

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Novotná

Invazní aparáty parazitických prvoků

The invasion apparatus of protozoan parasites

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Markéta Petrů

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 31. 7. 2019

.....

Veronika Novotná

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Markétě Petrů za cenné rady, pomoc a trpělivost nejen při vedení práce, ale i při vedení v laboratoři.

Abstrakt:

Parazitický způsob života se v historii eukaryot vyvinul mnohokrát nezávisle na sobě. Adaptací na hostitele docházelo k redukci některých organel, a naopak vývoji specifických buněčných struktur. Mezi tyto struktury patří i invazní aparáty, které slouží k průniku do hostitelských buněk a úniku imunitnímu systému. V této bakalářské práci jsou shrnuty poznatky o invazních aparátech a způsobu invaze celkem čtyř vybraných zástupců z důležitých skupin jednobuněčných parazitů *Apicomplexa*, *Microsporidia*, *Cryptomycota* a *Kinetoplastida*. Dále jsou shrnuty obecné znalosti o parazitech, jejich stavbě a životním cyklu.

Klíčová slova:

Apicomplexa, *Plasmodium*, *Microsporidia*, *Ichthyobodo*, *Rozella*, merozoit, glideosom, pohyblivý těsný spoj, pólové vlákno, germinace, cytostom, zoospora, germinační trubice;

Abstract:

Protozoa parasitism has evolved many times independently in the history of eukaryotes. Some organelles were reduced, and specific invasion apparatuses were developed by adapting to the host. These apparatuses help to penetrate host cells and escape the immune system. The thesis summarizes the findings of the invasion apparatus and invasion of four selected unicellular protozoan parasites of genus *Plasmodium*, *Microsporidia*, *Ichthyobodo* and *Rozella*. Each chapter includes general knowledge of the parasite, its structure and life cycle.

Keywords:

Apicomplexa, *Plasmodium*, *Microsporidia*, *Ichthyobodo*, *Rozella*, merozoite, glideosom, moving junction, polar tube, germination, cytostome, zoospore, germ tube;

Obsah

1. Úvod	1
2. Apicomplexa	2
2.1 Životní cyklus rodu <i>Plasmodium</i>	2
2.1.1 Sexuální stádia	2
2.1.2 Asexuální stádia	3
2.2 Merozoit	4
2.3 Apikální komplex	5
2.3.1 Subpelikulární mikrotubuly	5
2.3.2 Povrch merozoitu	5
2.3.3 Sekreční orgány	5
2.4 Glideosom a pohyb invazních stádií	7
2.5 Invaze merozoitem	9
2.5.1 Neorientovaná adheze	9
2.5.2 Reorientace merozoitu	9
2.5.3 Formace pohyblivého spoje	10
2.5.4 Pohyb pohyblivého spoje	10
2.5.5 Formace a uzavření parazitoforní vakuoly	10
3. Microsporidia	12
3.1 Životní cyklus	12
3.1.1 Vegetativní stádium	13
3.1.2 Stádium spory	13
3.2 Stavba spory	14
3.3 Stavba invazního aparátu spor	15
3.4 Invaze	16
3.4.1 Aktivace spory	16
3.4.2 Vystřelení pólového vlákna a PTP	16
3.4.3 Průnik do hostitelské buňky	17
4. Rozella	19
4.1 Životní cyklus	19
4.2 Stavba zoospory	20
4.3 Invazní aparát cysty	21
4.4 Invaze cystou	22
5. Ichthyobodo necator	23
5.1 Stavba <i>I. necator</i>	23
5.2 Životní cyklus a invaze	24

5.3	Invazní aparát.....	24
6.	Závěr.....	26
7.	Seznam zkratek.....	28
8.	Reference	29

1. Úvod

Bakalářská práce si kladla za cíl získat hlubší poznatky o způsobech invaze parazitických prvoků a jejich invazních aparátů. Invazní aparáty těchto obligátních parazitických prvoků se adaptovaly na vysokou hostitelskou specifitu patogena, důsledkem čehož ztratil parazit schopnost invadovat i jiné organismy.

K průniku do hostitele jsou využívány různé strategie, řadí se mezi ně například indukovaná fagocytóza, aktivní penetrace nebo injikace obsahu parazitární buňky. Mezi častou strategií patří intracelulární způsob života, který patogena chrání před imunitním systémem hostitele.

Budou představeny čtyři zástupci vybraných skupin parazitů. Prvním je rod *Plasmodium* a jeho stadium merozoitu, které disponuje pohyblivým invazním aparátem, díky němuž může patogen napadnout červené krvinky. Druhou představenou skupinou je kmen *Microsporidia*, který má unikátní vystřelovací aparát v podobě podpovrchové jehly. Obdobným aparátem disponuje i sesterská skupina mikrosporidií, rod *Rozella*, který skrze trubici přesouvá svůj buněčný obsah do hostitele. Poslední zmíněnou skupinou je rod vodního ektoparazita ryb, *Ichthyobodo*, který svým cytostomálním komplexem napadá pro člověka hospodářsky významné ryby a způsobuje jejich úhyn.

2. Apicomplexa

Apikomplexa jsou významnou skupinou obligátně intracelulárních parazitů patřících do skupiny *Alveolata*. Způsobují závažná onemocnění obratlovců včetně člověka. Nejvýznamnějšími zástupci jsou rody *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* a *Plasmodium*¹. Toxoplazmóza je parazitární onemocnění u člověka vyvolávané intracelulárním prvokem druhu *Toxoplasma gondii*. Jeho přenos je uskutečněn skrze definitivního hostitele prvoka, kočku domácí.² Rod *Cryptosporidium* způsobuje infekce střev a průjmy³.

Příčinou jedné z nejzávažnějších světových chorob, tropické malárie, je prvok rodu *Plasmodium*. Nejvíce ohroženi jsou těhotné ženy, malé děti a také imunosuprimovaní jedinci postižení např. HIV^{2,4}. Příznaky onemocnění se projeví po 5,5-20 dnech. Nejtěžší formu, tzv. maligní malárii, způsobuje *P. falciparum*, jehož inkubační doba je v porovnání s ostatními lidskými plasmodii nejkratší, 5,5 dne. Onemocnění je charakterizováno malarickými záchvaty přicházejícími v třídních cyklech, které jsou důsledkem reakce imunitního systému na velké množství toxinů. Toxiny jsou vyplavovány z nakažených červených krvinek, které jsou během infekce lyzovány. Důsledky záchvatů mohou být mírné od bolestí hlavy, svalů až po zimnici a horečky. Závažnější komplikace, mezi něž se řadí silné křeče, kóma a smrt, nastávají při průniku parazita do mozku⁴.

V této kapitole bude detailněji představen rod *Plasmodium*, konkrétně jeho zástupce *P. falciparum* kvůli závažnosti onemocnění, které způsobuje. Vakcinace proti malárii zatím nebyla vyvinuta, onemocnění se léčí antimalariky, vůči nimž však vzniká rezistence, která představuje velký problém⁴. Hledání nových cílů léčby je proto nezbytné a v tomto ohledu může být větší porozumění způsobu invaze patogena prospěšné.

2.1 Životní cyklus rodu *Plasmodium*

Plasmodium má komplexní životní cyklus, který začíná napadením člověka komárem rodu *Anopheles*, definitivního hostitele plasmodia, s jehož sáním je injikována pohyblivá fáze (sporozoit). Sporozoity se dostávají do jater, kde se pomnoží a po úniku infikují hostitelovi červené krvinky, kde dochází k dalšímu množení (viz 2.1.2). Po několika cyklech se začínají tvořit pohlavní buňky, gametocyty. Ty dále unikají z hostitelské buňky a jsou infekční pro komára, který je spolu s krví nasaje a započne sexuální fáze (viz 2.1.1). Celý životní cyklus je vyobrazen na Obr. 2.

2.1.1 Sexuální stádia

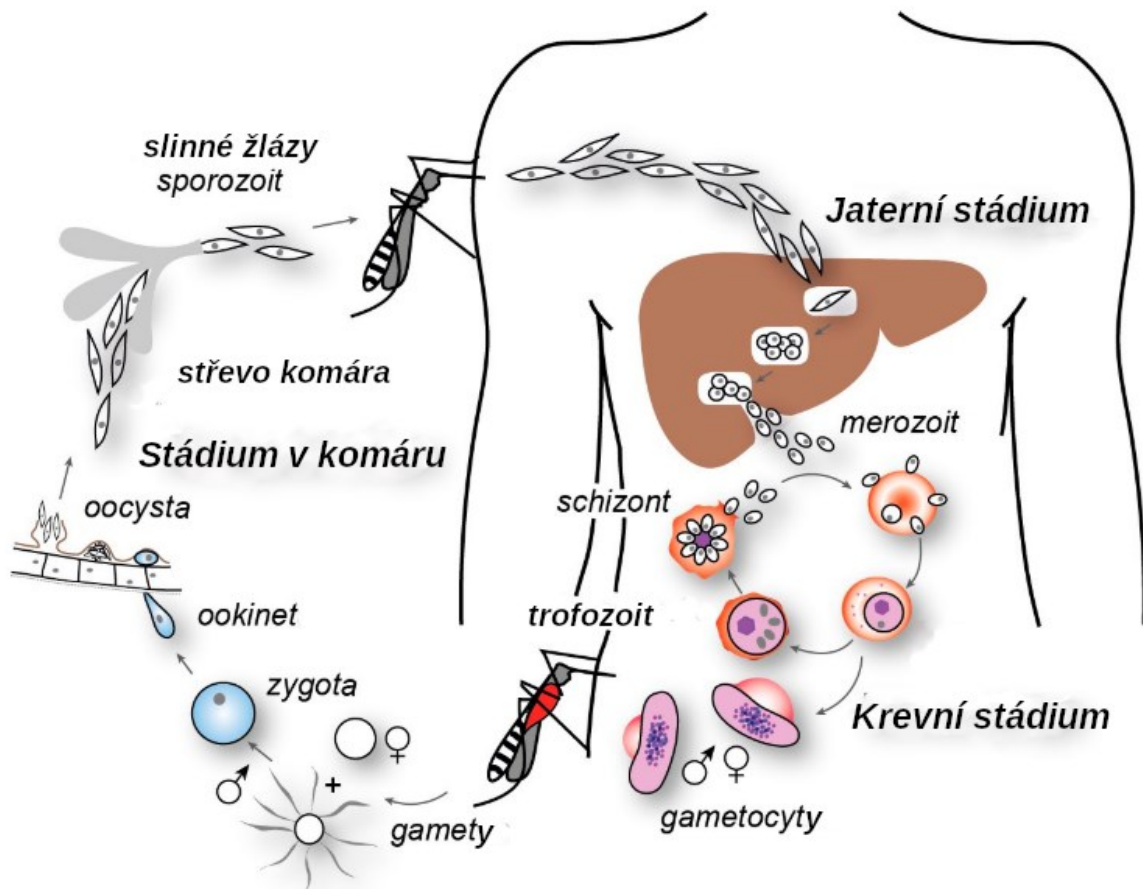
Po nasátí infikované krve komárem jsou gametocyty dopraveny do lumen střev, kde podstupují gametogenezi za vzniku makrogamety (samičí pohlavní buňky) a mikrogamety (samčí pohlavní buňky)⁵. Splynutím gamet vzniká zygota, započne meiotické dělení a rekombinace, jejichž důsledkem je vytvoření první pohyblivé fáze ookinetu. Ookinet penetruje epiteliální buňky střeva, přichytí se na

střevní laminu a transformuje se v oocystu. Toto jediné extracelulární stádium plazmodia dozrává 10-12 dní a přetvoří se ve velkou buňku s mnoha jádry tzv. syncytium⁶.

2.1.2 Asexuální stádia

Asexuální stádium začíná rozpadem syncytia, kdy se oocysta sporogonicky rozdělí a poté se vyvíjí v haploidní sporozoity, které se přesouvají do slinných žláz komára⁷. Po injikaci sporozoitů do krve meziphostitele jsou pohyblivá stádia unášena krví do jater a pronikají do jaterních buněk (hepatocytů) skrze Kupfferovy buňky. Následně probíhá tzv. exoerytrocytární schizogonie⁸, při němž parazit prochází několikanásobným dělením. Vzniká syncytium, segmentují se jádra a utváří se merozoiti, jenž napadají červené krvinky⁷.

Po invazi se erytrocyt zakulatí do tzv. prstýnku (*P. falciparum*), ve kterém se merozoity následně vyvíjí do stádia trofozoitu, jež pohlcuje cytoplazmu hostitelské buňky⁵. Po dokončení růstové fáze trofozoitu přichází erytrocytární schizogonie, kde dochází k rozpadu jader schizontu na merozoity⁹. *Plasmodium* uniká z červené krvinky a pohyblivá stádia invadují nové hostitelské buňky a cyklus se opakuje. Gametocyty se začnou tvořit až po 10 dnech od začátku infekce¹⁰.

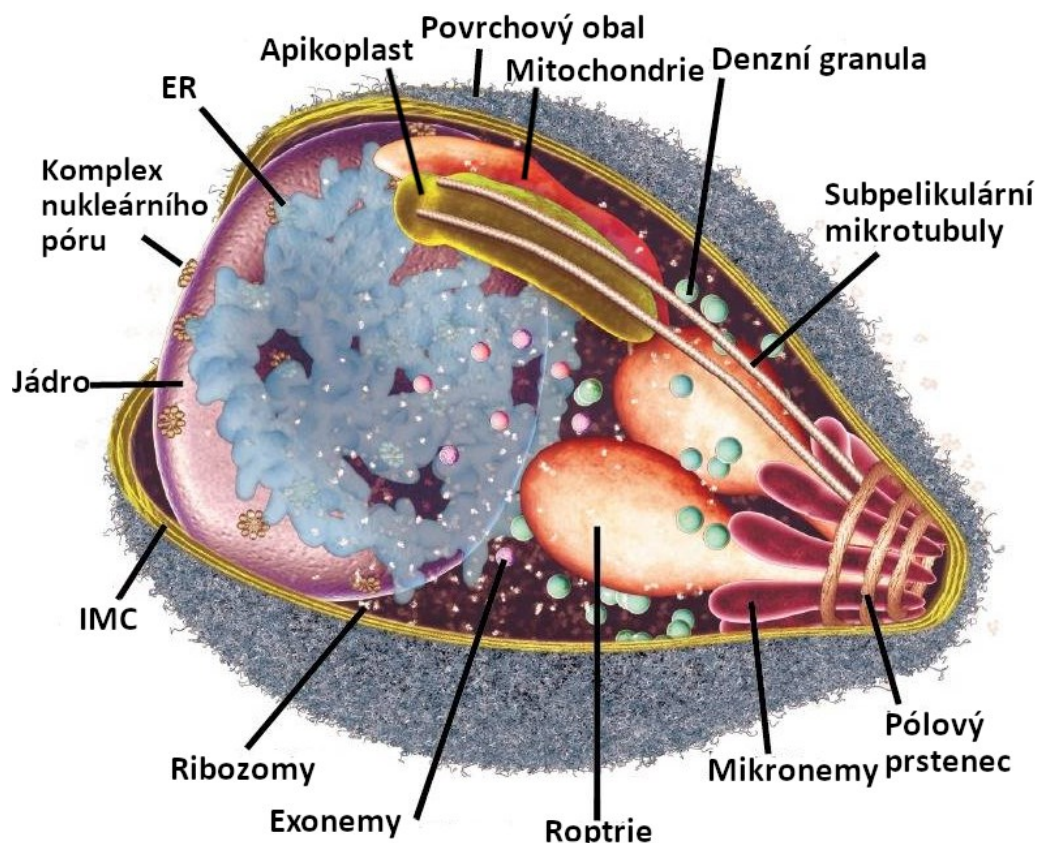


Obr. 2: Schéma životního cyklu rodu *P. falciparum*. Upraveno dle¹².

2.2 Merozoit

Merozoit je nejmenší jednojaderné stádium plasmodia a vzniká rozpadem jeho mnohjaderné formy zvané schizont. Stádium merozoitu je oválného až protáhlého tvaru. Plazmódium je chráněno pelikulou, která je složena ze 3 vrstev; plazmatické membrány (PM) a vnitřního membránového komplexu (IMC z angl. *inner membrane complex*)¹¹. IMC je zploštělý váček, který lze pozorovat jako dvoumembránový útvar. Struktura pelikuly připomíná labyrint a pokrývá celý povrch parazita, přerušena je pouze na apikální části a místě, kde ústí mikropór fungující jako cytotom⁵. Na povrchovém obalu jsou ukotveny proteiny MSP (merozoite surface proteins).

Buňka je dále vybavena jádrem, endoplazmatickým retikulem, mitochondrií a apikoplastem, pozůstatkem sekundárního plastidu. Apikoplast ztratil schopnost fotosyntézy, ale zachoval si některé metabolické dráhy typické pro plastidy řas (např. FAS – biosyntéza mastných kyselin)^{5,12,13}. Mezi specifické orgány určené k invazi do hostitelské buňky patří konoid s polárními prstenci, roptrie, mikronemy a denzní granula, která tvoří apikální komplex^{5,12}. Exonemy umístěné v cytoplazmě poté napomáhají úniku z erytrocytu¹². Schéma stavby merozoitu je znázorněno na Obr. 1



Obr. 1: Stavba merozoitu. Znázorněny jsou hlavní struktury objevené v invazním merozoitu. Na povrchu se nachází pelikula s proteinovým obalem, která interaguje s vnitřním membránovým komplexem (IMC). V cytoplazmě se nachází volné ribozomy, exonemy, jádro a apikoplast v blízkosti mitochondrie. Subpelikulární mikrotubuly, denzní granula, mikronemy a roptrie jsou orgány sloužící k invazi. Upraveno dle¹².

2.3 Apikální komplex

Apikální komplex je invazní aparát, který se sestává ze soustavy organel a cytoskeletárních struktur zajišťující pohyb a invazi parazita do hostitelské buňky. Mezi tyto struktury a organely patří 3 pólové prstence s mikrotubuly, subpelikulární mikrotubuly a sekreční organely roptrie, mikronemy a denzní granula. Součástí invazního aparátu zástupců apikomplex je i nálevkovitý konoid, který se vyskytuje na antero-laterální straně parazita. Konoid je přítomen např. u rodu *Toxoplasma*, u rodu *Plasmodium* však chybí. *Plasmodium* má místo konoidu jen 3 pólové prstence, z nichž nejbazálnější tvoří konoidní límec, na který se napojuje IMC a slouží jako organizační centrum subpelikulárních mikrotubulů^{14,15}.

2.3.1 Subpelikulární mikrotubuly

Subpelikulární mikrotubuly jsou důležitou součástí pohybového aparátu parazita. Slouží jako pevný bod, na který se upíná pohybový komplex, tzv. glideosom. Napojením na subpelikulární mikrotubuly je docíleno tření potřebného ke klouzavému pohybu parazita (gliding)^{11,16}. Mikrotubuly jsou uspořádány do kruhu kolem parazita od jeho posledního pólového prstence k posteriorní části, avšak jejich délka sahá pouze k jádru^{5,14}. Pod subpelikulárními mikrotubuly se nachází síť proteinů podobným intermediárnímu filamentu, zvaná alveoliny¹¹.

2.3.2 Povrch merozoitu

Interakce IMC parazita s aktin-myozinovým motorem a subpelikulárními mikrotubuly je důležitým prvkem při pohybu a invazi. IMC má vnitřní a vnější membránu, ta vnitřní je napojena skrze alveoliny právě na subpelikulární mikrotubuly^{11,17}. Vnější membrána je prostředníkem pro motilitu parazita a přes glideosom asociované proteiny (GAP) upevňuje aktin-myozinový motor¹⁸.

IMC membrány mají paralelně uspořádané vnitromembránové částice (*IMP z angl. inner membrane particles*) s mikrotubuly. IMP jsou prodlouženy podél osy parazita a jsou uspořádány do mřížky^{18,19}. IMP jsou napojeny pomocí proteinů asociované s mikrotubuly (MAP) přes alveolární síť na subpelikulární mikrotubuly¹⁸.

2.3.3 Sekreční organely

Mikronemy společně s roptriemi a denzními granuly sekretují svůj obsah, jehož funkcí je zajištění pohybu a internalizace zoitu do hostitelské buňky.

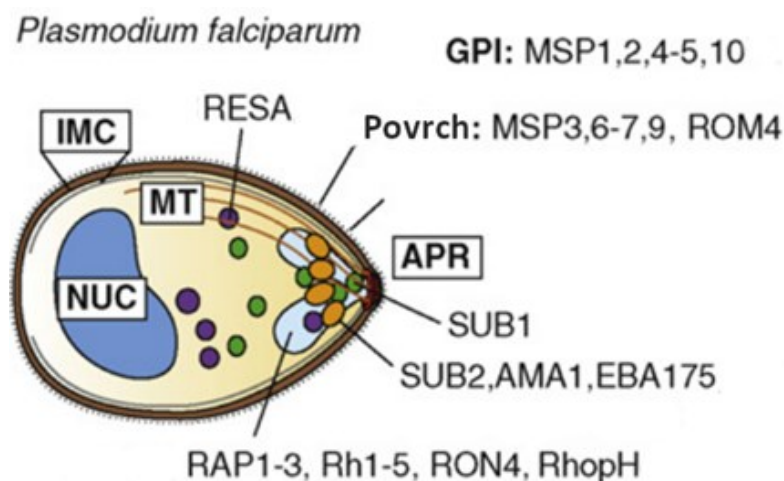
Mikronemy sekretují proteiny (MIP), které jsou rekrutovány na PM, rozeznávány a vázány receptory hostitelské buňky²⁰. Sekrece mikronem slouží hlavně k zajištění pohybu, tudíž se jejich počet u různých stádií liší. Nejvíce jich nalezneme ve stádiu sporozoitu, naopak u invazního stádia merozoitu jich je přítomno jen minimální množství díky schopnosti (re)invaze pomocí nespecifické adheze na erytrocyt¹¹.

MIP váží receptory hostitelské buňky ke glideosomu a fungují tedy jako ligand. Patří mezi adheziny a mají vliv na orientaci parazita po adherenci k povrchu erytrocytu. Po přilehnutí zoitu se díky jejich vylučování parazit reorientuje apikálním koncem k erytrocytu za pomoci proteáz, které štípou nepotřebné spoje¹¹. Důležitými MIP pro pohyb a invazi jsou AMA1 (apikální membránový antigen), EBA-175 (erythrocyt-binding antigen; rodina proteinů *EBL* z *angl. erythrocyt-binding like*) a SUB2 (subtiliáza).

Roptrie jsou párové orgány kapkovitého tvaru, které se zblíhají do společného kanálku (*angl. neck*) a ústí na apikální straně zoitu¹⁴. Sekretují proteiny (ROP), které se účastní invaze a pomáhají formovat parazitoforní vakuolu (PV). K formaci pohyblivého těsného spoje (*MJ* z *angl. moving junction*) jsou potřeba proteiny z rodiny RON (RhOpry Neck proteins)^{11,20}.

RON proteiny tvoří po sekreci komplex s AMA1, s kterým vzniká silná protein-protein interakce, která přibližuje membránu parazita a erytrocytu. Sekrece roptrií je podmíněná exocytózou mikronem a vazby EBA-175 a PfRh (reticulocyte-binding homolog u *P. falciparum*), který je sekretován z apikální části roptrií^{11,21}. Některé proteiny roptrií a ostatních sekrečních organel jsou znázorněny na Obr. 3.

Sekrece z denzních granul se uplatňuje zvláště během vzniku PV. Byly pozorovány imunoelektronovou mikroskopií a popsány jako denzní orgány kulatého pravidelného tvaru nacházející se v přední části merozoitu²². Tato granula jsou vypouštěna skrze pelikulu zvláště v konečné fázi internalizace plasmodia v PV a podílí se na přetváření hostitelské buňky, např. pomocí antigenu, který se nachází na povrchu erytrocytu nakaženého prstýnkem (*RESA* z *angl. ring-infected erythrocyte surface antigen*), společně s proteiny roptrií²³.



Obr. 3: Schéma rozmístění invazních komponent v merozoitu u *Plasmodium falciparum*. Denzní granula jsou znázorněna fialově, exonemy zeleně, v apikální části (APR) jsou zobrazeny roptrie světle modře a mikronemy oranžově. GPI označuje proteiny ukotvené GPI kotvou. Vysvětlení zkratk: IMC - vnitřní membránový komplex, MT - subpelikulární mikrotubuly, NUC - jádro, APR - apikální pólové prstence. Upraveno dle¹⁷.

2.4 Glideosom a pohyb invazních stádií

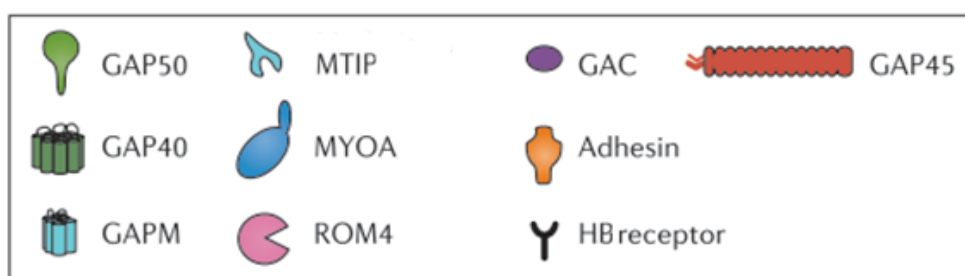
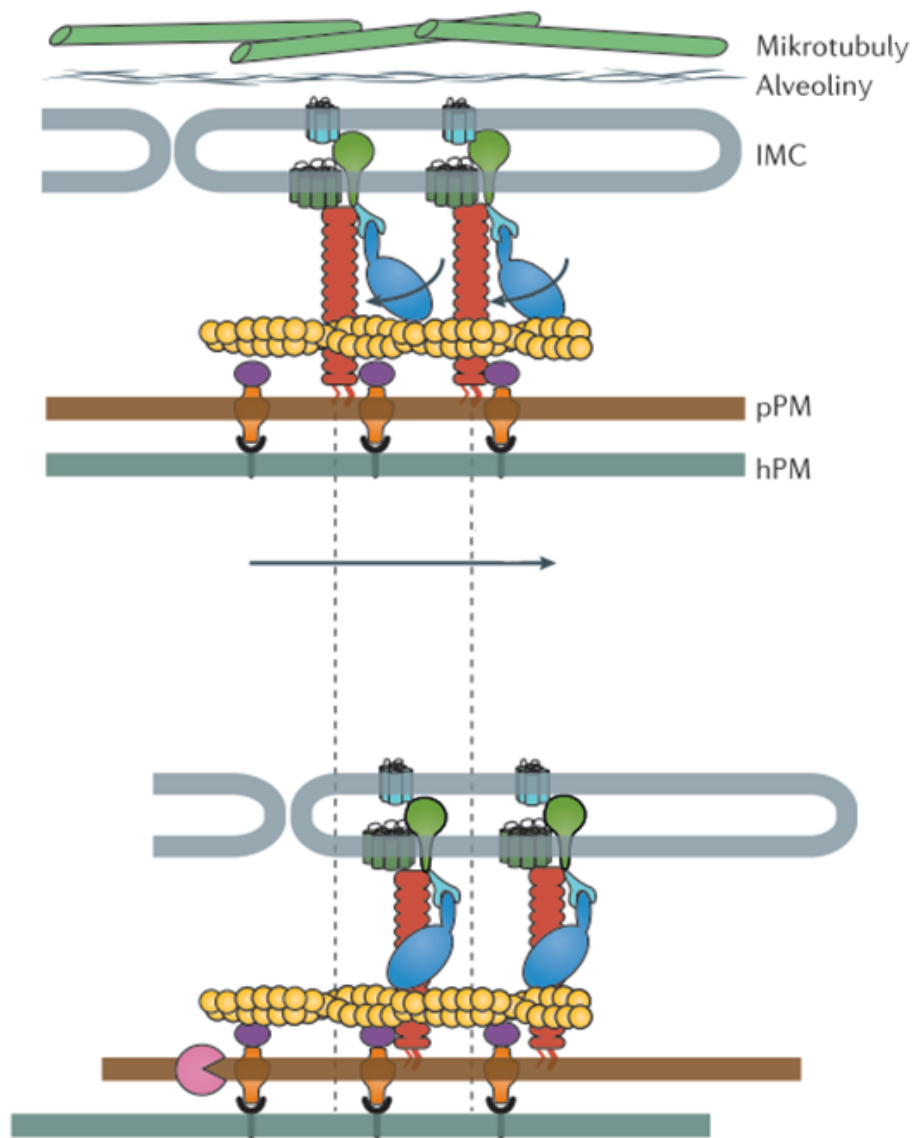
Glideosom je motorový komplex, který na základě mechanicko-chemické síly umožňuje pohyb parazita vpřed a napomáhá invazi (Obr. 4). Glideosom je složen z myozin A (MyoA) motoru, MyoA interagující domény, která je napojena na proteiny IMC, GAP40 a GAP50, jež interagují přes GAP45. Další komponentou je glideosom-asociovaný konektor, který spojuje F-aktin s mikronemami sekretovanými proteiny včleněnými do membrány parazita (MIP). Cytoskelet a síť alveolinů je napojena přes GAPMs (glideosome-associated protein with multiple-membrane spans) na glideosom, díky čemuž je tvořeno potřebné tření^{11,24}.

Pohyb začíná na apikálním pólu buňky, kde po Ca^{2+} signalizaci exocytují mikronemy své adheziny. Ty se včlení do PM merozoitu a interagují s receptory hostitele nebo extracelulární matrix. Dochází k polymeraci F-aktinu, jenž je stabilizován a propojen s cytozolickou částí adhezinu díky glideosom-asociovanému konektoru. Tento komplex interaguje na úrovni polárního prstence s těžkým myozinovým řetězcem (MyoH) a dále s MyoA na IMC¹¹.

Po sekreci MIP se glideosom na AMA1 napojí a za spotřeby ATP se mechanicky posouvá po filamentech F-aktinu, která se dynamicky vytvářejí a zanikají²⁰. Při pohybu dochází ke zpětnému pohybu adhezinů (MIP) napojených na receptory hostitelské buňky a tudíž merozoitovu pohyb vpřed¹¹. Narozdíl od ostatních komponent glideosomu, není MyoA motor rekrutován při pohybu (invazi) a je stále přítomen na PM. Dokončení pohybu je doprovázeno odštěpením adhezinů mikronemální proteázou, jenž je přítomna na vnější straně PM²⁰.

Tvorbu aktinových filament indukují formíny (hlavní FRM1). Přítomny jsou na apikálním konci merozoitu. Vytvořená aktinová filamenta se soustředí posteriorně od MJ. Formíny (složeny z FH1 a FH2 domény) utvářejí aktinová filamenta z G-aktinu, který rekrutují k vytvářejícímu se F-aktinu nebo zvyšují svoji aktivitu (autoindukce)¹¹.

Pro správný pohyb glideosomu se musí F-aktinové vlákno po jeho interakci s myozinem i depolymerizovat. Proto jsou pod PM přítomny ve velkém množství depolymerizační faktory jako ADF (actin-depolymerizing factor), cofilin nebo toxofilin^{11,20}. Dále se uplatňují stabilizační proteiny zakončující aktin, jež zabraňují (de)polymerizaci navázáním se na rostoucí konec F-aktinu¹¹.



Obr. 4: Schéma glidingu merozoitu rozdělené na horní polovinu před pohybem myozinových hlav a dolní polovinu, kde je znázorněn posun MyoA po F-aktinu (žlutě značené filamentum). Ve středu je šipkou naznačen směr pohybu. MTIP - MyoA interagující protein, GAC - glideosom-asociovaný konektor, ROM4 - rhomboidní proteáza, GAP - glideosom asociované proteiny, HB receptor - receptor hostitelské buňky, pPM - plazmatická membrána parazita, hPM - hostitelská plazmatická membrána. Upraveno dle¹¹.

2.5 Invaze merozoitem

Invaze hostitelské buňky trvá přibližně 20 s a jeho průběh byl poprvé zdokumentován pomocí invertovaného mikroskopu v 80. letech minulého století²⁵. Invaze se dělí do několika kroků: neorientovaná adheze, reorientace apikálního komplexu, formace pohyblivého těsného spoje (MJ), pohyb merozoitu skrze MJ do PV a uzavření PV²¹. Jednotlivé kroky invaze jsou znázorněny na Obr. 5.

2.5.1 Neorientovaná adheze

Aby došlo k úspěšnému průniku merozoitu do buňky, je zapotřebí spojení s hostitelskými receptory²⁶. Prvotní kontakt se děje skrze povrchové proteiny merozoitu (MSP), z nichž nejhojnější je MSP1 a 2 a jsou ukotveny k povrchu parazita GPI kotvou²³. MSP1 je syntetizován ve 4 různých formách, všechny jsou součástí komplexu na povrchu merozoitu. Pro další pohyb merozoitu je nutné odštěpení MSP1 proteinu, které zajišťuje kalcium-dependentní serin proteáza²⁷. U rodu *Plasmodium* se jedná o serin proteázu podobnou subtilisinu (SUB2) štěpící transmembránové domény. SUB2 je také využívána při obraně před imunitní reakcí hostitele tak, že pomocí ní parazit štěpí navázané antigeny^{28,29}.

2.5.2 Reorientace merozoitu

Po neorientované adhezi následuje reorientace merozoitu jeho apikálním komplexem směrem k povrchu HB. Hlavní interakce zprostředkující reorientaci zoitu je mezi mikronemami sekretovaným EBA-175 a zbytkem kyseliny sialové na glykoforinu A, který se nachází na povrchu hostitelské buňky (Obr. 5)³⁰. EBA-175 musí být upraven štěpením proteázou ROM4 (rhomboid-like malarial protease) lokalizované v mikronemách³¹. Vazba na glykoforin A aktivuje fosforylační kaskádu v erytrocytu, jež zajišťuje deformaci membrány a cytoskeletu červené krvinky, která je nezbytná pro další kroky invaze¹¹. Mezi méně prozkoumané členy EBL rodiny podílející se na reorientaci patří EBA-181 (neznámý receptor), EBA-140 (vazba s glykoforinem C) nebo EBL1 (vazba s glykoforinem B).³² K invazi jsou používány i jiné cesty nezávislé na vazbě s kyselinou sialovou (*P. falciparum*, *P. knowlesi*)³³. Dalšími rozpoznávanými adheziny obstarávající reorientaci a aktivaci fosforylační kaskády erytrocytů jsou ligandy rodiny Rh (např. Rh1, Rh2B, Rh4)³⁴.

Dalším krokem je vypuštění vápníku z roptrií do erytrocytu, což způsobuje sekreci mikronem a roptrií, na které je závislá tvorba MJ. Mediátory pro vypuštění vápníku jsou mikronemální Rh5-interagující proteiny (RIPR), CyPRA (Cysteine-rich PRotective Antigen) a ROP protein Rh5 tvořící komplex interagující s basiginem³⁵, jež zprostředkovává spojení v podobě póru mezi erytrocytem a merozoitem³⁶.

2.5.3 Formace pohyblivého spoje

MJ je ireverzibilní těsný spoj, který se pohybuje k posterioru merozoitu a tím dochází k „pohlčení“ parazita membránou erythrocytu²⁶. MJ je tvořen komplexem proteinů z roptrií a mikronem AMA1-RON2-RON4-RON5-RON8, kde RON proteiny jsou zabudovány v membráně hostitelské buňky a AMA1 v membráně parazita (Obr. 5). AMA1 má spolu s RON2 pevnou vazbu a RON5 slouží k ukotvení celého RON komplexu do hostitelské buňky^{37,38}.

Při vtoku vápníku dochází k aktivaci kalcium-dependentní protein kinázy (CDPK), která spouští sekreci mikronem. Aktivita CDPK1 podporuje iniciaci glidingu a její inhibice zabraňuje exocytóze mikronem a blokuje invazi¹¹. Translokace MIP na povrch a jejich navázání na receptor spouští sekreci proteinů z roptrií³⁹. V apikální části vzniká společný kanál, jenž propojuje roptrie s erythrocytem. S vápníkem jsou z roptrií sekretovány RON proteiny. Společně jejich proteiny tvoří komplex²⁶.

Po sekreci RON proteinů vzniká AMA1-RON komplex, který následně vytváří MJ kolem invadujícího merozoitu, což bylo potvrzeno pomocí fluorescenčního značení u rodu *Plasmodium* kolokalizací proteinů RON4 a AMA1. AMA1 je částečně vypuštěno na povrch ještě před navázáním merozoitu a po interakci s RON proteiny přenáší signál k další sekreci roptrií, jež se podílí na motilitě a stavbě PV^{21,40}.

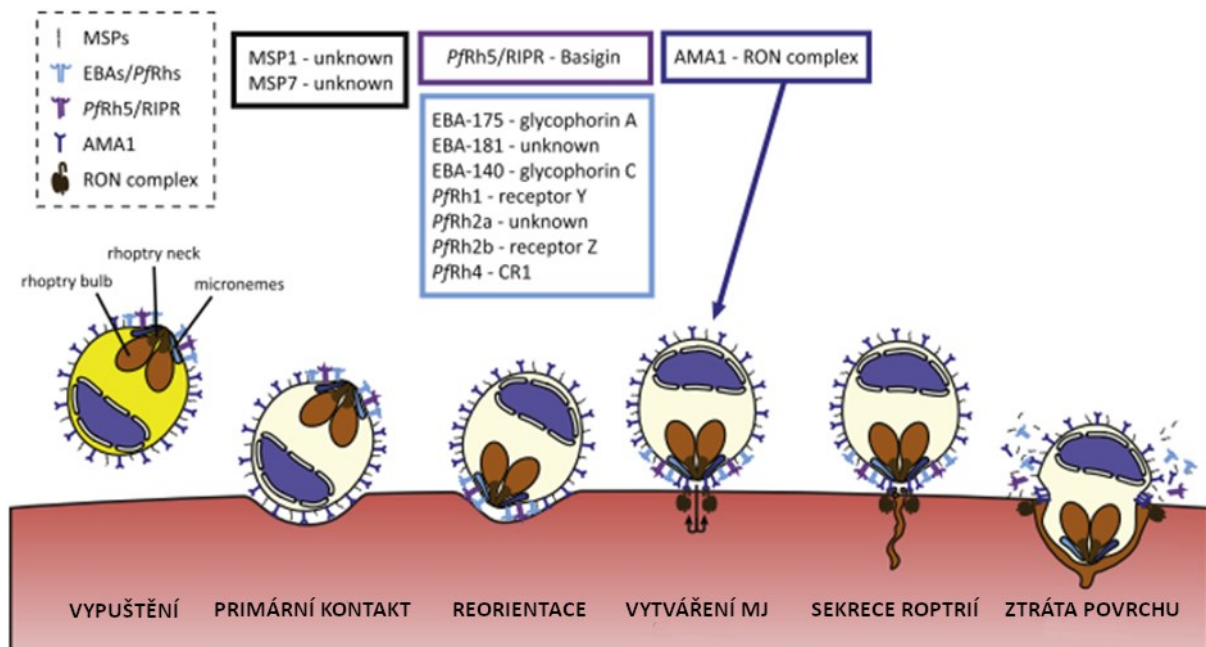
2.5.4 Pohyb pohyblivého spoje

Po vzniku MJ a začátku jeho pohybu dochází k depresi styku, který vznikl deformací membrány po prvotním kontaktu. Vnitřní dvoumembrána erythrocytu je v místě kontaktu s MJ ztlustěna. Membrány parazita a hostitelské buňky jsou v kontaktu pouze přes apikální komplex a MJ, aby mohl merozoit měnit svůj tvar, a tím lépe invadovat erythrocyt. Prostor mezi membránami, které nejsou v kontaktu činí asi 10 nm. Při invazi merozoitu do hostitelské buňky byla pozorována postupná absence povrchového obalu parazita směrem od MJ k apikální části. Granulární obal zůstává pouze v části, která nepronikla do erythrocytu²⁶. Obal obsahuje MSP, které jsou při vstupu parazita do krvinky postupně ztraceny aktivitou SUB2 (Obr. 5). Ta napomáhá k rapidnímu uvolnění MSP1 a AMA1 a internalizaci parazita do erythrocytu^{21,28}.

2.5.5 Formace a uzavření parazitiformní vakuoly

Při invazi dochází k druhé deformaci, která postupně ustává s internalizací parazita do erythrocytu a zacelení membrány erythrocytu²⁵. Po dokončení průniku do erythrocytu jsou adheziny z MJ odštěpeny rhomboidní proteázou, komplex se rozpadá a membrány (erythrocytární a PV) na posteriorní straně merozoitu se zacelí^{26,36}. V červené krvince se merozoit zakulacuje, redukuje pelikulární komplex a mění se na trofozoit ohraničený jednoduchou PM. Báze konoidní části se po vstupu do hostitelské buňky otevře a polární prstence se rozpadají⁵.

Po fúzi je parazit obklopen PV vznikající invertováním ztluštělé membrány červené krvinky.²⁶ Proteiny podílející se na tvorbě PV jsou nízkomolekulární komplex roptrií RAP1, 2 a 3 a vysokomolekulární komplex RhopH. Společně s produkty denzních granul (např. RESA) jsou zabudovány do vznikající PV a podílí se na reformaci erytrocytu²³.



Obr. 5: Schéma průběhu invaze a výpis interakcí typických pro určitou fázi. Nejprozkoumanější komplexy a proteiny jsou MSP, p̄fRh5/RIPR/CyPRA-basigin (CyPRA není vyobrazena), EBA-175, Rh-jejich receptory, AMA1-RON komplex. Upraveno dle³².

3. Microsporidia

Mikrosporidie jsou obligátně intracelulární parazité, kteří byli dříve řazeni mezi *Protozoa*, avšak dnes už jsou samostatným kmenem v říši hub⁴¹. Jejich výskyt ve všech biomech vedl k obecnému rozdělení do tří skupin, vodní, mořské a terestriální mikrosporidie⁴². Mikrosporidie napadají téměř všechny druhy živočichů, včetně člověka. Mezi druhy významné pro člověka patří např. *Nosema bombycis*, *N. apis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Enterocytozoon bieneusi*. Tyto druhy představují jak ekologickou, tak zdravotní hrozbu.

Mikrosporidíóza je oportunistické onemocnění, jež se rozvíjí především u imunosuprimovaných jedinců, kteří jsou nakaženi orálně spory. Spory jsou obsaženy v infikované potravě nebo vodě, a důsledkem nákazy je průjem⁴³. Urputný průjem způsobuje dehydrataci, ztrátu váhy a bolesti břicha. Mikrosporidíóza je jedno z přehlížených onemocnění v lékařské diagnostice. Kvůli malé velikosti infekční spory je potřeba odborné diagnostiky (histochemie, mikroskopické techniky, PCR, imunofluorescence), která je náročná a nemusí být vždy průkazná (např. u PCR)⁴⁴.

3.1 Životní cyklus

Mikrosporidie jsou různorodé nejen morfologií v rámci vývoje konkrétního druhu, ale i ve způsobech přenosu. Životní cyklus zahrnuje dvě funkčně odlišná stádia. Vegetativní stádium, které je lokalizováno uvnitř hostitelské buňky a jeho součástí je fáze proliferace a sporogonie. A druhé, odolnější stádium spory, která je určena k nákaze dalšího hostitele a přežívá vnější nepříznivé podmínky. K přenosu patogenu dochází (i) horizontálně nebo (ii) vertikálně.

(i) Horizontální přenos se děje v rámci populace hostitele mezi nepříbuznými jedinci, napříč generacemi i mezidruhově. Horizontální přenos je nejčastější a je u něj důležité dosáhnout co největšího počtu invazních stádií. S nárůstem počtu je vytvořena zátěž na hostitele, který jejímž následkem hyne a spory jsou vypuštěny do prostředí⁴⁵.

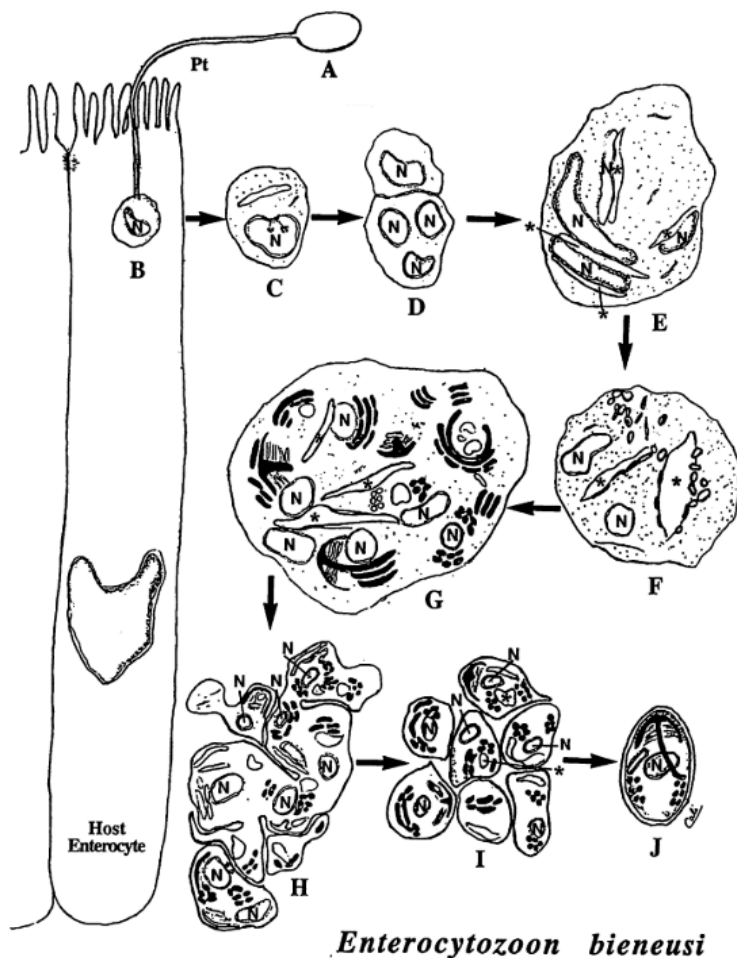
(ii) Vertikální přenos probíhá transovariálně nebo transplacentárně. Samčí gamety nejsou schopné zprostředkovat vertikální přenos, a proto parazit vyvinul různé techniky pro přežití. Jednou z nich je vysoká virulence spor pro samce. Samci jsou usmrceni přemnožením mikrosporidií, redukováni v celkové populaci a spory jsou přeneseny na samici, ve které již probíhá vertikální přenos (*Thelohanía californica*). Další technikou je feminizace samců, kdy mikrosporidie změní samčí fenotyp na funkční samičí (*Nosema granulosis*). Druhy mikrosporidií využívající vertikální přenos se vyznačují nízkou virulencí, která je vysvětlena potřebou zralých samičích gonád pro přenos spory do další generace⁴⁵.

3.1.1 Vegetativní stádium

Cyklus začíná pozřením infekčního stádia, spory, z vnějšího prostředí. K aktivaci invazního aparátu je zapotřebí stimulu z prostředí mimo sporu. Skrze vystřelené pólové vlákno (*PT* z *angl. polar tube*) je přemístěn obsah spory do cytoplazmy (rod *Nosema*), nukleu (rod *Nucleospora*), sporoforního vezikulu (rod *Pleistophora*) nebo do PV vzniklé z membrány hostitelské buňky (rod *Encephalitozoon*). Přesný mechanismus přesunu genetického materiálu stále není znám. Mikrosporidie se v hostiteli dělí buď binárně hned po karyoknezi (rod *Enterocytozoon*) nebo vytváří podlouhlé útvary s mnoha jádry (rod *Nosema*), tzv. plazmódia. Tato dělení mohou proběhnout jednou, ale i několikrát po sobě⁴⁶. Dělením vznikají mnohojaderná syncytia (meronty/plazmódia), jež se přeměňují ve sporonty, a ty se vyvíjejí ve sporoblasty, které se sporogenezí dále diferencují na brzké spory s tenkou stěnou. Tenkostěnné spory mohou napadat další buňky v rámci jednoho hostitele. Některé meronty se diferencují na tlustostěnné spory, jež se zvětšujícím se počtem dceřiných spor způsobí rupturu hostitelské buňky a jsou vypuštěny do okolního prostředí (Obr. 6). U vertikálního přenosu je množství spor vyprodukovaných merogonií nižší. Např. *N. granulosis* produkuje jen tenkostěnné dvoujaderné spory, které se přesouvají na další generaci při oogenezi⁴⁵.

3.1.2 Stádium spory

Spora mikrosporidií je odolné stádium určené a vysoce přizpůsobené k infekci dalšího hostitele. Rezistence na nepříznivé podmínky vnějšího prostředí je značná. Dokáží přežít ve vodě několik dní, na suchu několik týdnů (*E. cuniculi*) a některé druhy jsou schopny v destilované vodě vydržet i 10 let (*N. bombycis*)⁴⁷. Při nízké teplotě (cca 4 °C) a vyšší vlhkosti (50 % a výše) jsou schopné vydržet i několik let, záleží ale na rodu. Ačkoli jsou spory mechanicky velice odolné, jsou citlivé na vysušení⁴⁸. Spory se vyznačují přítomností unikátního invazního aparátu.



Obr. 6: Intracelulární vývoj *E. bieneusi*. **A** - Vystřelená prázdná spora, **B** - sporoplazma na konci pólového vlákna (Pt), **C** - začátek proliferace a dělení jádra (N), **D** - přiléhavé plazmodiální buňky po cytokinezi, **E** - proliferující plazmodiální buňka s prodlouženými jádry, **F** - začátek sporogonie, **G** - fáze sporogonie plazmódia se zakulacenými jádry a začátek tvorby invazního aparátu, **H** - pozdní sporogonie, segregace jader invaginací plazmalemy, **I** - sporoblasty, **J** - dospělá jednojaderná spora s vyvinutým PT a dokončenou exo- a endosporou. Upraveno dle⁴⁶.

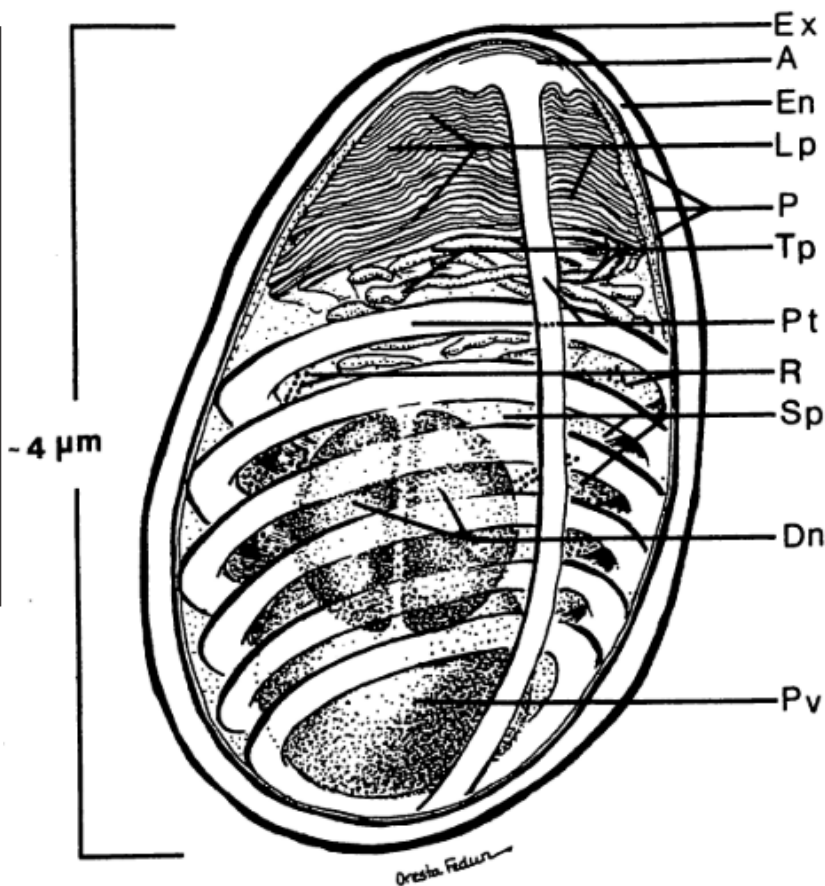
3.2 Stavba spory

Spory jsou malého oválného tvaru variabilní délky (1-20 μm). Vysoká odolnost spor je zajištěna proteinovou exosporou a protein-chitinovou endosporou, která přiléhá k PM. Exospora vzniká sekrecí parazita ve stádiu merontu (mnohojaderná fáze) a její složení se mezi rody liší. Povrch se může při elektronové mikroskopii jevit jako mukózní, tubulární, filamentární nebo hladký⁴⁶. Proteiny tvořící exosporu se nazývají SWP (Spore Wall Proteins) a proteiny endospory jsou označovány EnP (Endospore Proteins)⁴⁸.

Obsah buňky je oddělen tenkou PM, která je na posterioru asociována se zadní vakuolou. Spora může obsahovat jedno (rod *Enterocytozoon*) nebo dvě (diplokaryon) jádra (rod *Nosema*). Zralá spora obsahuje plně funkční invazní aparát, jehož části jsou blíže popsány v kapitole 3.3⁴⁶. Sporoplazma je vysoce denzní a nacházejí se v ní ribozomy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a redukovaná mitochondrie bez genomu (mitozom)⁴⁸. Stavba dvoujaderné spory je schematicky znázorněna na Obr. 7.

Obr. 7: Stavba dvoujaderné spory mikrosporidie.

Ex - exospora, A - kotvící disk, En - endospora, Lp - laminární polaroplast, P - plazmatická membrána, Tp - tubulární polaroplast, Pt - pólové vlákno, R - ribozomy ve sporoplazmě (Sp), Dn - diplokaryon, Pv - zadní (posteriorní) vakuola. Převzato z⁴⁵.



3.3 Stavba invazního aparátu spor

Vystřelovací aparát slouží k přepravě buněčného obsahu přímo do cytoplazmy, nicméně mechanismus děje není zcela probádán. Spora může být i fagocytována před vystřelením a PT může tudíž sloužit k úniku z fagozómu hostitele⁴⁸. Aparát se skládá z kotvícího disku, polaroplastu, pólového vlákna a zadní vakuoly. PT ústí v anteriorní části spory v kotvící disk. Kotvící disk se nachází na anterioru parazita a zaujímá deštníkovitý tvar⁴⁶. Disk se skládá z pólové čepičky a pólového límce, na který je napojeno PT⁴⁹. Na kotvící disk navazuje polaroplast, který má několikvrstvou lamelární, tubulární nebo vezikulární strukturu a je lokalizován kolem pólového vlákna⁴⁶.

PT je složeno z rovné části zvané manubroid, která je napojena na kotvící disk a směrem k posterioru přechází PT do otáček⁴⁸. Počet otáček PT kolem jádra a zadní vakuoly se u různých druhů liší a může jich být i přes 40 (*P. macrozoarcidis*), avšak existují i mikrosporidie, které se vyznačují jejich absencí (*M. daphniae*)^{46,50}. Délka a průměr PT je variabilní. Průměr se také mění v závislosti na procházející sporoplazmě a pohybuje se od 0,1-0,2 μm. Délka činí 50-500 nm⁴⁸.

Délka PT se však liší i v rámci jediného organismu, a to před a po vystřelení. Existují různé teorie, které vysvětlují změnu délky. E. Weidner předpokládá, že variabilita délky je dána uspořádáním proteinů do PT po germinaci, a že prodloužení se uskutečňuje přepravou proteinů PT (PTP) skrze vlákno a postupným „přirůstáním“ na vrcholu PT (Obr. 8)⁵¹. Druhá teorie vysvětluje nárůst délky vlákna konformační změnou PTP1-2. PTP1-2 jsou před germinací drženy v kondensované formě pomocí silných iontových interakcí s PTP3. Tokem iontů jsou tyto interakce kompetovány a indukuje se změna PTP1-PTP2 polymeru do jeho „prodloužené“ formy⁵².

Zadní vakuola je vázaná na PM a je vyvinuta z Golgiho aparátu⁴⁶. Před germinací PT se vakuola společně s polaroplastem zvětší a po vystřelení zabírá téměř celý obsah spory, od kterého je oddělena vlastní membránou⁴⁹.

3.4 Invaze

Invaze se dá rozdělit na několik kroků: aktivaci spory, zvýšení vnitřního osmotického tlaku, vystřelení PT a přepravu sporoplazmy skrze PT⁴⁸. Vystřelení pólového vlákna je indukováno chemickými a fyzikálními stimuly v prostředí. Samotné vystřelení vlákna je způsobeno změnou osmotického tlaku uvnitř spory a nabobtnáním zadní vakuoly. U rodu *Nosema* přispívá k nabobtnání enzymatická aktivita disacharid trehalózy, která za přítomnosti iontů (Na^+ , Cl^- a K^+) štěpí disacharidy, rozpínání se obsah spory a zvyšuje osmotický tlak⁴⁶. Zvýšením osmotického tlaku začne nabírat zadní vakuola vodu, čímž se zvýší i tlak hydrostatický, který způsobí porušení spory v její zúžené části (čepička kotvícího disku) a následné vypuzení PT vzniklou rupturou^{48,49,53}.

3.4.1 Aktivace spory

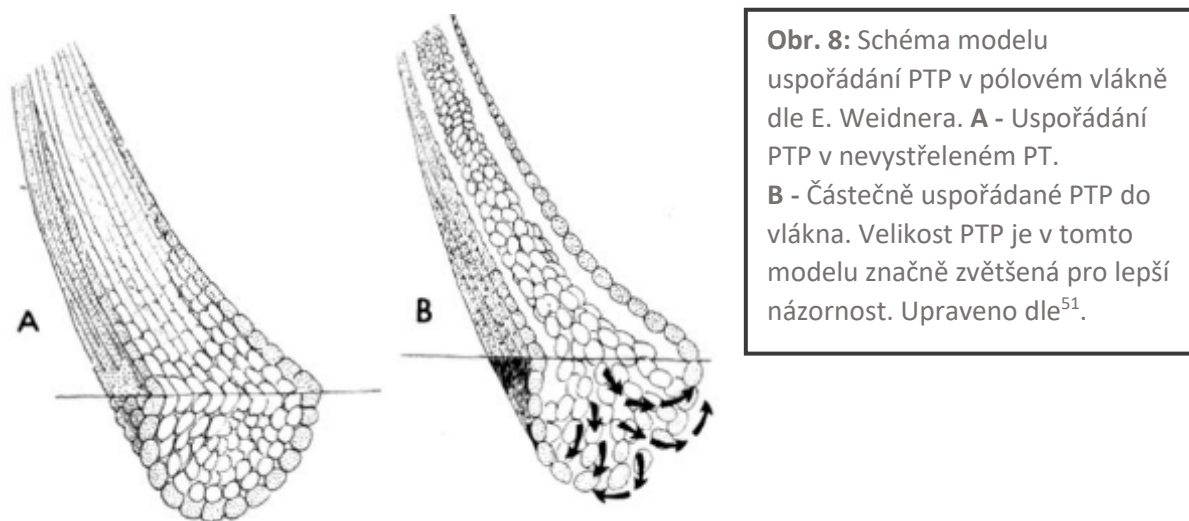
Vnější faktory působící jako stimul pro germinaci spor se v rámci mikrosporidií značně liší. Mezi známé faktory patří vyvíjení mechanického tlaku na sporu, rehydratace, hydratace, peroxid vodíku, zvýšení či snížení pH nebo obsahu iontů⁵⁴. Jedním z faktorů pro aktivaci vystřelení je obsah vápníku vně PV (rod *Encephalitozoon*). Uvnitř PV jsou hladiny vápníku nízké a stejně tak i ve zdravé buňce hostitele. Při infekci může ztráct plazmalema hostitelské buňky integritu, zvyšuje se tím koncentrace cytozolického Ca^{2+} , dochází k aktivaci spor v PV a napadení přilehlých buněk. U rodu *Encephalitozoon* je však taková aktivace a následná germinace v PV neobvyklá⁵⁵. Při úniku z buňky se dostávají spory také do prostředí s vysokým Ca^{2+} , čímž započne klíčení. Dalšími faktory jsou vnitrobuněčné hodnoty Na^+ a K^+ , jejichž hladina pro stimulaci klíčení se mezidruhově liší^{53,55}.

3.4.2 Vystřelení pólového vlákna a PTP

Pólové vlákno je složeno z proteinů pólového vlákna (PTP), mezi nimiž jsou nejhojnější proteiny PTP1-5. PTP se nacházejí po celé délce vlákna, kromě PTP4, které se vyskytuje na apikální části PT. PTP proteiny jsou modifikovány O-manosylací, jenž přispívá ke stabilitě, chrání PT a má roli v adhezi⁵⁶. PTP jsou propojeny protein-proteinovými vazbami zprostředkovanými disulfidickými můstky^{48,49,57}.

Interakce mezi PTP1-PTP3 byly prokázány experimentálně pomocí kvasinkového dvouhybridního systému a koimunoprecipitace⁵⁸. Silné interakce se nachází hlavně mezi PTP1 a PTP2, které jsou hlavními stavebními proteiny PT (rod *Encephalitozoon*)^{52,56}. Narozdíl od PTP1 a PTP2, PTP3 neobsahuje cysteinové zbytky umožňující vznik disulfidické vazby a spolu s dalšími PTP se jako prekurzor objevuje až ve fázi sporoblastu. PTP3 však obsahuje mnoho nabitých aminokyselinových zbytků, což vede k předpokladu, že PTP3 interaguje s PTP1 a PTP2 skrze iontové vazby (viz 3.3)⁵².

Germinace je rychlý proces trvající 2 sekundy. Po vzniku potřebného tlaku se objeví ruptura na čepičce a pólový límec se po vystřelení PT přetočí, což podporuje teorii o převrácení PT naruby při germinaci (Obr. 8)⁴⁹.

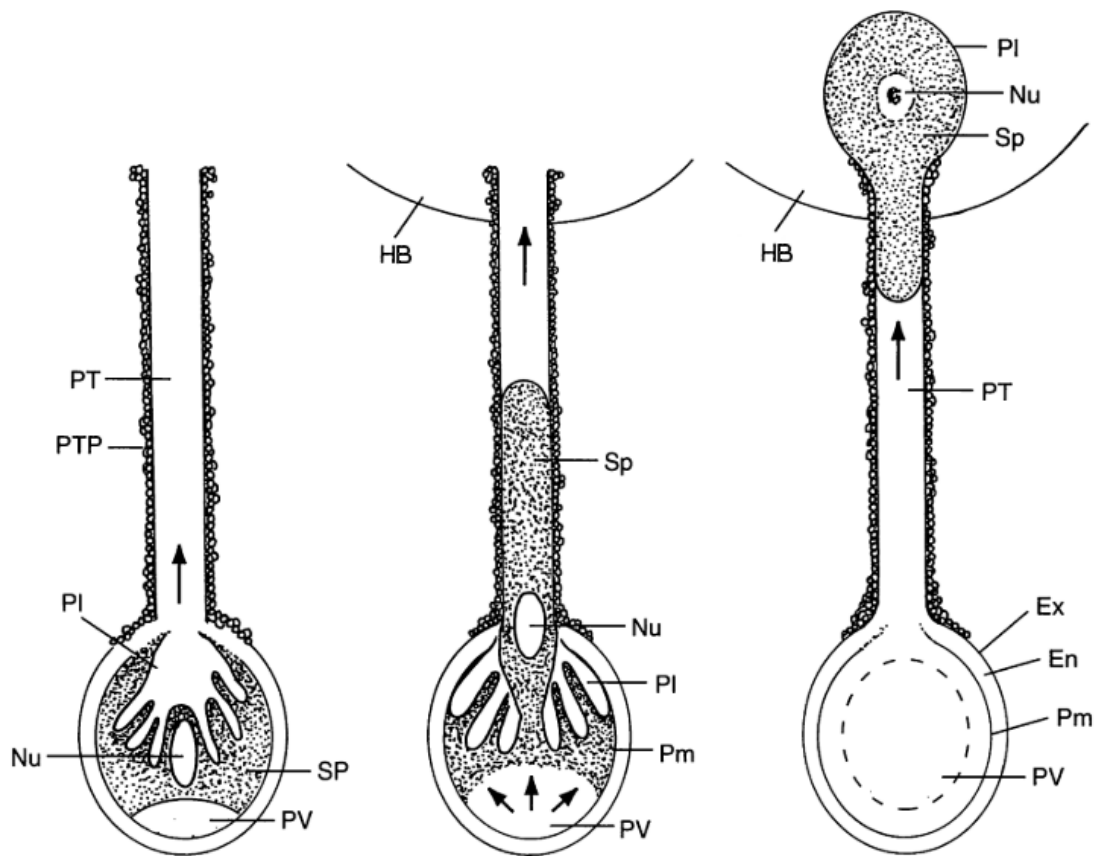


Obr. 8: Schéma modelu uspořádání PTP v pólovém vlákně dle E. Weidnera. **A** - Uspořádání PTP v nevystřeleném PT. **B** - Částečně uspořádané PTP do vlákna. Velikost PTP je v tomto modelu značně zvětšená pro lepší názornost. Upraveno dle⁵¹.

3.4.3 Průnik do hostitelské buňky

Průnik obsahu spory probíhá skrze prázdné PT, které je velice flexibilní a v místě průchodu sporoplazmy zvětšuje průměr až na 400 nm⁵⁷. Polaroplast tvoří obal, novou plazmatickou membránu, pro vznikající sporoplazmu po zanechání původní PM ve spoře (Obr. 9)^{59,60}.

Průnik parazita přes cytoplazmatickou membránu hostitele nebyl zatím dobře prozkoumán, byly však popsány různé způsoby. Prvním z nich je penetrace skrze plazmalemu silným vymrštěním PT a injikace sporoplazmy.⁴⁷ Dalším způsobem je indukce fagocytózy. Pomocí elektronové mikroskopie byla pozorována interakce SWP s povrchem hostitelské buňky, která indukuje fagocytózu (založenou na aktinu) spory hostitelskou buňkou. Parazit následně vystřelí PT a tak unikne z fagozomu⁶¹. Nedávná studie prokázala interakci PTP1 a PTP4 (PTP4 na apikální části PT) s povrchem hostitelské buňky, přesněji PTP4 s transferrinovým receptorem (TfR1) a manozylované PTP1 s manózu vázajícími proteiny. PTP1 svou interakcí adhevalo PT k hostitelskému povrchu a PTP4 po navázání na TfR1 propagovalo signalizaci vedoucí k endocytóze sporoplazmy⁶².



Obr. 9: Schéma přesunu sporoplazmy (SP) do hostitelské buňky (HB). PT - pólové vlákno, PTP - proteiny pólového vlákna, PI - polaroplast, Nu - jádro, PV - zadní vakuola, Pm - plazmatická membrána, Ex - exospora, En - endospora. Upraveno dle⁵⁴.

4. Rozella

Rod *Rozella* patří mezi *Cryptomycota*⁶³ (*Rozellomycota*⁶⁴) a je sesterskou skupinou kmene *Microsporidia*. Jedná se o obligátního endoparazita mnoha skupin hub (*Blastocladiomycota*, *Oomycota*, *Chytridiomycota*) a zelených řas s rozmanitým výskytem (sladká/slaná voda, půda i extrémní podmínky, např. sucha nebo extrémní teploty)⁶⁵. Stejně jako mikrosporidie, *Rozella* využívá k dosažení hostitelské buňky invazní trubice. Kromě invazního aparátu je odlišuje od ostatních parazitických skupin hlavně jejich intracelulární fáze, která postrádá buněčnou stěnu⁶⁶.

Rozella je sekundární konzument, který ovlivňuje populace fytoplanktonu v mořských a sladkovodních ekosystémech. Je parazitem primárních konzumentů, kteří parazitují na producentech (např. *Cyanobacteria*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*). *Rozella* svou parazitickou činností ovlivňuje koloběh uhlíku tím, že nepřímo snižuje množství rozkládané organické hmoty napadáním primárních konzumentů, kteří ji vytvářejí a zvyšuje množství producentů. Aktivita parazita má tedy dopad na produkci skleníkových plynů (CO₂) ve vodních ekosystémech⁶⁵.

4.1 Životní cyklus

Rozella je biotrofický organismus, jehož celá stélka vyrůstá uvnitř sporangii nebo stélky hostitele. Parazit manipuluje svého hostitele k rozčlenění stélky indukci tvorby přepážek a k tvorbě papil sloužící k vypuštění pohyblivých stádií⁶². Životní cyklus parazita je velice jednoduchý v porovnání s jeho hostiteli (např. rod *Allomyces*). Cyklus je zahájen, když plovoucí zoospóra chemotakticky nalézá hostitele. Následuje vazba na hostitele, encystace a invaze. Poté započne trofická fáze, kdy obsah parazita (protoplast/plazmódium) roste za fagocytózy cytoplazmy hostitele^{63,65}. Po této fázi se dělí jádro a vzniká sporangium, které je v hostiteli odděleno přepážkou od dalších sporangii. Mnohoaderné sporangium prochází redukčním dělením, čímž vznikají zoospory, které jsou následně dynamicky vypuštěny skrze papily vytvořené hostitelskou buňkou⁶⁵.

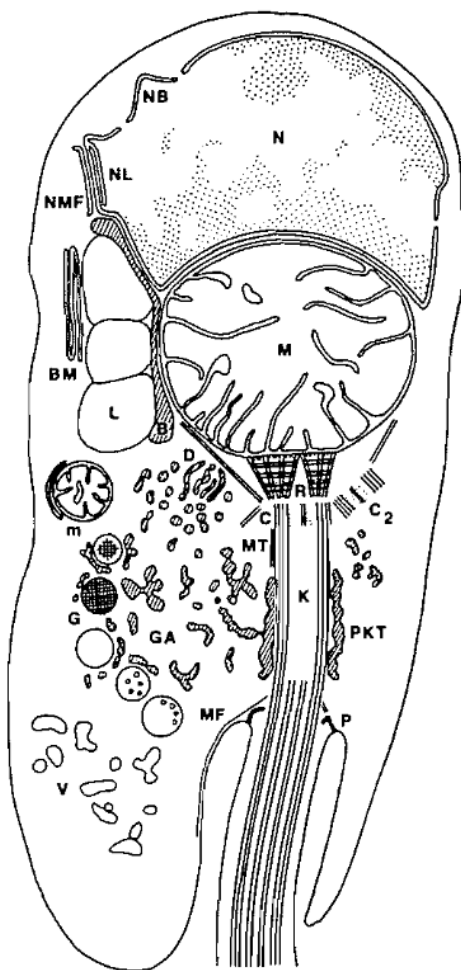
K tomuto vypuštění je však potřebný turgor, který parazit vytváří tím, že celý obsah hostitelského segmentu je vyplněn sporangiem. Zbyde jen stěna hostitele, která sloužila jako ochrana protoplastu. Parazit dále zneužívá hostitelskou buňku tím, že vyvolává u hostitele tvorbu již zmíněné přepážky a papily⁶³. Ve většině případů následuje napadání dalších stélek/sporangii, avšak některé druhy (*R. allomycis*) jsou schopny za nepříznivých podmínek tvořit odolné klidové spory, které se vyznačují chitinovou/celulóзовou rigidní vnitřní stěnou a nechitinózní ostnatou vnější⁶⁵.

Polysporangium (*R. allomycis*) se tvoří pouze při vývoji klidových spor, které se v hostiteli vyvíjí asynchronně, což může vést k vypuštění spor bez vyvinutých stěn. Narozdíl od jednotlivých sporangii, polysporangium zanechává část hostitelské cytoplazmy a infikovaná stélka vykazuje větší hypertrofii.

Část houby, kde se vyvíjí klidové spory, nemůže obsahovat i stádia zoospory a naopak. Je to způsobeno kompeticí o hostitelské mitochondrie, které jsou nutné pro vývoj spor a sporangiálního plazmódia⁶³.

4.2 Stavba zoospory

Zoospora je pohyblivé invazní stádium s jedním bičíkem schopné invadovat hostitele. Zoospory jsou tvaru protáhlého oválu o velikosti 3,5 x 2 μm. Na anterioru zoospory se nachází nukleus tvaru helmy a hned za ním velká mitochondrie. Mitochondrie je v kontaktu s bičíkem ústícím na posterioru skrze fibrilární organelu rhizoplast, která vychází z bazálního tělíska umístěného na ventrální straně buňky. Bazální tělísko je obklopeno Golgiho aparátem s „gamma-like“ vakuolami. V cytoplazmě se dále nachází ribozomy, lipidové globule v klastrech o max. sedmi váčcích asociovaných s mikrotělkem (jednomembránová organela specializovaná na zpracování tuků), zadní vezikuly a mikrotubuly organizované bazálním tělkem (Obr. 10)⁶⁷.

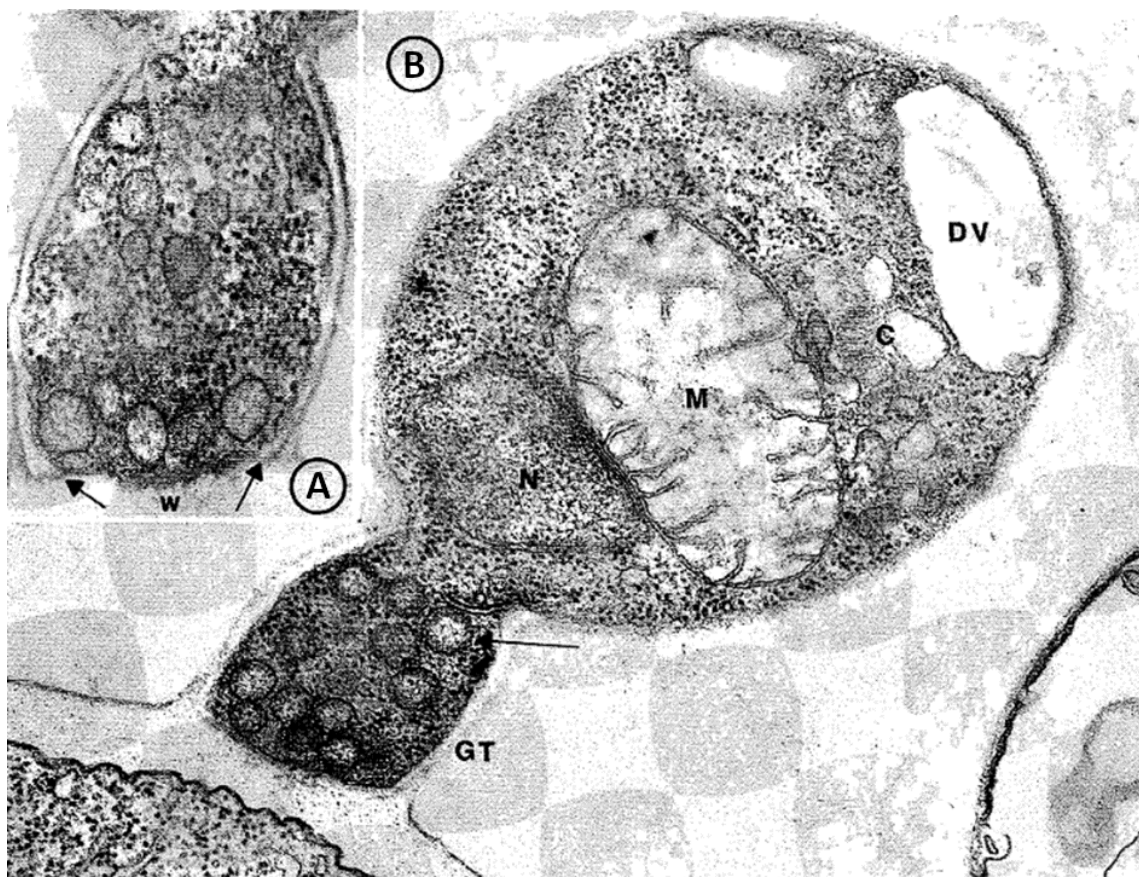


Obr. 10: Schéma stavby zoospory. NB - vyboulení jádra kolem, kterého se nejvíce soustřeďují nukleární póry. NL - jaderný lalok s vysokou proliferací membrány (možný artefakt), NMF - záhyb jaderné membrány, N - jádro, M - mitochondrie. BM - „backing“ membrána, jejíž funkce není známa, je asociována (společně i s mikrotělkem (B)) s lipidovými granulemi. R - rhizoplast, C - centriola tvořící bazální tělísko (K=kinetozom), C₂ - druhá centriola, m - satelitní mitochondrie, G - „gamma-like“ vakuola, MT - mikrotubuly, GA - Golgiho aparát. MF - mikrofilamenta zpevňující dutinu bičíku. P - opora bazálního tělíska, která jej upevňuje v plazmalemě. PKT - perikinetozomální tubuly chránící bazální tělísko. V - zadní vezikuly. Převzato z⁶⁷.

4.3 Invazní aparát cysty

Germinační trubice (Obr. 11) je adaptací na parazitický život a objevuje se až při encystaci zoospory při přisednutí na hostitelský organismus. Vzniká na proximálním konci tenkostěnné cysty jako ztlustělá stěna, pod kterou se hromadí vezikuly s granulárním obsahem. Jejich funkce není známá, ale předpokládá se, že slouží buď k lepší adhezi trubice, nebo k narušení stěny hostitele sekretovanými enzymy⁶⁸. Přesný mechanismus formace trubice a její interakce s povrchem hostitele není podrobněji prozkoumán.

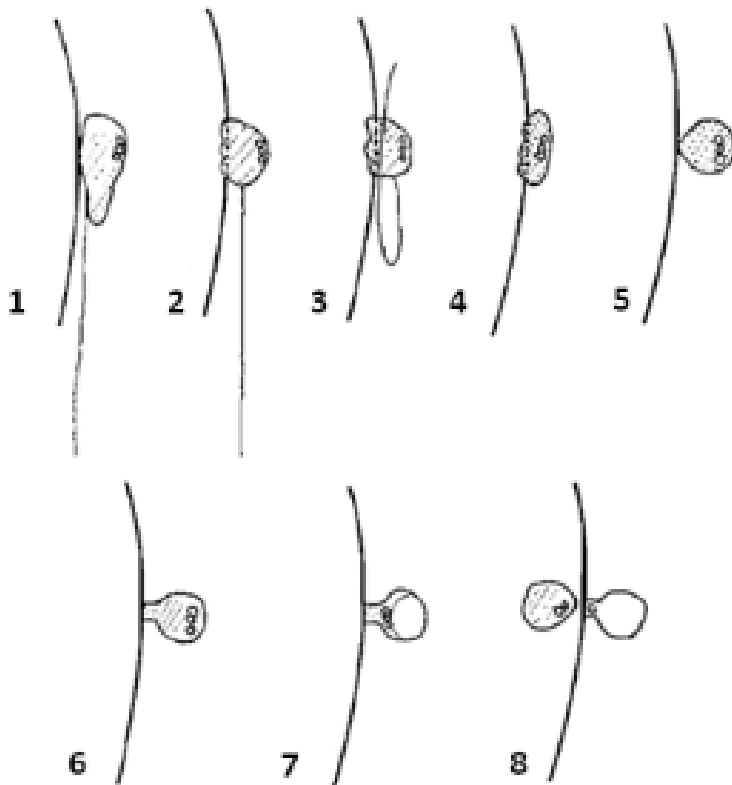
Zadní vakuola se tvoří na distálním konci cysty a vzniká sloučením vakuol s „gamma-like“ granuly a malými vezikuly („gamma-like“ granula pravděpodobně hrají velkou roli i v utváření stěny cysty). Zadní vakuola má důležitou roli v pasírování protoplastu skrze invazní trubici⁶⁸.



Obr. 11: A - Detail invazní trubice *R. allomyces*. w - stěna hyfy houby rodu *Allomyces*. B - Snímek invadující cysty. GT - germinační trubice, N - jádro, M - mitochondrie, C - centriola, DV - zadní vakuola. Upraveno dle⁶⁸.

4.4 Invaze cystou

Způsob invaze rodu *Rozella* se podobá mikrosporidiím, nicméně, je značně zjednodušený nebo spíše méně prozkoumaný (Obr. 12). Invaze začíná po ustání pohybu zoospory a navázáním na hostitelské receptory (reverzibilní děj)^{68,69}. Dalším krokem je encystace spory. Tělo se zkracuje a ventrální strana (směr k povrchu hostitele) vykazuje améboidní pohyb. Bičík se obtočí kolem těla, je pohlcen společně s jeho flagelární dutinou a vytváří se cysta. Do deseti minut od přichycení se podlouhlé tělo cysty mění v zakulacené a do jedné hodiny se vytváří zadní vakuola. Protoplast je pasírován prostřednictvím vzniklé germinální trubice (ireverzibilní spoj) za pomoci síly vyvinuté dynamickým nabobtnáním zadní vakuoly. Na povrchu parazita zůstává jen obal cysty a v hostitelském sporangiu/stélce přechází améboidní kulatá stélka krytá plazmalem do růstové fáze. Celkový čas průniku se pohybuje kolem 30-60 minut od přichycení⁶⁸.



Obr. 12: Schéma invaze zoospory do hostitele. Zaoblené vertikální čáry znázorňují povrch hostitele. 1- navázání na receptory hostitele, 2-4 - encystace spory; 2 - zkrácení těla, 3 - bičík obtočí sporu, 4 - absence bičíku. 5 - zakulacené tělo, 6- tvorba zadní vakuoly, 7 - pasírování protoplastu, 8 - prázdná cysta. Upraveno dle⁶⁸.

5. *Ichthyobodo necator*

Rod *Ichthyobodo* je zástupce třídy *Kinetoplastida*, který napadá povrchové buňky ryb a způsobuje ichthyobodózu. Zástupce *Ichthyobodo necator* je ektoparazitem říčních ryb a jedním z hlavních protozoárních škůdců lososovitých⁷⁰, a proto představuje významnou ekologickou hrozbu.

Schopnost adaptace na odlišné pH a teplotu umožňuje možnost výskytu po celém světě. Rod *Ichthyobodo* je schopen přežít i přechod do brakických či slaných vod a proliferovat, avšak s přechodem přichází i změna ve velikosti a ultrastruktuře přichytných disků. Pozorování infekce sladkovodních ryb mořskými bičíkovci (a naopak) potvrdilo, že kvůli změnám ve struktuře disku již nejsou schopni infikovat ryby z rozdílných vod. Ve slaných vodách preferuje rod *Ichthyobodo* uchycení na žábrách, v sladkých spíše na pokožce⁷⁰. Největší úmrtnost je mezi larvami ryb, dospělci vykazují mírnou mortalitu⁷¹. Od podobných prvoků (např. *Octomitus salmoni*) se spolehlivě rozezná svým neuniformním zmatečným pohybem⁷².

Projevy ichthyobodózy neboli kostiózy jsou nejvýraznější ve čtvrtém týdnu od nákazy, kdy dochází k nejvyšší mortalitě ryb. Bičíkovec svou aktivitou ničí hostitelské buňky. Tyto buňky (Malthighiho buňky) mohou vykazovat hyperplazii, vakuolizaci, hemoragii i pórovitost. Těžce zasažené ryby pak trpí erozí kůže, kdy se jim odlupuje epidermis od bazální vrstvy. Po nekróze pokožky nejsou ryby schopny správné osmoregulace, což má efekt na životaschopnost ryb⁷³.

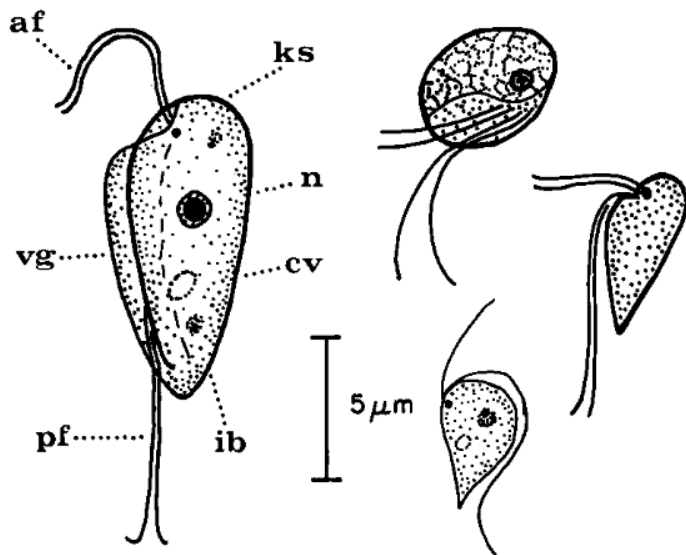
5.1 Stavba *I. necator*

I. necator je jednojaderný prvek kulatého tvaru, jenž má 2 bičíky (dorzální, ventrální) využívané k pohybu. Po přichycení na hostitele nabývá hruškovitého tvaru a je dorso-ventrálně zploštělý^{71,72}. Velikost bičíkovce činí 0,01-0,02 mm. Tělo parazita je vyztuženo axostylem, což je tubulární útvar, který koresponduje s mikrotubuly asociující s cytostomální trubicí⁷⁴.

V cytoplazmě se nachází jeden centrální nukleus, granulární kinetoplast, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, kinetoplast, potravní a kontraktilní vakuola⁷⁴. Kontraktilní vakuola slouží k vypuzení vody a u mořských *Ichthyobodo* se nenachází, což je pravděpodobně následkem přizpůsobení se rozdílným osmotickým tlakům⁷¹. Stavba *I. necator* je znázorněna na Obr. 13.

Bičíky jsou umístěny v periflagelární kapse, která zasahuje do půli těla a nejsou stejné délky^{72,74}. Bičíky jsou mikrotubulární a klasicky organizované v axonemu s motivem „9x2+2“. Bičík je zpevněn paraxiální tyčí, která je mohutnější v dorzálním bičíku. Pohybový aparát je upevněn bazálním tělískem složeným z „9x3“ mikrotubulů⁷⁴.

Kinetoplast u rodu *Ichthyobodo* se nachází v prodloužené mitochondrii a je na rozdíl od ostatních kinetoplastid distribuován do několika váčků po celé buňce. Tvar váčku je oválný nebo elipsovitý. Kinetoplast obsahuje tzv. maxi – a minikroužky. Maxi kroužky obsahují mitochondriální DNA, která však kóduje nesmyslné transkripty. Pro úpravu nečitelné RNA slouží minikroužky, které kódují tzv. guide-RNA účastníci se procesu zvaného RNA-editing⁷⁴.



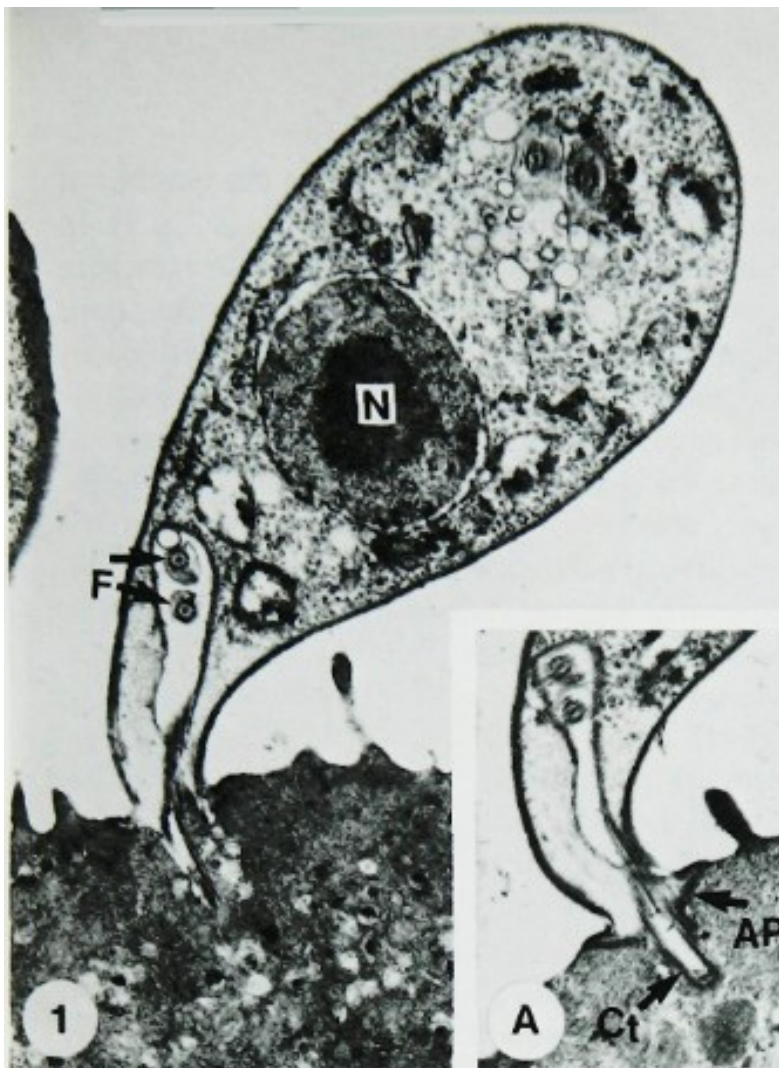
Obr. 13: Stavba *I. necator* ve fázi před dělením. af, pf - zdvojené bičíky jsou zde označeny jako anteriorní a posteriorní, ks - kinetozom neboli bazální tělísko, n - jádro, vg - ventrální (periflagelární) rýha, cv - kontraktilní vakuola, ib - inkluzní tělíska (granula). Upraveno dle⁷⁷.

5.2 Životní cyklus a invaze

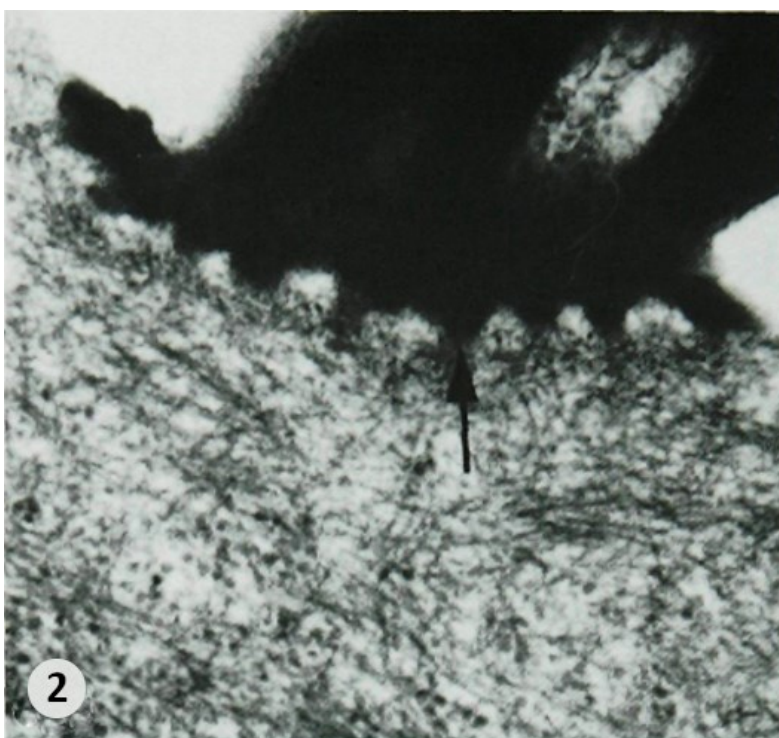
Rod *Ichthyobodo* je obligátní ektoparazit⁶², jeho volná forma má malou životnost^{71,72}. Po přichycení na hostitele se během pár sekund přemění na přisedlé stádium bez bičíků (trofozoit), napadá hostitele a cytostomem saje buněčný obsah^{72,74}. Prvotní popisy invaze v 50. letech předpokládaly, že parazit proráží membránu hostitelské buňky. Pozdější pozorování však ukázala, že sání předchází formace přichytného disku kolem cytostomu a ten postupně penetruje buňku epidermis⁷⁵. Po dokončení sání se bičíkovec odpojí od hostitele a pokračuje diferenciací do stádia „před dělením“. Stádium před podélným dělením je charakteristické zvětšením buňky a zdvojnásobením počtu bičíků. *I. necator* je schopen se dělit i v sedimentu na mrtvém hostiteli a netvoří cysty^{72,74}.

5.3 Invazní aparát

Invazní aparát je součástí cytostomálního komplexu (rostrum) jako trubicovitá struktura, která sahá až k posterioru buňky (Obr. 14). Kolem cytostomu (invazní aparát) je pelikula, která formuje přichytný disk. Tento komplex je pozorovatelný pouze u sajícího parazita⁷⁴. Rostrum vypadá jako nos a jeho výčnělek obsahuje konec axostylu, který napomáhá extenzi cytostomu do hostitelské buňky⁷⁴. Přichytný disk je zvrásněný zejména u říčních forem a u mořských je hladký^{71,76}.



Obr. 14: Snímky z elektronové mikroskopie. **1** - Trofozoit přichycený k HB. F - průřez bičičky, N - jádro. **1A** - Detail vysunutého cytostomu (Ct), AP - přichytný disk. Upraveno dle⁷⁸. **2** - Přichytný disk říčního *Ichthyobodo*, kde lze pozorovat zvrásnění (šipka). Upraveno dle⁷⁵.



6. Závěr

Práce si kladla za cíl prozkoumat invazi vybraných prvoků, u kterých se vyvinuly hostitelsky specifické invazní aparáty. Na základě odborné literatury byl shrnut způsob invaze a stavba invazního aparátu u rodu *Plasmodium*, kmene *Microsporidia*, rodu *Rozella* a *Ichthyobodo*.

Rod *Plasmodium* je původcem jednoho z nejzávažnějších infekčních onemocnění, malárie. Kvůli celosvětovému dopadu nemoci se jedná o jednoho z nejprozkoumanějších parazitů. Práce byla zaměřena především na invazní aparát, tzv. apikální komplex, v erytrocytárním stádiu merozoitu. Apikální komplex je systém sekrečních organel a cytoskeletárních struktur určených k invazi a pohybu. Invaze zahrnuje několik kroků, mezi něž patří dosažení hostitele pomocí klouzavého pohybu zvaného gliding a interakce s povrchem hostitelské buňky. Nejprozkoumanější interakcí je vznik pohyblivého těsného spoje (MJ) zprostředkovaný AMA1 a RON komplexem, které jsou sekretovány z organel apikálního komplexu. Objevem pohyblivého spoje byl vyvrácen předpoklad, že merozoit se apikálním komplexem „zavrtává“ do erytrocytu. Neprobíhá tedy penetrace, ale postupná internalizace parazita do erytrocytu. S tímto poznatkem bylo změněno i cílení léčby z méně účinného zastavení glidingu na rozrušení komponentů MJ. Výzkum zaměřený na komponenty MJ by mohl vést k inovaci léčiv, jež by zvrátila boj se zvyšující se rezistencí parazita na dostupné léky.

Kmen *Microsporidia* patří mezi méně zkoumanou skupinu organismů, ačkoliv dopad onemocnění na zdraví populace a ekonomiku není zanedbatelný. Celý obsah spory mikrosporidií je vysoce adaptován na parazitický způsob života. Součástí invazního aparátu je mimo jiné pólové vlákno, které je vystřeleno ze spory vysokou rychlostí a infekční sporoplazma je přenesena do hostitele. Pólové vlákno je složeno ze tří hlavních proteinových komponent, PTP1, 2 a 3. Jak se tvoří invazní aparát nebo jak jsou PTP uspořádány v rámci pólového vlákna je dosud prozkoumáno velmi málo. Pochopení stavby vlákna a mechanismu invaze obecně by mohlo vést k využití pólového vlákna v nanotechnologiích.

Rozella je parazitem mnoha rodů hub a ve vodních ekosystémech pomáhá udržovat nízkou produkci skleníkových plynů. Jednoduchý životní cyklus obsahuje pohyblivou fázi zoospory, která se po přichycení na receptory hostitele encystuje. Cysta pak tvoří germinační trubici jako most mezi cystou a hostitelskou stélkou. Obsah je dále nabobtnáním zadní vakuoly pasírován skrze trubici. *Rozella* je sesterskou skupinou mikrosporidií, s nimiž sdílí i obdobný způsob invaze. Invazivní aparát se ovšem v mnohém liší. Prvním odlišným znakem je doba tvorby invazního aparátu. U rodu *Rozella* je jeho tvorba indukována, až po přisednutí a následné encystaci na hostiteli, ovšem u mikrosporidií trubice vzniká již při tvorbě spory. Dalším znakem je dynamika invazního aparátu. U rodu *Rozella* nedochází k náhlému vystřelení invazního aparátu jako u její sesterské skupiny, ale k postupné formaci germinační trubice. S tím souvisí i funkce zadní vakuoly, která je narozdíl od mikrosporidií vztažena

pouze na vytlačení obsahu buňky do hostitele a nepodílí se na dynamické extruzi vlákna/trubice. Studium mechanismů invaze rodu *Rozella* by mohlo přiblížit invazní pochody sesterské skupiny kmene *Microsporidia*.

Vodní parazit rodu *Ichthyobodo* je velice rozšířený škůdce ryb schopný rychlé adaptace na změnu podmínek. Vyvolává kožní onemocnění a má velký dopad na populace ryb (např. platýs, losos) ve sladkých i slaných vodách, škodu však působí i chovatelům akvariálních ryb. Trofozoit přisedá na povrch hostitele za pomoci přichytného disku a napadá kůži vysunovatelným cytostomem, kterým nasává cytoplazmu buněk. Bičíkovec se dostává pod povrch hostitelských buněk postupným mechanickým rozrušováním, čímž se značně liší od způsobu invaze např. plasmodia. Tomuto bičíkovci je věnováno velice málo studií a struktura a interakce s povrchem hostitele není téměř prozkoumána. Nejvíce studií proběhlo ve Francii a Německu v minulém století. Od té doby však zájem o tohoto bičíkovce opadl. Zdokonalení znalostí invazního aparátu a přichytného disku by se mohla vyvinout léčba, která se vyvaruje použití chemických látek, které jsou toxické pro napadené ryby (např. použití formalínu⁷¹).

7. Seznam zkratek

ADF	Aktinový depolymerizační faktor
AMA1	Apikální membránový antigen
CDPK	Kalcium-dependentní protein kinázy
CyPRA	Cysteine-rich protective antigen
EnP	Protein endospory
GAP	Glideosom asociovaný protein
GAPMs	Glideosome-associated protein with multiple-membrane spans
IMC	Vnitřní membránový komplex
IMP	Vnitromembránové částice
MAP	Proteiny asociované s mikrotubuly
MIP	Mikronemální protein
MJ	Pohyblivý těsný spoj
MSP	Merozoitní povrchový protein
MyoA	Myozin A
MyoH	Myozin H
PM	Plazmatická membrána
PT	Pólové vlákno
PTP	Protein pólového vlákna
PV	Parazitoformní vakuola
RESA	Povrchový antigen prstýnkem nakaženého erytrocytu
Rh	Retikulocyt vázající proteinový homolog
RhopH	Vysokomolekulární komplex z roptrií
RIPR	Rh5-interagující proteiny
ROM4	Rhomboid-like malarial proteáza 4
RON	Rhoptry neck protein
ROP	Protein roptrií
SUB2	Subtilisinu podobná serin proteáza 2
SWP	Protein stěny spory

8. Reference

1. *Siński E, Behnke JM. Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Polish J Microbiol.* 2004;53 Suppl:67-73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15787200>.
2. *Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* 2012;44(11):805-814. doi:10.3109/00365548.2012.693197
3. *Shirley DT, Moonah SN, Kotloff KL. Burden of disease from Cryptosporidiosis Debbie-Ann. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;25(5):555-563. doi:10.1097/QCO.0b013e328357e569.Burden
4. *Nohýnková E, Stejskal F. Malárie. 2011;44:1-7. papers2://publication/uuid/E11CE4AB-AAD1-4C57-9294-B2A4A7871327.
5. *Aikawa M. Parasitological review. Plasmodium: the fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol.* 1971;30(2):284-320.
6. *Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. 2009;6(11):1249-1254.
doi:10.1016/j.cgh.2008.07.016.Cytokeratin
7. *Leete TH, Rubin H. Malaria and the cell cycle. *Parasitol Today.* 1996;12(11):442-444.
doi:10.1016/0169-4758(96)10068-5
8. *Arnot DE, Gull K. The Plasmodium cell cycle: facts and questions. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92(4):361-365. doi:10.1080/00034989859357
9. Jacobberger JW, Horan PK, Hare JD. Cell cycle analysis of asexual stages of erythrocytic malaria parasites. *Cell Prolif.* 1992;25(5):431-445. doi:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01452.x
10. Smalley ME. Plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro. *Nature.* 1976;264(5583):271-272. doi:10.1038/264271a0
11. *Fréal K, Dubremetz JF, Lebrun M, Soldati-Favre D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(11):645-660. doi:10.1038/nrmicro.2017.86
12. *Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol.* 2012;198(6):961-971. doi:10.1083/jcb.201206112
13. *Mcfadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. 2017;25(3):289-313.
doi:10.1016/j.bbi.2017.04.008
14. Aikawa M. Ultrastructure of the pellicular complex of Plasmodium fallax. *J Cell Biol.* 1967;35(1):103-113. doi:10.1083/jcb.35.1.103
15. Butcher GA, Dennis ED, Mitchell GH. Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro. *Parasitology.* 1975;71(3):483-491.
doi:10.1017/S0031182000047247
16. Khater EI, Sinden RE, Dessens JT. A malaria membrane skeletal protein is essential for normal morphogenesis, motility, and infectivity of sporozoites. *J Cell Biol.* 2004;167(3):425-432.
doi:10.1083/jcb.200406068
17. *Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. *Trends Parasitol.* 2008;24(12):557-563.
doi:10.1016/j.pt.2008.08.006
18. Morrisette NS, Murray JM, Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an

- intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 1:35-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010782>.
19. *Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):21-38; table of contents. doi:10.1128/MMBR.66.1.21
 20. *Opitz C, Soldati D. "The glideosome": A dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 2002;45(3):597-604. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x
 21. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*. 2011;9(1):9-20. doi:10.1016/j.chom.2010.12.003
 22. Torii M, Adams JH, Miller LH, Aikawal M. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect Immun*. 1989;57(10):3230-3233. <http://iai.asm.org/>. Accessed July 3, 2019.
 23. Anthony RM, Witney AA, Yates JR, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002;419(6906):520-526. doi:10.1038/nature01107
 24. *Boucher LE, Bosch J. The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function. *J Struct Biol*. 2015;190(2):93-114. doi:10.1016/j.jsb.2015.02.008
 25. Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science (80-)*. 1975;187(4178):748-750. doi:10.1126/science.803712
 26. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. *J Cell Biol*. 1978;77(1):72-82. doi:10.1083/jcb.77.1.72
 27. Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;50(2):307-315. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741018>.
 28. Howell SA, Hackett F, Jongco AM, et al. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Mol Microbiol*. 2005;57(5):1342-1356. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04772.x
 29. Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, et al. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog*. 2005;1(3):241-251. doi:10.1371/journal.ppat.0010029
 30. Camus D, Hadley TJ. A *Plasmodium falciparum* Antigen That Binds to Host Erythrocytes and Merozoites. *Adv Sci*. 1985;230(4725):553-556.
 31. O'Donnell RA, Hackett F, Howell SA, et al. Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol*. 2006;174(7):1023-1033. doi:10.1083/jcb.200604136
 32. *Harvey KL, Gilson PR, Crabb BS. A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2012;42(6):567-573. doi:10.1016/j.ijpara.2012.02.011
 33. Okoyeh JN, Pillai CR, Chitnis CE. *Plasmodium falciparum* field isolates commonly use erythrocyte invasion pathways that are independent of sialic acid residues of glycophorin A. *Infect Immun*. 1999;67(11):5784-5791.
 34. *Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell*.

2006;124(4):755-766. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006

35. Volz JC, Yap A, Sisqueira X, et al. Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host Microbe*. 2016;20(1):60-71. doi:10.1016/j.chom.2016.06.004
36. *Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe*. 2017;22(2):232-245. doi:10.1016/j.chom.2017.07.003
37. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, et al. Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14815-14822. doi:10.1074/jbc.M109.080770
38. Alexander DL, Arastu-Kapur S, Dubremetz J-F, Boothroyd JC. Plasmodium falciparum AMA1 Binds a Rhoptry Neck Protein Homologous to TgRON4, a Component of the Moving Junction in Toxoplasma gondii . *Eukaryot Cell*. 2006;5(7):1169-1173. doi:10.1128/ec.00040-06
39. Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. Blackman MJ, ed. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000746. doi:10.1371/journal.ppat.1000746
40. Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog*. 2009;5(1). doi:10.1371/journal.ppat.1000273
41. Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol*. 2000;17(1):23-31. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026235
42. Vossbrinck CR, Debrunner-Vossbrinck BA. Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol (Praha)*. 2005;52(1-2):131-142. doi:10.14411/fp.2005.017
43. *Stentiford GD, Becnel JJ, Weiss LM, et al. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol*. 2016;32(4):336-348. doi:10.1016/j.pt.2015.12.004
44. *Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: Current status. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(5):485-492. doi:10.1097/01.qco.0000244055.46382.23
45. *Dunn AM, Smith JE. Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission. *Microbes Infect*. 2001;3(5):381-388. doi:10.1016/S1286-4579(01)01394-6
46. *Cali A, Takvorian PM. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. *Microsporidia Pathog Oppor First Ed*. 1999:71-133. doi:10.1002/9781118395264.ch2
47. *Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(4):426-461. doi:10.1128/CMR.7.4.426
48. *Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *The Fungal Kingdom*. 2017;(March 2018):97-113. doi:10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016
49. Lom J. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitschrift fur Parasitenkd*. 1972;38(3):200-213. doi:10.1007/BF00329598

50. Haag KL, James TY, Pombert J-F, et al. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15480-15485. doi:10.1073/pnas.1410442111
51. Weidner E. The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *J Cell Biol*. 1982;93(3):976-979. doi:10.1083/jcb.93.3.976
52. Peuvel I, Peyret P, Méténier G, Vivarès CP, Delbac F. The microsporidian polar tube: Evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;122(1):69-80. doi:10.1016/S0166-6851(02)00073-7
53. Frixione E, Ruiz L, Undeen A, H. Monovalent Cations Induce Microsporidian Spore Germination In Vitro. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41(5):464-468. doi:10.1111/j.1550-7408.1994.tb06043.x
54. *Xu Y, Weiss LM. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol*. 2005;35(9):941-953. doi:10.1016/j.ijpara.2005.04.003
55. Leitch GJ, Scanlon M, Visvesvara GS, Wallace S. Calcium and Hydrogen Ion Concentrations in the Parasitophorous Vacuoles of Epithelial Cells Infected with the Microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *J Eukaryot Microbiol*. 1995;42(5):445-451. doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb05889.x
56. Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, Weiss LM. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun*. 2004;72(11):6341-6350. doi:10.1128/IAI.72.11.6341-6350.2004
57. Weidner E. The microsporidian spore invasion tube The Ultrastructure , Isolation , and Characterization of the Protein Comprising the Tube Collection of Spores Induction o f Spore Discharge. *Cell*. 1976;71:23-34.
58. Bouzahzah B, Nagajyothi F, Ghosh K, et al. Interactions of *Encephalitozoon cuniculi* polar tube proteins. *Infect Immun*. 2010;78(6):2745-2753. doi:10.1128/IAI.01205-09
59. WEIDNER E, BYRD W, SCARBOROUGH A, PLESHINGER J, SIBLEY D. Microsporidian Spore Discharge and the Transfer of Polaroplast Organelle Membrane into Plasma Membrane. *J Protozool*. 1984;31(2):195-198. doi:10.1111/j.1550-7408.1984.tb02948.x
60. *Keohane EM, Weiss LM. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. 1999:196-224.
61. *Franzen C. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol (Praha)*. 2005;52(1-2):36-40. doi:10.14411/fp.2005.005
62. Han B, Polonais V, Sugi T, et al. The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(4):e1006341. doi:10.1371/journal.ppat.1006341
63. Powell MJ, Letcher PM, James TY. Ultrastructural characterization of the host–parasite interface between *Allomyces anomalus* (Blastocladiomycota) and *Rozella allomycis* (Cryptomycota). *Fungal Biol*. 2017;121(6-7):561-572. doi:10.1016/j.funbio.2017.03.002
64. Corsaro D, Walochnik J, Venditti D, Steinmann J, Müller KD, Michel R. Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitol Res*. 2014;113(5):1909-1918. doi:10.1007/s00436-014-3838-4
65. *Gleason FH, Carney LT, Lilje O, Glockling SL. Ecological potentials of species of *Rozella* (Cryptomycota). *Fungal Ecol*. 2012;5(6):651-656. doi:10.1016/j.funeco.2012.05.003

66. *Held AA. Rozella rozellopsis: Naked Endoparasitic Fungi which dress-up as their hosts. *Rev Lit Arts Am.* 1981;47(4):451-515.
67. Held AA. The zoospore of *Rozella allomycis* : ultrastructure. *Can J Bot.* 1975;53(19):2212-2232. doi:10.1139/b75-245
68. Held AA. Encystment and germination of the parasitic chytrid *Rozella allomycis* on host hyphae. *Can J Bot.* 1973;51(10):1825-1835. doi:10.1139/b73-234
69. Held AA. Attraction and attachment of zoospores of the parasitic chytrid *Rozella allomycis* in response to host-dependent factors. *Arch Microbiol.* 1974;95(1):97-114. doi:10.1007/BF02451752
70. Todal JA, Karlsbakk E, Isaksen TE, et al. *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida) — a complex of sibling species. 2004;58(Urawa 1992):9-16.
71. *Urawa S, Ueki N, Karlsbakk E. A Review of *Ichthyobodo* Infection in Marine Fishes. *Fish Pathol.* 1998;33(4):311-320. doi:10.3147/jsfp.33.311
72. *Frederic F. Fish (1941) Notes on *Costia Necatrix*, Transactions of the American Fisheries Society, 70:1, 441-445, DOI: 10.1577/1548-8659(1940)70[441:NOCN]2.0.CO;2
73. Urawa S. Effects of *Ichthyobodo necator* infections on seawater survival of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture.* 1993;110(2):101-110. doi:10.1016/0044-8486(93)90264-Y
74. *Isaksen TE. *Ichthyobodo* infections on farmed and wild fish. 2013.
75. Roubal FR, Bullock AM. Differences between the host-parasite interface of *Ichthyobodo necator* (Henneguy, 1883) on the skin and gills of salmonids. *J Fish Dis.* 1987;10(3):237-240. doi:10.1111/j.1365-2761.1987.tb01067.x
76. Lamas J, Bruno DW. Observations on the ultrastructure of the attachment plate of *Ichthyobodo* sp., from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the marine environment. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 1992;12(5):171-173.
77. *Becker CD. (1977) Flagellate parasites of fish. In: Parasitic Protozoa Vol. I. Taxonomy, Kinetoplastids and Flagellates of Fish (ed. by J. P. Kreier), pp. 357-412. Academic Press, London.
78. Diamant A. Ultrastructure and pathogenesis of *Ichthyobodo* sp. from wild common dab, *Limanda limanda* L., in the North Sea. *J Fish Dis.* 1987;10(3):241-247. doi:10.1111/j.1365-2761.1987.tb01068.x

*sekundární citace