14), 2716–2722.

PIRDEL, L., A. Z. HOSSEINI a M. RASOULI. Immune response in susceptible BALB/c mice immunized with DNA encoding lipophosphoglycan 3 of *Leishmania infantum*. *Parasite Immunology*. 2014, 36(12), 700–707.

PROUDFOOT, L., C. A. O'DONNELL a F. Y. LIEW. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*. 1995, 25(3), 745–750.

PROUDFOOT, L., A. V. NIKOLAEV, G. J. FENG, W. Q. WEI, M. A. FERGUSON, J. S. BRIMACOMBE a F. Y. LIEW. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, 93(20), 10984–10989.

PUENTES, S. M., R. P. DA SILVA, D. L. SACKS, C. H. HAMMER a K. A. JOINER. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*. 1990, 145(12), 4311–4316.

RAMÍREZ, J. R., C. BERBERICH, A. JARAMILLO, C. ALONSO a I. V. VÉLEZ. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998, 93(2), 247–254.

RAZZAZAN, A., M. R. SABERI a M. R. JAAFARI. Insights from the analysis of a predicted model of gp63 in *Leishmania donovani*. *Bioinformatics*. 2008, 3(3), 114–118.

RITTER, U., F. FRISCHKNECHT a G. VAN ZANDBERGEN. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitology*. 2009, 25(11), 505–510.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3(223), 1–13.

ROGERS, M. E., M. L. CHANCE a P. A. BATES. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002, 124, 495–507.

RUSSELL, D. G. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *European Journal of Biochemistry*. 1987, 164(1), 213–221.

SACKS, D. L., T. N. BRODIN a S. J. TURCO. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1990, 42(2), 225–233.

SACKS, D. L., P. F. PIMENTA, M. J. MCCONVILLE a P. SCHNEIDER. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995, 181(2), 685–697.

- SAMANT, M., R. GUPTA, S. KUMARI, P. MISRA, P. KHARE, P. K. KUSHAWAHA, A. A. SAHASRABUDDHE a A. DUBE. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 2009, 183(1), 470–479.
- SEAY, M. B., P. L. HEARD a G. CHAUDHURI. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infection and Immunity*. 1996, 64(12), 5129–5137.
- SHARMA, U. a S. SINGH. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*. 2008, 45(4), 255–272.
- SCHLAGENHAUF, E., R. ETGES a P. METCALF. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*. 1998, 6(8), 1035–1046.
- SCHNEIDER, P., L. F. SCHNUR, C. L. JAFFE, M. A. FERGUSON a M. J. MCCONVILLE. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains. *Biochemical Journal*. 1994, 304(Pt 2), 603–609.
- SCHNEIDER, P., J. P. ROSAT, J. BOUVIER, J. LOUIS a C. BORDIER. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Experimental Parasitology*. 1992, 75(2), 196–206.
- SILVEIRA, T. G. V., K. A. G. YONEYAMA, H. K. TAKAHASHI a A. H. STRAUS. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* glycolipid antigens and their reactivity with mAb SST-1, specific for parasites of *Viannia* subgenus. *Parasitology*. 2005, 131(Pt 6), 737–745.
- SINHA, S., S. SUNDARAM, A. P. SINGH a A. TRIPATHI. A gp63 based vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Bioinformation*. 2011, 5(8), 320–325.
- SOARES, R. P., T. BARRON, K. MCCOY-SIMANDLE, M. SVOBODOVA, A. WARBURG a S. J. TURCO. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Experimental Parasitology*. 2004, 107(1-2), 105–114.
- SOARES, R. P., M. E. MACEDO, C. ROPERT, N. F. GONTIJO, I. C. ALMEIDA, R. T. GAZZINELLI, P. F. PIMENTA a S. J. TURCO. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002, 121(2), 213–224.

SØRENSEN, A. L., A. S. HEY a A. KHARAZMI. *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*. 1994, 102(4), 265–271.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2017, 10(82), 1–10.

STIERHOF, Y. D., P. A. BATES, R. L. JACOBSON, M. E. ROGERS, Y. SCHLEIN, E. HANDMAN a T. ILG. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*. 1999, 78(10), 675–689.

STREIT, J. A., J. E. DONELSON, M. W. AGEY a M. E. WILSON. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infection and Immunity*. 1996, 64(5), 1810–1818.

SRIVASTAVA, S., P. SHANKAR, J. MISHRA a S. SINGH. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2016, 9(277), 1-15.

TACHADO, S. D., P. GEROLD, R. SCHWARZ, S. NOVAKOVIC, M. MCCONVILLE a L. SCHOFIELD. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997, 94(8), 4022–4027.

TEIXEIRA, D. E., M. BENCHIMOL, J. C. F. RODRIGUES, P. H. CREPALDI, P. F. P. PIMENTA a W. DE SOUZA. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathogens*. 2013, 9(10), e1003594.

THIAKAKI, M., B. KOLLI, K. P. CHANG a K. SOTERIADOU. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes and Infection*. 2006, 8(6), 1455–1463.

TITUS, R. G. a J. M. RIBEIRO. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. 1988, 239(4845), 1306–1308.

TOLSON, D. L., S. J. TURCO a T. W. PEARSON. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*. 1990, 58(11), 3500–3507.

TONUI, W. K., P. A. MBATI, C. O. ANJILI, A. S. ORAGO, S. J. TURCO, J. I. GITHURE a D. K. KOECH. Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: I.

Lipophosphoglycan is a promising transmission blocking vaccine molecule against cutaneous leishmaniasis. *East African Medical Journal*. 2001, 78(2), 84–89, a.

TONUI, W. K., P. A. MBATI, C. O. ANJILI, A. S. ORAGO, S. J. TURCO, J. I. GITHURE a D. K. KOECH. Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: II. Effect of immunisation using *Leishmania major* derived 63 kilodalton glycoprotein, lipophosphoglycan and whole parasite antigens on the course of *L. major* infection in BALB/c mice. *East African Medical Journal*. 2001, 78(2), 90–92, b.

VILHARDT, F. a B. VAN DEURS. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *The EMBO Journal*. 2004, 23(4), 739–748.

WINBERG, M. E., B. RASMUSSEN a T. SUNDQVIST. *Leishmania donovani*: Inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. *Experimental Parasitology*. 2007, 117 (2), 165–170.

WHO, (2012). The post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). Atlas a manual for health workers.

WHO, (2013). Frequently asked questions on visceral leishmaniasis (kala-azar)
WHO/Regional office for South-East Asia

WHO, (2016). Leishmaniasis. World health organisation fact sheet;375.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

WINTER, G., M. FUCHS, M. J. MCCONVILLE, Y. D. STIERHOF a P. OVERATH. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *Journal of Cell Science*. 1994, 107(Pt 9), 2471–2482.

YANG, D. M., N. FAIRWEATHER, L. L. BUTTON, W. R. MCMASTER, L. P. KAHL a F. Y. LIEW. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1990, 145(7), 2281–2285.

YONEYAMA, K. A., A. K. TANAKA, T. G. SILVEIRA, H. K. TAKAHASHI a A. H. STRAUS. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *The Journal of Lipid Research*. 2006, 47(10), 2171–2178.

ZAWADZKI, J., C. SCHOLZ, G. CURRIE, G. H. COOMBS a M. J. MCCONVILLE. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *Journal of Molecular Biology*. 1998, 282(2), 287–299.