

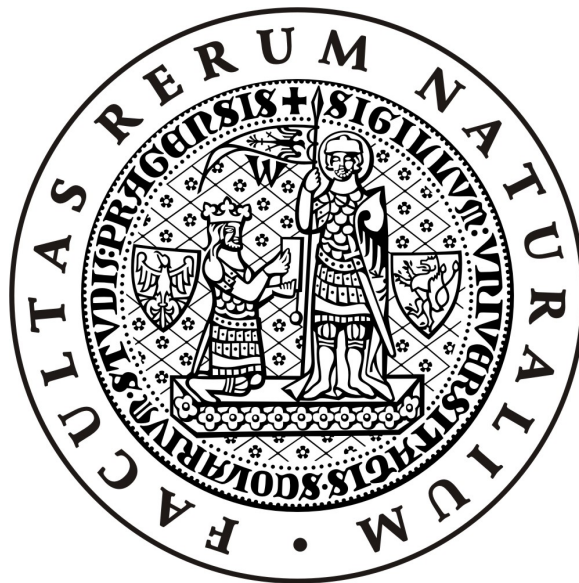
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie

Katedra parazitologie



Bc. Jana Hlaváčová

Vývoj leishmanií podrodu *Viannia* v přenašeči

Viannia development in the vector

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně 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 19. 8. 2011

Jana Hlaváčová

Poděkování

Můj velký dík patří mému školiteli prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. Pane profesore, děkuji Vám za cenné rady, nápady, pomoc a čas, který jste mi i přes obrovské pracovní vytížení věnoval.

Za pomoc při experimentech bych chtěla poděkovat Mgr. Jovaně Sádlové, Ph.D., Mgr. Lucii Ječné, Mgr. Veronice Hrobárikové a Mgr. Lucii Lantové. Doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. děkuji za pomoc s kvantitativní PCR. Celému týmu naší laboratoře děkuji za přátelské prostředí a ochotu kdykoliv poradit a podat pomocnou ruku.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu během mého studia. Mé největší díky náleží Vám, drazí rodičové.

ABSTRAKT

Leishmanie podrodu *Viannia* jsou parazitičtí prvoci přenášení flebotomy (Diptera: Phlebotominae). Vyskytují se v tropických a subtropických oblastech Jižní Ameriky, kde způsobují kutánní a mukokutánní leishmaniózy. Naše práce se zabývala vývojem zástupců podrodu *Viannia* v trávicím traktu přenašeče a faktory, které jejich vývoj ovlivňují.

V první části jsme zkoumali, jakým způsobem se vyvíjí *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* v trávicím traktu *Lutzomyia longipalpis*. Pomocí GFP značeného kmene jsme potvrdili, že se jedná o peripylární typ vývoje. Po úniku z endoperitrofického prostoru promastigoti nejprve kolonizovali zadní střevo a poté migrovali anteriorně. Ve střevě se vyskytovaly 4 morfologické formy: dlouhé nektomonády, krátké nektomonády, metacykličtí promastigoti a paramastigoti. Pomocí histologických metod jsme demonstrovali přichycení leishmanií v pyloru, zatímco v mesenteronu byli přítomní pouze volní promastigoti. Přichycení promastigotů k epitelu mesenteronu, které je běžné u podrodu *Leishmania*, u *L. braziliensis* nebylo pozorováno.

Další část práce byla věnována vlivu teploty na zástupce podrodu *Viannia* v přenašeči. Sledovali jsme vývoj dvou blízce příbuzných druhů *L. peruviana* a *L. braziliensis* ve střevě *Lu. longipalpis* při 20 °C a 26 °C. *Leishmania braziliensis* se vyvíjela dobře za obou sledovaných teplot. *Leishmania peruviana* byla schopná dospět do stadia pozdní infekce pouze ve 20 °C. To svědčí o adaptaci *L. peruviana* na vývoj v nižších teplotách a její neschopnosti přizpůsobit se rychlejšímu trávení a časnější defekaci flebotomů za vyšších teplot.

V třetí části jsme se pokusili objasnit, jaký vliv má RNA interference (RNAi) na vývoj *L. braziliensis* v trávicím traktu *Lu. longipalpis*. V našich experimentech jsme porovnávali vývoj přirozené linie WT s vývojem mutantních linií c14 a c16 a reexprimujících linií c401 a c605. Mutantní linie mají delecí genu pro protein Argonaut, jež je esenciální pro funkci dráhy RNAi. Během experimentů jsme bohužel zjistili, že všechny testované linie kmene M2903, včetně kontrolní WT, nejsou schopné vývoje v pozdějších fázích infekce. Vliv RNAi na vývoj *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* se proto nepodařilo objasnit.

Klíčová slova: *Viannia*, vývoj, přenašeč, teplota, RNA interference

ABSTRACT

Leishmania of the subgenus *Viannia* are protozoan parasites transmitted by phlebotomine sandflies (Diptera: Phlebotominae). They occur in tropical and subtropical areas in South America, where they cause cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In this thesis, we studied developmental pattern of *Viannia* group and factors affecting its development within the sand fly gut.

First, we investigated *Leishmania braziliensis* development within the *Lutzomyia longipalpis* digestive tract. Using GFP-labeled strain we demonstrated peripylar development: promastigotes escaped from the endoperitrophic space, colonized the hindgut and then migrated anteriorly. Four morphological forms were found within the *Lu. longipalpis* digestive tract: elongated nectomonads, short nectomonads, metacyclic promastigotes and paramastigotes. Furthermore, using the histological methods we demonstrated parasite attachment in pylorus region, while there were only free promastigotes in the midgut; neither form was found attached to the midgut epithelium.

The next part was devoted to the effect of temperature on *Viannia* in *Lu. longipalpis*. We compared development of two closely related species *L. peruviana* and *L. braziliensis* at 20 °C and 26 °C. *Leishmania braziliensis* developed well in both temperatures tested, *L. peruviana* developed late-stage infections only at 20 °C. These results suggest that *L. peruviana* is adapted to lower temperature and is unable to survive vector's faster digestion and earlier defecation at higher temperature.

In the third part of the thesis we tried to clarify the effect of RNA interference (RNAi) on *L. braziliensis* development within the *Lu. longipalpis* digestive tract. We compared development of wild type with knock-downs c14 and c16 and add-backs c401 and c605. Knock-downs had inactivated RNAi pathway through deletion of the Argonaut gene. Unexpectedly, we found that all tested lines of M2903 strain, including the wild type, did not develop in the later stages of infection. Therefore, the question whether the RNA interference affects *L. braziliensis* development within the sand fly *Lu. longipalpis* remains unanswered.

Key words: *Viannia*, development, vector, temperature, RNA interference

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Postavení podrodu <i>Viannia</i> v rámci rodu <i>Leishmania</i>	10
2.2 Vývoj podrodu <i>Viannia</i> v přenašeči	14
2.2.1 Trávicí trakt flebotomů	14
2.2.2 Vývoj podrodu <i>Viannia</i> v přenašeči	15
2.3 Lipofosfoglykan	20
2.4 Vliv teploty na trávení flebotomů a vývoj leishmanií v přenašeči	23
2.5 RNA interference u leishmanií	24
3 MATERIÁL A METODIKA	26
3.1 Složení použitých roztoků	26
3.2 Použité druhy leishmanií a jejich kultivace	26
3.3 Experimentální infekce	28
3.3.1 Příprava kůžiček	28
3.3.2 Infekční sání	28
3.3.3 Pitvy střeva samic	28
3.3.4 Schéma pokusů infekčního sání	29
3.4 Porovnání růstu <i>L. peruviana</i> (HB86) a <i>L. braziliensis</i> (LC2177) v kultuře.....	29
3.5 Morfologie leishmanií během vývoje v přenašeči	30
3.6 Kvantitativní PCR	30
3.7 Histologie a elektronová mikroskopie	31
4 VÝSLEDKY	32
4.1 Vývoj <i>L. braziliensis</i> v <i>Lu. longipalpis</i>	32
4.1.1 Vývoj kmene XD29	32
4.1.2 Histologie <i>Lu. longipalpis</i> nakažených kmenem LC2177	32
4.2 Morfologie <i>L. braziliensis</i> ze střeva <i>Lu. longipalpis</i>	35
4.3 Vliv teploty na vývoj leishmanií podrodu <i>Viannia</i>	37
4.3.1 Vliv teploty na vývoj <i>L. peruviana</i> (HB86) v <i>Lu. longipalpis</i>	37
4.3.2 Vliv teploty na vývoj <i>L. braziliensis</i> (LC2177) v <i>Lu. longipalpis</i>	38
4.3.3 Porovnání vývoje <i>L. peruviana</i> a <i>L. braziliensis</i> v <i>Lu. longipalpis</i> při 20 °C a 26 °C pomocí qPCR	39
4.3.4 Vývoj <i>L. peruviana</i> v kultuře při 20 °C a 26 °C	41

4.3.5 Vývoj <i>L. braziliensis</i> v kultuře při 20 °C a 26 °C	41
4.4 Porovnání vývoje mutantů <i>L. braziliensis</i> M2903 v <i>Lu. longipalpis</i>	42
4.4.1 WT, c14, c401 v <i>Lu. longipalpis</i>	42
4.4.2 WT, c16, c605 v <i>Lu. longipalpis</i>	44
4.4.3 Shrnutí výsledků vývoje <i>L. braziliensis</i> M2903 a jejích mutantů v <i>Lu. longipalpis</i>	46
4.4.4 Porovnání vývoje <i>L. braziliensis</i> (M2903) a <i>L. braziliensis</i> (LC2177) v <i>Lu. longipalpis</i>	48
5 DISKUZE	49
5.1 Vývoj <i>L. braziliensis</i> v <i>Lu. longipalpis</i>	49
5.2 Morfologie buněk <i>Leishmania braziliensis</i>	50
5.3 Vliv teploty na vývoj <i>L. peruviana</i> a <i>L. braziliensis</i>	51
5.4 Porovnání vývoje mutantů <i>L. braziliensis</i> M2903 v <i>Lu. longipalpis</i>	53
6 ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ	55
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

1 ÚVOD

Leishmanie jsou skupinou parazitických prvoků patřících společně s trypanosomami do skupiny Kinetoplastida. Během svého vývoje vystřídají dva hostitele: obratlovce a flebotomy, krevsající hmyz z čeledi Phlebotominae. U lidí způsobuje tento prvok leishmaniózu, onemocnění s širokým spektrem projevů od kutánních a mukokutánních lézí až po napadení vnitřních orgánů. Leishmanie se vyskytují především v subtropickém a tropickém pásu Starého i Nového Světa, v posledních letech ale bylo v Evropě a Severní Americe zaznamenáno jejich šíření do severnějších oblastí.

Podrod *Viannia* je jedním ze tří podrodů rodu *Leishmania*. Jeho výskyt je omezen na oblasti subtropů a tropů Jižní Ameriky. Vývojem těchto leishmanií v přenašeči se zabývalo pouze několik autorů. Je všeobecně známo, že leishmanie podrodu *Viannia* se v trávicím traktu flebotomů vyvíjí peripylárně, tj. nejen v mesenteronu, ale i v zadním střevě. Pouze v jedné práci je zmínka o přichytávání těchto leishmanií k mesenteronu. Nikdo prozatím neobjasn timer, zda je toto přichycení zajištěno vkládáním bičíků mezi mikrovilli, jak je tomu u sesterského podrodu *Leishmania*. Studium jednotlivých vývojových stadií vyskytujících se v přenašeči také nebylo věnováno příliš pozornosti, podrobná morfologická studie byla provedena pouze u *L. panamensis*.

Vývoj leishmanií v trávicím traktu přenašeče je ovlivněn řadou endogenních a exogenních faktorů. Jedním z exogenních je také teplota. Pionýrské práce zkoumající vliv teploty na vývoj leishmanií v přenašeči se zabývaly pouze podrodem *Leishmania*. U podrodu *Viannia* obdobné práce neexistují. Přitom se však některé blízké příbuzné druhy tohoto podrodu vyskytují ve velmi odlišných biotopech; *Leishmania braziliensis* v zóně tropických deštných lesů a v nížinách, zatímco *L. peruviana* v horských údolích And.

Již delší dobu je známo, že podrod *Leishmania* nemá funkční dráhu RNA interference (RNAi). RNA interference je v rámci eukaryot běžný proces, při němž dochází k postranskripčnímu umlčování genů pomocí malých molekul RNA. Teprve nedávno bylo zjištěno, že leishmanie podrodu *Viannia* si funkční dráhu RNAi ponechaly. Jaký má tato dráha pro leishmanie význam, nebylo ovšem doposud objasn timer.

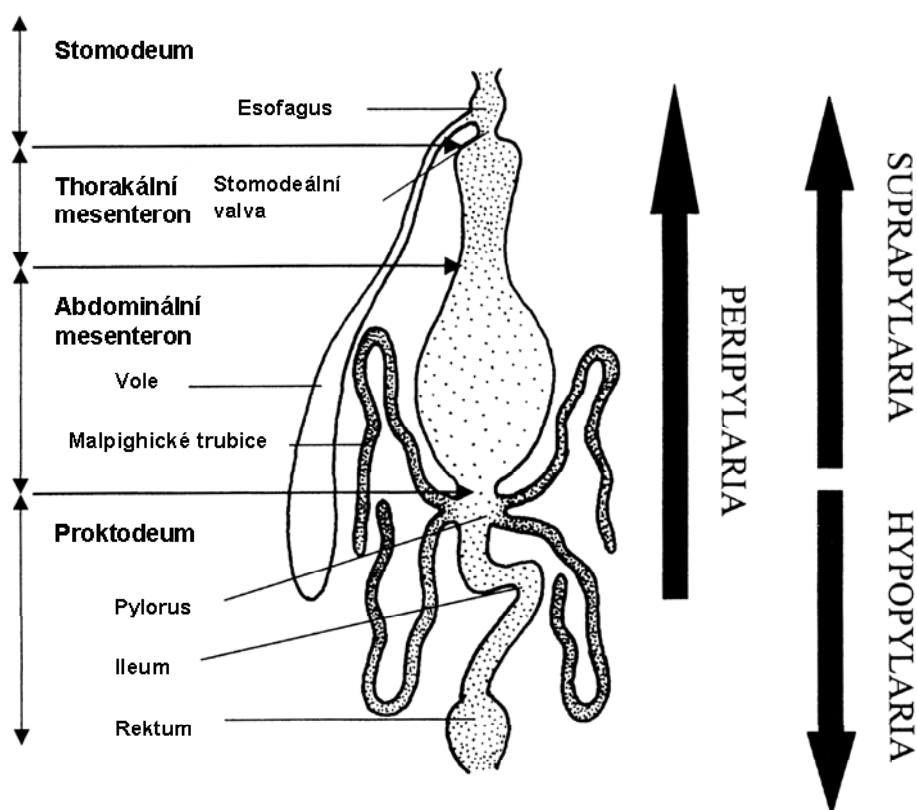
Cílem mé diplomové práce proto bylo:

1. Zjistit, zda se *L. braziliensis* vyvíjí a přichytává k mesenteronu *Lu. longipalpis*.
2. Určit jednotlivá vývojová stadia *L. braziliensis* vyskytující se v trávicím traktu přenašeče.
3. Zjistit, jaký vliv má teplota na vývoj *L. peruviana* a *L. braziliensis* v přenašeči.
4. Zjistit, zda vývoj *L. braziliensis* ve střevě přenašeče ovlivňuje RNA interference.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Postavení podrodu *Viannia* v rámci rodu *Leishmania*

Zástupce rodu *Leishmania* lze rozdělit podle způsobu jejich vývoje v trávicím traktu přenašeče do tří skupin: Hypopylaria, Peripylaria a Suprapylaria (shrnutí v Lainson a Shaw, 1987). Skupina Hypopylaria zahrnuje leishmanie plazů Starého Světa, které se vyvíjejí v zadní části střeva přenašeče. Přenos je zajištěn pravděpodobně pozřením flebotoma plazem. Leishmanie skupiny Peripylaria si ponechaly vývoj v zadním střevě, po němž následuje anteriorní migrace do mesenteronu a přední části trávicí trubice. Skupina Suprapylaria se vyvíjí v mesenteronu a přední části trávicí trubice flebotoma (obr. 1). U skupin Peripylaria a Suprapylaria je přenos na obratlovčího hostitele zajištěn sáním infikovaného flebotoma (shrnutí v Lainson a Shaw, 1987).



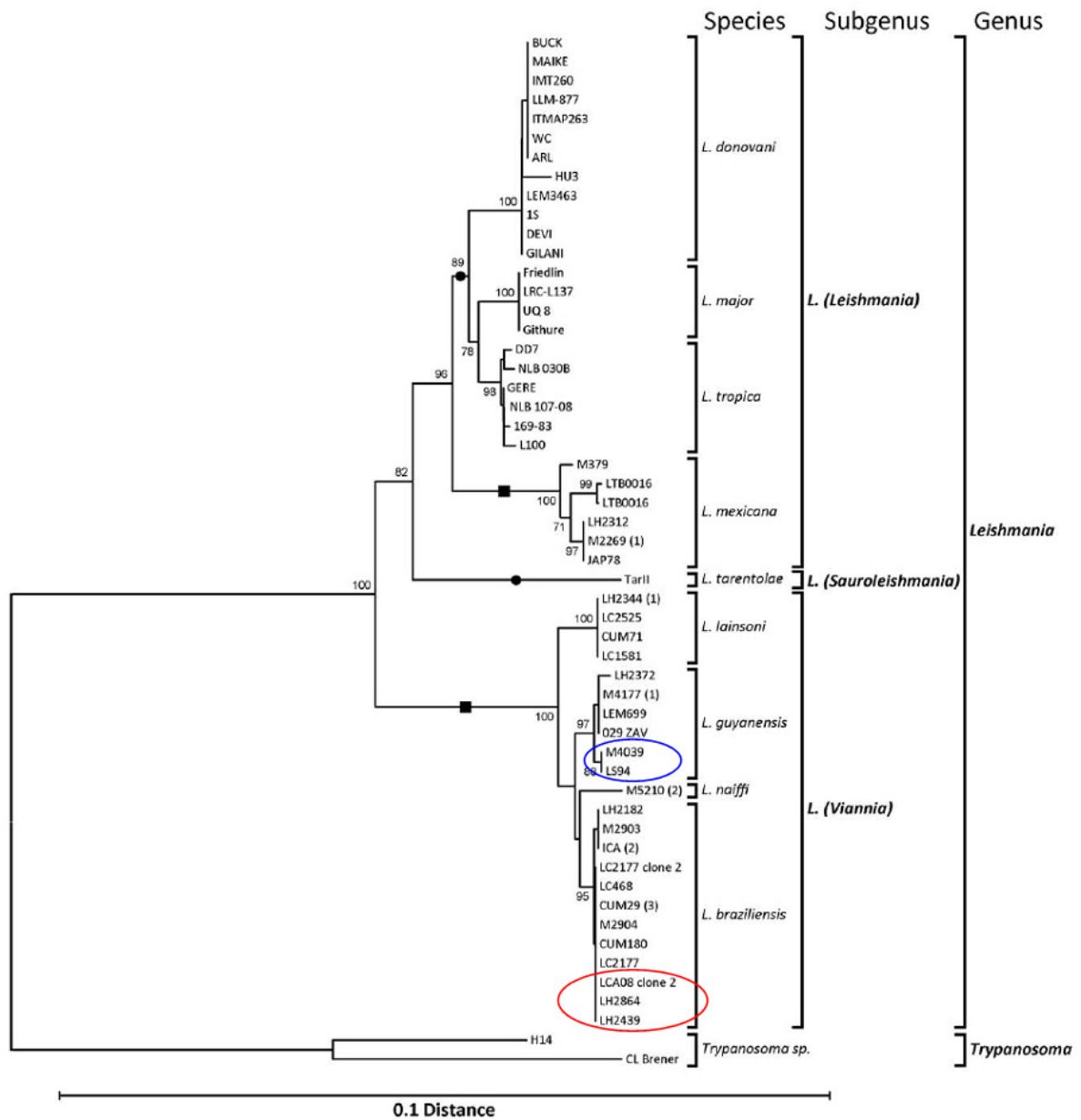
Obr. 1: Schématické znázornění suprapylárního, peripylárního a hypopylárního vývoje (převzato ze Sádlová, 1999, upraveno).

Podle charakteru vývoje leishmanií v přenašeči a jejich geografické distribuce se rod *Leishmania* tradičně dělí na tři podrody: *Sauroleishmania*, *Leishmania* a *Viannia* (Lainson a Shaw, 1987). Zástupci podrodu *Sauroleishmania* jsou leishmanie plazů vyskytující se ve Starém Světě. Do podrodu *Leishmania* patří leishmanie se suprapylárním vývojem v přenašeči, jejichž zástupce lze najít ve Starém i Novém Světě. Pro leishmanie podrodu *Viannia* je typický peripylární vývoj a výskyt především v tropech a subtropích Nového Světa (Lainson a Shaw, 1987). Druhy patřící do podrodu *Viannia*, jejich přenašeči a projev onemocnění jsou uvedeni v tabulce 1. Jako zástupci podrodu *Viannia* byly pro tuto práci vybrány *L. peruviana* a *L. braziliensis*. *Leishmania peruviana* je demograficky omezený druh vyskytující se v horských údolích pohoří And v Peru a pravděpodobně i dalších andských státech. Je původcem onemocnění zvaného Uta, jež se zpravidla projevuje jako jednoduchá ulcerující kožní léze. Přenašeči *L. peruviana* jsou *Lutzomyia peruensis* a *Lu. verrucarum*, jejím rezervoárem jsou psi a lidé (shrnutí v Lainson a Shaw, 2010). *Leishmania braziliensis* se původně vyskytovala především v nížinách a deštných lesích v Amazonii, ale díky odlesňování se s ní dnes můžeme setkat i v blízkosti lidských sídel. Jako rezervoároví hostitelé slouží lesní hlodavci, vačnatci a domácí zvířata. Vzhledem k širokému rozšíření má řadu vektorů, například *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. migonei* či *Lu. wellcomei*. *Leishmania braziliensis* je původcem kožní leishmaniózy tvořící většinou jednu či více kožních lézí, u některých pacientů dochází k mukokutánním projevům onemocnění (shrnutí v Lainson a Shaw, 2010).

Tradiční klasifikace leishmanií podle Lainson a Shaw (1987) se v podstatě shoduje s fylogenetickými analýzami rodu *Leishmania* (Croan et al., 1997; Waki et al., 2007; Asato et al., 2009; Fraga et al., 2010). Fraga et al. (2010) sestavili fylogenetický strom založený na analýze sekvencí genu pro heat- shock protein 70 (viz obr. 2). Všechny tři podrody tvoří monofyletické linie, přičemž podrody *Leishmania* a *Sauroleishmania* se společně oddělují od podrodu *Viannia*. Jako zástupce podrodu *Viannia* autoři vybrali *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* a *L. naiffi*. *Leishmania peruviana* se větví uvnitř komplexu *L. braziliensis*, *L. panamensis* je součástí komplexu *L. guyanensis* (Fraga et al., 2010).

Tab. 1: Přehled zástupců podrodu *Viannia*, jejich vektora, rezervoáru a projevu onemocnění (podle Lainson, 2010).

Druh	Vektor	Rezervoár	Projev onemocnění
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lutzomyia intermedia</i> <i>Lutzomyia whitmani</i> <i>Lutzomyia wellcomei</i> <i>Lutzomyia migonei</i> <i>Lutzomyia neivae</i> <i>Lutzomyia davisi</i>	široké spektrum terestrických hlodavců (Rodentia) vačnatců (Marsupialia), domácí zvířata (koně, kočky, psi)	kutánní mukokutánní
<i>L. peruviana</i>	<i>Lutzomyia peruensis</i> <i>Lutzomyia verrucarum</i>	psi a lidé	kutánní
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lutzomyia umbratilis</i> <i>Lutzomyia anduzei</i>	<i>Choloepus didactylus</i> (lenochod dvouprstý), <i>Tamandua tetradactyla</i> (mravenčák čtyřprstý), hlodavci (Rodentia), vačnatci (Marsupialia)	kutánní zřídka mukokutánní
<i>L. panamensis</i>	<i>Lutzomyia trapidoi</i> <i>Lutzomyia ylephiletor</i> <i>Lutzomyia gomezi</i> <i>Lutzomyia panamensis</i>	lenochodi (Bradypodidae, Megalonychidae), medvídkovití (Procyonidae), opice (<i>Aotus trivirgatus</i> , <i>Saguinus geoffroyi</i>), <i>Heteromys sp.</i> , psi	kutánní zřídka mukokutánní
<i>L. lainsoni</i>	<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	paka nížinná (<i>Agouti paca</i>) a lidé	kutánní
<i>L. naiiffi</i>	<i>Lutzomyia ayrozai</i> <i>Lutzomyia paraensis</i> <i>Lutzomyia squamiventris</i>	pásovec devítipásý (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	kutánní
<i>L. shawi</i>	<i>Lutzomyia whitmani (sensu lato)</i>	malpovití (Cebidae), lenochod dvouprstý (<i>Choloepus didactylus</i>) a lenochod tříprstý (<i>Bradypus tridactylus</i>), nosál červený (<i>Nasua nasua</i>) a lidé	kutánní
<i>L. colombiensis</i>	<i>Lutzomyia gomezi</i> <i>Lutzomyia panamensis</i> <i>Lutzomyia hartmanni</i>	lenochod krátkokrký (<i>Choloepus hoffmanni</i>), lidé	kutánní
<i>L. equatorensis</i>	<i>Lutzomyia hartmanni</i>	lenochod krátkokrký (<i>Choloepus hoffmanni</i>), veverka měnivá (<i>Sciurus granatensis</i>)	nezaznamenán
<i>L. lindenbergi</i>	předpokládaný vektor: <i>Lutzomyia antunesi</i> <i>Lutzomyia lindenbergi</i>	lidé	kutánní
<i>L. utingensis</i>	<i>Lutzomyia tuberculata</i>	neznámý	nezaznamenán



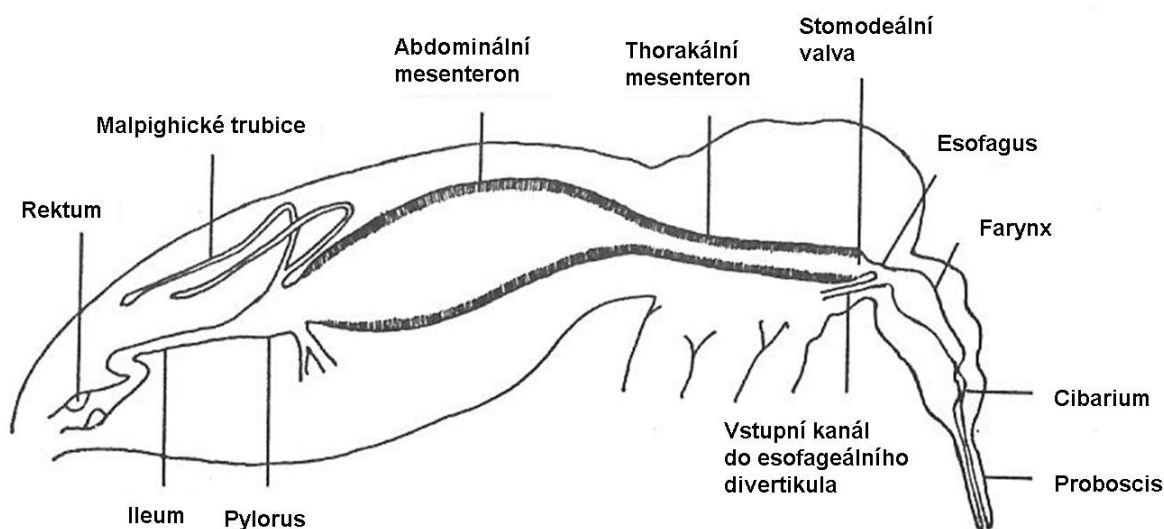
Obr. 2: Fylogenetický strom sekvencí genu pro hsp70 vytvořený metodou neighbor-Joining (Fraga et al., 2010). Červeně zakroužkována *L. peruviana*, modře zakroužkována *L. panamensis*.

2.2 Vývoj podrodu *Viannia* v přenašeči

2.2.1 Trávicí trakt flebotomů

Vývoj leishmanií v přenašeči se odehrává v různých částech trávicího traktu. Pro snadnější orientaci v dalším textu zde proto uvádím jeho základní anatomii. Trávicí ústrojí flebotomů je složeno ze tří částí: z chitinem vystlaného stomodea (přední střevo) a proctodea (zadní střevo), a z mesenteronu pokrytého epitelem s mikrovilli. Stomodeum se dále dělí na proboscis (sosák), cibarium (ústní dutina), farynx (hltan), esofagus (jícen) a esofageální divertikulum (vole). V rámci mesenteronu můžeme rozlišit úzkou thorakální část (oddělenou od stomodea osvaleným svěračem pokrytým chitinem, tzv. stomodeální valvou) a širokou abdominální část (oddělenou od proctodea pylorickou valvou). Proktodeum se skládá z pyloru, do něhož ústí malpighické trubice, dále z ilea, rektální ampule a rekta (shrnuje ve Walters et al., 1987; Warburg, 2008), viz obr. 3.

Součástí trávicího traktu je peritrofická matrix syntetizovaná epiteliálními buňkami mesenteronu po nasátí krve. Jedná se o membranózní, acelulární, semipermeabilní strukturu složenou z proteinů, glykoproteinů a chitinu. Její syntézou okolo přijaté krve je mesenteron rozdělen na ekto- a endoperitrofický prostor. Funkcí peritrofické matrix je ochrana buněk epitelu mesenteronu proti mechanickému a chemickému poškození či proti ataku patogenů (Lehane, 1997).



Obr. 3: Schéma trávicího traktu flebotoma (podle Killick-Kendrick, 1979, upraveno).

2.2.2 Vývoj podrodu *Viannia* v přenašeči

Pro podrod *Viannia* je charakteristický peripylární vývoj (Lainson a Shaw, 1987). První až druhý den po sání jsou v peritrofické matrix obklopující přijatou krev přítomni amastigoti a promastigotní stádia, která se mohou dělit. Třetí až pátý den (po desintegraci peritrofické matrix) se začínají v oblasti pyloru, ilea, popř. rekta objevovat přichycené haptomonády a paramastigoti. Kolonizace oblasti zadního střeva přetrvává v různé míře po celou dobu infekce. Čtvrtý až šestý den byl zaznamenán výskyt promastigotů v mesenteronu, následovaný ve většině případů anteriorní migrací a kolonizací stomodeální valvy (Hertig a McConnell, 1963; Johnson a Hertig 1970; Killick-Kendrick et al., 1977a.; Killick-Kendrick et al., 1977b; Lainson et al., 1977; Lainson et al., 1979 ; Walters et al., 1989; Rangel et al., 1992, Rangel et al., 1993; Walters 1993; Jaramillo et al.,1994; Nieves a Pimenta, 2000; Barbosa et al., 2006).

Většina výše uvedených studií popisujících vývoj podrodu *Viannia* v přenašeči byla postavena na pozorování infikovaných střev flebotomů pod světelným mikroskopem, ve kterém lze jen těžko rozlišit formy jednotlivých promastigotů. Podrobné rozlišení jednotlivých vývojových stadií lze najít ve člancích Johnson a Hertig (1970), Walters et al.(1989), Walters (1993), Gontijo et al. (1995) a Nieves a Pimenta (2000). Johnson a Hertig (1970) popisují morfologii buněk *L. braziliensis* v *Lu. sanguinaria* a *Lu. gomezi*. Neuvádí však jejich rozměry ani názvy. Walters et al. (1989) se zabývají vývojem *L. panamensis* v přirozeném přenašeči *Lu. gomezi*. Ve článku Walters (1993) najdeme porovnání vývoje *L. panamensis* v *Lu. gomezi* a *Phlebotomus papatasi* (parazit v něm není schopen tvořit infekční stádia). Nieves a Pimenta (2000) charakterizovali vývoj a jednotlivá stádia *L. braziliensis* v *Lu. migonei* podle morfologických forem dříve popsanych u podrodu *Leishmania*. Morfologické formy *L. braziliensis* vyskytující se ve střevě *Lu. longipalpis* popsali také Gontijo et al. (1995). V tabulce 2 je uveden seznam autorů experimentálních nálezů provedených s leishmaniemi podrodu *Viannia*, včetně použitých druhů flebotomů a leishmanií.

Při popisu jednotlivých forem leishmanií vycházím především ze studie Walters et al. (1989), kterou doplňuji poznatky z Walters (1993). Všechna volně plovoucí stadia autoři označovali jako nektomonády, všechna přisedlá stadia jako haptomonády. Některá stadia jsou schopná během svého cyklu tvořit jak přisedlé formy, tak formy volně plovoucí. Walters et al. (1989) popsali osm vývojových forem (viz tab. 3, obr. 4). Amastigoti se v natrávené krvi transformují na zavalité procyklické promastigoty. Ti se rychle dělí a mění se na vřetenovité a dlouhé nektomonády, které primárně migrují do zadního střeva ale také anteriorně.

Tab. 2: Vývoj podrodu *Viannia* v přenašeči, seznam autorů experimentálních infekcí včetně použitého druhu leishmanie a vektora.

Autor (rok publikace)	Druh leishmanie	Vektor
Hertig a McConnell (1963)	<i>L. braziliensis</i> (sensu lato)	<i>Lu. sanguinarius</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i>
Johnson a Hertig (1970)	<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. sanguinaria</i> , <i>Lu. gomezi</i>
Killick-Kendrick et al. (1977b)	<i>L. braziliensis</i> (M1287; M1670)	<i>Lu. longipalpis</i>
Lainson et al. (1977)	<i>L. braziliensis</i> (M1563) <i>L. guyanensis</i> (H.13) <i>L. guyanensis</i> (M4146) <i>L. panamensis</i> (D.H.56C P1)	<i>Lu. longipalpis</i>
Lainson et al. (1979)	<i>L. peruviana</i> (SL-3) <i>L. peruviana</i> (SL-5) <i>L. peruviana</i> (D-8)	<i>Lu. longipalpis</i>
Walters et al. (1989)	<i>L. panamensis</i> (MHOM/CO/82/CL064)	<i>Lu. gomezi</i>
Walters et al. (1992)	<i>L. panamensis</i> (MHOM/CO/82/CL064)	<i>P. papatasi</i>
Rangel et al. (1992)	<i>L. braziliensis</i> (MCAN/BR/87/DOG4) (MHOM/BR/86/HAS3)	<i>Lu. intermedia</i>
Rangel et al. (1993)	<i>L. braziliensis</i> (HOM/COL/86/1257) <i>L. panamensis</i> (HOM/COL/81/13) <i>L. guyanensis</i> (HOM/COL/84/1096)	<i>Lu. intermedia</i>
Walters (1993)	<i>L. panamensis</i> (MHOM/CO/82/CL064)	<i>Lu. gomezi</i> , <i>P. papatasi</i>
Jaramillo et al. (1994)	<i>L. braziliensis</i> (HOM/COL/87/1225) <i>L. panamensis</i> (HOM/COL/84/1099)	<i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. hartmanni</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>
Gontijo et al. (1995)	<i>L. braziliensis</i> (MCAN/BR/73/BH348)	<i>Lu. longipalpis</i>
Nieves a Pimenta (2000)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>Lu. migonei</i>
Nieves a Pimenta, (2002)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>Lu. migonei</i>
Barbosa et al. (2006)	<i>L. guyanensis</i> (MHOM/BR/95/IM4216) (MHOM/BR/75/M4147)	<i>Lu. longipalpis</i>

V zadním střevě se tyto nektomonády přichytávají kutikulární výstelky pomocí hemidesmosomů a dávají vznik větvenitým a hruškovitým haptomonádám. Stadia přítomná v zadním střevě se téměř nedělila, a proto se autoři domnívají, že zadní střevo slouží především jako místo přichycení při defekaci a jako rezervoár infekce. Walters (1993) navíc v pyloru zaznamenal výskyt dlouhých haptomonád. V lumen kardie (oblast thorakálního mesenteronu u stomodeální valvy) byli krátkí, dělicí se promastigoti A a z nich vznikající krátkí promastigoti s dlouhým bičíkem B (metacykličtí promastigoti). Obě stadia autoři považují za infekční pro obratlovčího hostitele. Dále se v kardii vyskytovali kulatí či

hruškovití paramastigoti (s kinetoplastem a jádrem vedle sebe) volní či přichycení hemidesmosomy (tyto formy pozorovány zřídka i v proktodeu). Walters (1993) v kardii pozoroval navíc dlouhé nektomonády. Ke stomodeální valvě byly hemidesmosomy přichycené hruškovité a kulaté haptomonády. Stadia přítomná v lumen kardiie byla obklopená gelovitou elektrodenní matrix. Tato hmota, jejíž hlavní složkou je u podrodu *Leishmania* filamentózní proteofosfoglykan (fPPG), byla později pojmenována jako promastigote secretory gel (PSG) (Stierhof et al., 1999). Předpokládá se, že ucpání proktodea pomocí PSG (Rogers et al., 2002; Volf et al., 2004) společně s poškozením stomodeální valvy chinolytickou aktivitou leishmanií (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008) napomáhá přenosu infekčních stadií do obratlovčího hostitele. V esofagu a farynxu byli hemidesmosomy přichyceni kulatí a hruškovití paramastigoti, kteří byli schopni dělení (Walters et al., 1989) a hruškovité haptomonády (Walters, 1993). Dále se v oblasti farynxu a esofagu vyskytovaly krátké nektomonády, metacykličtí promastigoti a volně plovoucí paramastigoti (Walters, 1993).

Walters et al. (1992) a Walters (1993) poukázali na to, že *L. panamensis* v trávicím traktu nepřirozeného vektora musí překonat několik bariér, které zásadním způsobem ovlivňují její vývoj. Jako nepřirozený vektor byl vybrán *Phlebotomus papatasi*. První bariérou se ukázala být peritrofická matrix, z níž část parazitů nebyla schopna uniknout. Krátké a dlouhé nektomonády i paramastigoti se sice vyvíjeli uvnitř prostoru obklopeného peritrofickou matrix, ale pátý den po infekčním sání, to jest po defekaci, mělo pouze 31 % flebotomů kolonizované zadní střevo, v němž byly přichyceny hruškovité a krátké haptomonády a paramastigoti. Anteriorní migrace do oblasti stomodeální valvy byla pozorována u méně než 1 % flebotomů a přední část trávicí soustavy nebyla kolonizována. Metacykličtí promastigoti, stadium klíčové pro přenos do definitivního hostitele, nebyli detekováni. Absence metacyklických stadií společně s bariérou tvořenou peritrofickou matrix a vzácná anteriorní migrace vedly autory k závěru, že přenos *L. panamensis* při sání *P. papatasi* není možný (Walters et al., 1992). Na tomto místě je ovšem důležité poznamenat, že *P. papatasi* byl později popsán jako tzv. specifický vektor podporující vývoj pouze *L. major* (Pimenta et al., 1994, Volf a Myskova, 2007, více viz kapitola 2.3).

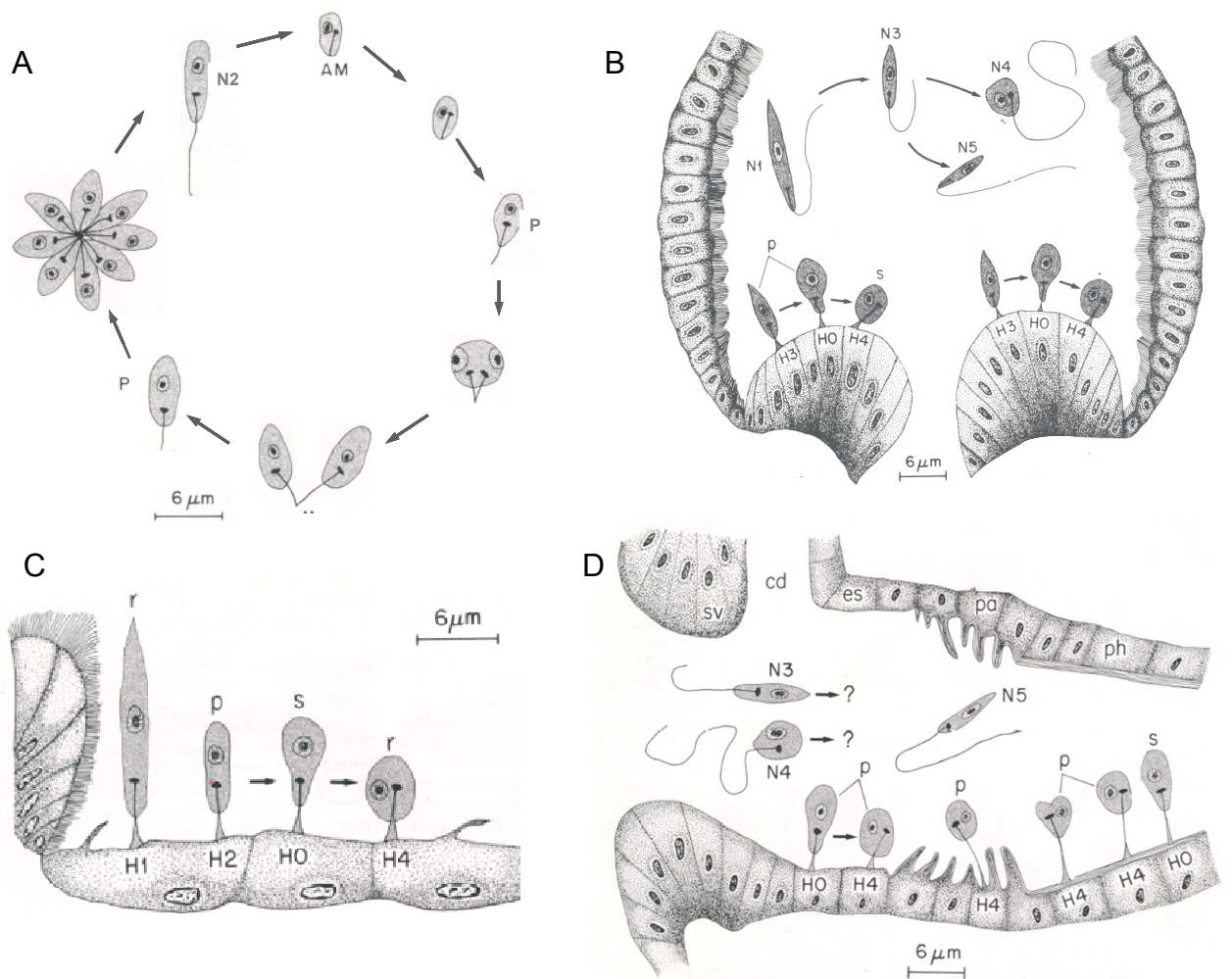
Schopnost vývoje *L. panamensis* a *L. braziliensis* v různých vektorech za experimentálních podmínek zjišťovali také Jaramillo et al. (1994). *Leishmania panamensis* se vyvíjela dobře v *Lu. trapidoi* a v *Lu. gomezi*. V *Lu. panamensis* byli promastigoti v krvi a v pyloru, v *Lu. hartmani* se *L. panamensis* nevyvíjela. *Leishmania braziliensis* se také vyvíjela dobře v *Lu. trapidoi* a v *Lu. gomezi*, v *Lu. hartmani* byl třetí až pátý den kolonizován

pylorus a mesenteron, v *Lu. panamensis* se *L. braziliensis* nevyvíjela (Jaramillo et al., 1994). Problémem pro interpretaci této práce je nízký počet vypitvaných samic *Lu. hartmani* s *L. braziliensis* (8 samic), *Lu. panamensis* s *L. panamensis* (4 samice) a s *L. braziliensis* (3 samice). Především neschopnost vývoje *L. braziliensis* v *Lu. panamensis* není z této práce průkazná.

Jednou z hlavních povrchových molekul leishmanií, která pokrývá celý povrch buňky promastigotů včetně bičíku je lipofosfoglykan. Tato molekula může značně ovlivnit vývoj leishmanií uvnitř trávicího traktu přenašeče, a proto jí věnuji následující samostatnou kapitolu.

Tab. 3: Morfologické formy *L. panamensis* v trávicím traktu *Lu. gomezi* (dle Walters et al., 1989, upraveno). * Místo kolonizace a/nebo vývoje: ES = esofagus, FA = farynx, KA = kardie, PS = přední střevo, SV = stomodeální valva ZS = zadní střevo.

Morfologická forma	Lokalizace ve střevě*	Délka buňky (μm)	Délka bičíku/ délka buňky	Šířka buňky (μm)
Amastigot	krev	3,7 – 4,5	–	1,5 – 2,3
Zavalitý promastigot	krev	5,2 – 6,5	<1	2,4 – 4,1
Vřetenovitá nektomonáda	ZS, PS	5,2 – 8,3	≈1	1,9 – 2,5
Dlouhá nektomonáda	ZS, PS	12,9 – 19,0	≈1	1,5 – 2,5
Krátký promastigot A	KA, ES, FA	6,1 – 11,3	1,4 – 1,6	0,9 – 1,7
Krátký promastigot B	KA, ES, FA	7,0 – 9,4	2,1 – 2,9	1,5 – 1,8
Hruškovitá haptomonáda	SV, ZS	5,6 – 8,4	–	2,0 – 3,9
Paramastigot	ZS, KA, SV, ES, FA	4,7 – 5,9	>3	2,0 – 4,8



Obr. 4: Schematické znázornění vývojových stadií *L. panamensis* v *Lu. gomezi* (podle Walters 1993, upraveno). A. Diferenciace a dělení v krvi 3–4 dny po infekčním sání, B. Thorakální mesenteron a stomodeální valva, C. Pylorus, D. Esofagus a farynx. AM = amastigot, P = procyklický promastigot, N1 = dlouhá nektomonáda, N2 = větvenitá nektomonáda, N3 = krátký promastigot, N4 = volný paramastigot, N5 = metacyklický promastigot, H0 = hruškovitá nektomonáda, H1 = dlouhá haptomonáda, H2 = větvenitá haptomonáda, H3 = krátká haptomonáda, H4 = přisedlý paramastigot, p = primární výskyt, s = sekundární výskyt, r = vzácný výskyt, cd = vstupní kanál do esofageálního divertikula, es = esofagus, ph = farynx, sv = stomodeální valva.

2.3 Lipofosfoglykan

Lipofosfoglykan (LPG) je složen ze čtyř základních domén: 1. fosfatidylinositolové kotvy, 2. fosfodisacharidové kostry z opakujících se jednotek -Gal-Man-PO₄-, 3. jádra (fosforylovaný hexasacharid spojující kotvu s kostrou), 4. oligosacharidové čepičky (Turco a Descoteaux, 1992). Fosfatidylinositolová kotva, jádro a fosfodisacharidová kostra jsou považovány za konzervované struktury (Turco a Descoteaux, 1992), zatímco čepička a cukerné substituce na galaktóze fosfodisacharidové kostry se vyznačují jak mezidruhovou (McConville et al., 1990; Ilg et al., 1992; McConville et al., 1995; Soares et al., 2002; Soares et al., 2005) tak vnitrodruhovou variabilitou (McConville et al., 1995; Mahoney et al., 1999; Soares et al., 2004; Svobodova et al., 2006; Coelho-Finamore, 2011), viz obr. 5.

Složení postranních řetězců LPG není po celou dobu vývoje leishmanií v přenašeči konstantní. Struktura promastigotního LPG se mění během vzniku metacyklických stadií (tzv. metacyklogeneze). Během tohoto procesu dochází k prodlužování fosfodisacharidové kostry a k poklesu, ztrátě či obměně původních cukerných substitucí (McConville et al., 1992; Sacks et al., 1995; Mahoney et al., 1999; Soares et al., 2002; Soares et al., 2005).

Většina prací zabývajících se strukturou lipofosfoglykanu byla provedena u podrodu *Leishmania*. Pionýrskou studii struktury LPG u podrodu *Viannia* udělali Muscus et al. (1997). Studovali složení LPG *L. braziliensis*, *L. panamensis* a *L. guyanensis* v růstové a stacionární fázi kultury promastigotů. Lipofosfoglykan v růstové fázi měl podobně jako LPG *L. donovani* velmi málo či žádné substituce. V porovnání s *L. donovani* ho však bylo na povrchu promastigotů asi desetkrát méně. Ve stacionární fázi měla molekula LPG větší velikost. Na tuto práci navázali Soares et al. (2005), kteří potvrdili strukturu LPG *L. braziliensis* v růstové fázi a objasnili složení LPG u metacyklických promastigotů ze stacionární fáze. Během metacyklogeneze promastigotů *L. braziliensis* dochází k prodlužování fosfodisacharidové kostry stejně jako u ostatních leishmanií. Navíc však vznikají postranní glukózové řetězce, což je v rámci leishmanií neobvyklé (viz obr. 5). U podrodu *Leishmania* je metacyklogeneze doprovázena substitucí či ztrátou terminálních sacharidů, např. u *L. major* je galaktóza substituována či skryta arabinózou (McConville et al., 1992), u *L. chagasi* se snižuje množství postranních glukózových substitucí (Soares et al., 2002) a indický kmen *L. donovani* glukózové substituce úplně ztrácí (Mahoney et al., 1999).

Lipofosfoglykan zastává v životním cyklu leishmanií řadu funkcí. V obratlovčím hostiteli brání buňku před lyzí komplementem a oxidativním stresem, reguluje expresi NO syntázy v makrofágu, zpomaluje maturaci fagolysozomu a inhibuje sekreci IL-12

makrofágem a tím zároveň i protektivní imunitní odpověď (shrnutí v Novozhilova a Bovin, 2010). V trávicím traktu přenašeče byl LPG považován za molekulu, která chrání promastigoty před hydrolytickými proteázami během počáteční fáze infekce (Schlein et al., 1990), a která umožňuje adhezi promastigotů k mesenteronu (čímž zamezuje vyloučení parazita během defekace) a následně jejich odpoutání během metacyklogeneze (Pimenta et al., 1992). Později se však ukázalo, že LPG se na ochraně promastigotů během počáteční fáze infekce nepodílí (Sacks et al., 2000; Svárovská et al., 2010), a že role LPG pro přichycení leishmanií k mesenteronu se uplatňuje pouze ve specifických přenašečích (Myskova et al., 2007; Svárovská et al., 2010).

Typickými specifickými vektory jsou *P. papatasi* podporující vývoj pouze *L. major* a *P. sergenti*, ve kterém je schopna dokončit vývoj jen *L. tropica*. Mezi nespécifické (permisivní) vektory patří například *P. argentipes*, *P. arabicus* či *Lu. longipalpis* (shrnutí ve Volf a Myskova, 2007). Zde se při přichycení pravděpodobně uplatňuje interakce glykoproteinů s N-acetylgalaktosaminem (GalNAc) přítomných na povrchu střeva a receptoru na povrchu leishmanií. Kandidáty pro tento receptor jsou proteiny vážící heparin (HBP) a povrchové lektiny leishmanií (Myskova et al., 2007).

Jakou roli v životním cyklu leishmanií podrodu *Viannia* hraje jejich vazba k mesenteronu vektora, popřípadě jakým mechanismem se tak děje, nebylo doposud zcela objasněno. Vazbu *L. braziliensis* k mesenteronu *Lu. sanguinaria* a *Lu. gomezi* pozorovali Johnson a Hertig (1970). *In vitro* studie poukázaly na schopnost vazby *L. panamensis* k mesenteronu *P. papatasi* (Warburg et al., 1989) a *L. braziliensis* k mesenteronu *P. papatasi* a *Lu. longipalpis* (Wilson et al., 2010). Pomocí jakých molekul tato interakce probíhá však autoři neuvádějí. Vazbu *L. braziliensis* ke střevnímu epitelu *Lu. whitmani* a *Lu. intermedia* *in vitro* pomocí LPG prokázali Soares et al. (2010). Autoři se domnívají, že za vazbu jsou zodpovědné glukózové podjednotky přítomné v čepičce procyklických promastigotů a na kostře metacyklických promastigotů. Na povrchu buňky *L. braziliensis* byl ovšem také identifikován protein vážící heparin (Azevedo-Pereira et al., 2007). Pomocí western blotu autoři prokázali vazbu biotinylovaného HBP-Lb na proteiny střeva *Lu. intermedia* a *Lu. whitmani*. Autoři předpokládají, že proteiny vážící heparin přítomné na povrchu *L. braziliensis* by mohly být novou třídou makromolekul účastnících se rozpoznávání střevního epitelu přenašeče.

2.4 Vliv teploty na trávení flebotomů a vývoj leishmanií v přenašeči

Teplota ovlivňuje rychlost životních cyklů u řady členovců, flebotomy nevyjímaje (Adler a Theodor, 1935; Kasap a Alten, 2005, Benkova a Volf, 2007). Benková a Volf (2007) zjišťovali, jakým způsobem teplota ovlivňuje metabolismus *Phlebotomus papatasi*. Defekace, tvorba a kladení vajec byly opožděny a trvaly delší dobu u samic chovaných ve 23 °C, ve srovnání se samicemi ve 28 °C. Defekace krví nasátých samic byla ve 23 °C o 12–36 hodin zpožděna oproti samicím ve 28 °C. V nižší teplotě tedy došlo k celkovému zpomalení metabolických procesů, včetně trávení krve samicemi flebotomů.

Vliv teploty na vývoj leishmanií ve střevě flebotomů za experimentálních podmínek popsali Leaney (1977), Rioux et al. (1985) a Añez et al. (1989). Leaney (1977) choval *Lutzomyia longipalpis* infikované *Leishmania mexicana* ve 22, 25 a 28 °C. Infekce byla pozorována u 30 % samic chovaných ve 28 °C, u 75 % samic chovaných ve 25 °C a u 70 % samic chovaných ve 22 °C. Autor se domnívá, že díky rychlejšímu trávení samic ve 28 °C nestihne před defekací uniknout z peritrofického prostoru dostatečné množství leishmanií. Ve všech testovaných teplotách byli pozorováni paraziti přichycení ke kardii.

Rioux et al. (1985) testovali vývoj *Leishmania infantum* v trávicím traktu *Phlebotomus ariasi* při teplotě 10, 15, 20 či 25 °C. Teploty 5 °C a 30 °C byly letální pro flebotomy i leishmanie. Autoři došli k závěru, že zvyšující se teplota zvyšuje celkový podíl infikovaných flebotomů, urychluje dělení promastigotů v mezenteronu a usnadňuje přichycování leishmanií ke stomodeální valvě. Jako optimální teplotu pro vývoj *L. infantum* stanovili 25 °C.

Añez et al. (1989) sledovali vývoj *L. amazonensis* v *Lu. youngi* při 22 °C, 25 °C a 28 °C. V každé teplotě byly samice rozděleny do tří skupin. V první skupině byly samice krmeny roztokem 30% sacharózy, ve druhé skupině roztokem 30% fruktózy a ve třetí skupině 30% roztokem maltózy. Ačkoliv je pro *L. amazonensis* typický suprapylární vývoj (Lainson a Shaw, 1987), autoři tuto leishmanii pozorovali při některých kombinacích cukr – teplota v pyloru, malpigických trubicích a zadním střevě. Při nižší teplotě a při podávání maltózy či fruktózy byla atypická lokalizace častější. Naopak v kombinaci sacharózy a teploty 25 °C a 28 °C nebyla neobvyklá lokalizace zaznamenána. Jaký podíl má na tomto výsledku teplota však autoři neuvádějí. Přiznávají však, že část výsledků může být ovlivněna tím, že *Lu. youngi* není přirozeným vektorem *L. amazonensis*.

Vliv teploty na vývoj *L. major* v *P. papatasi* diskutovali ve své práci také Benkova a Volf (2007). Domnívají se, že pomalejší trávení *P. papatasi* v nižší teplotě poskytuje *L. major* delší čas na ustanovení infekce v jeho mesenteronu.

2.5 RNA interference u leishmanií

RNA interference (RNAi) je v eukaryotické říši vysoce konzervovaný proces, při němž dochází k umlčování genů pomocí malých interferujících RNA. Jeho funkcí je například ochrana před viry a transposony, postranskripční degradace malých RNA molekul, umlčování genů pomocí formace heterochromatinu a metylace DNA či regulace vývoje mnohobuněčných organismů (shrnutí v Cerutti a Casas-Mollano, 2006).

Díky výskytu RNAi u různorodých organismů může tento děj probíhat několika mechanismy, ale v zásadě ho lze rozdělit do tří kroků (Siomi a Siomi, 2009). Nejprve je dvouvláknová dsRNA (syntetizovaná v buňce či do buňky) štípána enzymem DICER (ribonukleáza III = RNasaIII) za vzniku malé dvouvláknové RNA (siRNA). V dalším kroku jsou tyto malé dvouvláknové RNA rozvolněny a jedno vlákno (tzv. vedoucí) je vloženo do proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Ve třetím kroku RISC vyhledá a naváže cílovou RNA párující s jednovláknovou RNA, a poté ji štěpí proteinem Argonaut s endonukleázovou aktivitou (Siomi a Siomi, 2009).

RNA interference se dnes využívá k experimentální regulaci exprese genů, například při zjišťování jejich funkce (shrnutí v Hannon, 2002). RNAi může být v buňce aktivována mnoha způsoby, například vpravením dsRNA přímo do buňky, vložením vektoru syntetizujícího dsRNA (Hannon, 2002) či introdukcí krátkých vlásenkovitých siRNA (Yu et al., 2002).

V rámci leishmanií byla funkční dráha RNAi prokázána u zástupců podrodu *Viannia*: *L. braziliensis* (Peacock et al., 2007; Lye et al., 2010), *L. guyanensis* a *L. panamensis* (Lye et al., 2010). Naopak, RNAi chybí u zástupců podrodu *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani* (Robinson a Beverley, 2003), *L. infantum* (Peacock et al., 2007), *L. mexicana* (Lye et al., 2010) a u *L. (Sauroleishmania) tarantolae* (Lye et al., 2010). Ke ztrátě RNAi došlo pravděpodobně po oddělení podrodu *Viannia* od ostatních leishmanií (Lye et al., 2010). Z jakého důvodu si podrod *Viannia* ponechal RNAi není známo. Smith et al. (2007) a Peacock et al. (2007) spekulují o její roli v regulaci transposomů či v obraně proti RNA virům leishmanií (LRV).

Hypotézu funkce RNAi v obraně proti transposomům podporuje práce Shi et al. (2004), ve které mutanti *Trypanosoma brucei* nesyntetizující argonaut TbAGO1 hromadili v buňce transkripty transposomů. U mutovaných buněk nebyl pozorován žádný růstový defekt. Autoři se proto domnívají, že pro růst vektorových forem v laboratoři je proces RNAi postradatelný. Ortholog genu TbAGO1 byl nalezen také u *L. braziliensis* (Peacock et al.,

2007). Lye et al. (2010) funkci AGO1 v dráze RNAi *L. braziliensis* experimentálně ověřili. Pro porovnání efektivity RNAi autoři vytvořili konstrukt (LUC-SR), který zároveň exprimoval dvě mRNA, jednu pro luciferázu (LUC) a druhou pro RNA vlásenku luciferázy (LUC-StL). Po vnesení konstruktů do buňky *L. braziliensis* byla zaznamenána nízká aktivita luciferázy oproti buňkám exprimujícím pouze luciferázu. Do takto připravených buněk byl vložen konstrukt pro expresi RNA vlásenky pro AGO1, což vedlo ke stonásobnému zvýšení exprese luciferázy ve srovnání s buňkami nesoucími pouze konstrukt LUC-SR. To dokazuje značnou redukci účinnosti RNAi a tím potvrzuje účast AGO1 v dráze RNAi u *L. braziliensis*. Jaký dopad na buňku má výrazné snížení RNA interference na fenotyp leishmanií autoři neuvádějí.

Hypotéza, že si zástupci podrodu *Viannia* ponechali RNA interference kvůli obraně proti virům, je diskutabilní díky objevu přítomnosti LRV u *L. major*, jež mašinérii RNAi postrádá (Scheffter, 1995; Widmer a Dooley, 1995). Vliv přítomnosti LRV na sílu dráhy RNAi testovali Lye et al. (2010). Porovnávali intenzitu RNAi u kmenu *L. guyanensis* M4147 LRV+, *L. guyanensis* M4147 LRV- a *L. braziliensis* M2903 LRV-. Intenzita RNA interference byla vyhodnocena srovnáním RNAi u transfektantů exprimujících pouze luciferázu (normální exprese) s buňkami s konstruktem LUC-SR (snížená exprese luciferázy). Autoři zjistili, že intenzita RNAi je u *L. braziliensis* snížena třístokrát, zatímco u obou kmenů *L. guyanensis* jen třicetkrát. Domnívají se proto, že redukovaná RNAi u LRV+ *L. guyanensis* nesouvisí s přítomností viru.

Jak již bylo zmíněno výše, RNA interference se dá využít ke zjišťování funkce různých genů. U *L. braziliensis* byla pomocí RNAi zkoumána funkce paraflagelární tyče (PFR). Byli vytvořeni mutanti postrádající jedny z hlavních strukturních proteinů paraflagelární tyče PFR1 a/nebo PFR2. Tato mutace vedla k výrazné redukci struktury PFR a ke snížení motility buněk v kultuře (Lye et al., 2010). RNA interference ovšem není pro zjištění funkce některých genů *L. braziliensis* použitelná. Například syntéza mRNA α -tubulinu byla pomocí RNAi snížena pouze o 63 %. Ani pokusy efektivně snížit syntézu lipofosfoglykanu nebyly úspěšné (Lye et al., 2010).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Složení použitých roztoků

Trisový pufr

20 mM Tris (Sigma)

150 mM NaCl

dotitrovat pomocí HCL na pH 7,8

Fyziologický roztok

150 mM NaCl

Ředící roztok na leishmanie při počítání v Bürkerově komůrce

0,85% NaCl

1% formaldehyd

3.2 Použité druhy leishmanií a jejich kultivace

Na pokusy byly použity následující druhy leishmanií:

L. peruviana (MHOM/PE/90/HB86)

L. braziliensis (MHOM/PE/91/LC2177)

L. braziliensis (MHOM/BR/75/M2903) – wild type (WT), c14 (KO), c16 (KO), c401 (AB),
c605 (AB)

L. braziliensis XD29

Všechny linie *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) jsou z laboratoře Steva Beverleyho, Washington University, School of Medicine. Mutantní linie c14 a c16 mají delecii genu pro protein Argonaut, linie c401 je add-back c14, linie c605 je add-back c16.

Kmen *L. braziliensis* XD29 je fluorescenčně značený pomocí GFP. Byl získán od Matthew Yeo, London School of Hygiene & Tropical Medicine.

Leishmanie byly kultivovány v plochých kultivačních zkumavkách v tekutých médiích (viz níže) při teplotě 23 °C. Linii *L. braziliensis* (M2903) WT bylo možné pěstovat i v mediu pro *L. peruviana* (HB86) a *L. braziliensis* (LC2177). Použité druhy leishmanií jsou uchovávány v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v mediu s 5–10 procenty kryoprezervační látky Dimethylsulfoxidu (Sigma-Aldrich). Před použitím byly buňky vymrazeny a přeočkovány do nového média.

Složení kultivačních medií:

Medium pro *L. peruviana* (HB86) a *L. braziliensis* (LC2177)

M199 (Aldrich, Sigma)

20% Fetal bovine serum (Sigma, Gibco)

2% sterilní moč

1% BME vitamíny (Sigma)

Gentamicin (Lek Pharmaceuticals d.d.): 50–10 µg/ml

Amikin (Bristol-Meyers Squibb): 250 µg/ml

Penicilin (Biotika): 5000 U/ml

Medium pro *L. braziliensis* M2903 WT, KO a AB

Nekompletní medium:

0,25% hemin (Sigma) v 50% triethanolaminu (Sigma): 0,125 ml

10 mM adenin (Sigma) v 50mM HEPES (Sigma): 6,25 ml

0,25 mg/ml biopterin (Sigma): 5 ml

Doplnit do 500 ml Schneider's insect medium (Sigma)

Dorovnat na pH 6,5

Kompletní medium pro linii WT:

Fetal bovine serum (Sigma, Gibco): 5 ml

Penicilin/Streptomycin (Sigma), finální koncentrace 50 U/ml a 50 µg/ml: 0,25 ml

Doplnit nekompletním mediumem do 50 ml

Kompletní medium pro linie KO:

Fetal bovine serum (Sigma, Gibco): 5 ml

Penicilin/Streptomycin (Sigma), finální koncentrace 50 U/ml a 50 µg/ml: 0,25 ml

Blasticidin (Sigma), finální koncentrace 5 µg/ml: 10 µl

Doplnit nekompletním mediumem do 50 ml

Kompletní medium pro linie AB:

Fetal bovine serum (Sigma, Gibco): 5 ml

Penicilin/Streptomycin (Sigma), finální koncentrace 50 U/ml a 50 µg/ml: 0,25 ml

Blasticidin (Sigma), finální koncentrace 5 µg/ml: 10 µl

Phleomycin (Sigma), finální koncentrace 0,1 µg/ml: 10 µl

Doplnit nekompletním mediumem do 50 ml

Medium pro *L. braziliensis* XD29

Medium pro *L. peruviana* (HB86) a *L. braziliensis* (LC2177) + Geneticin (Invitrogen):

15 µg/ml

3.3 Experimentální infekce

3.3.1 Příprava kůžiček

Mrtvé třídní kuřátko bylo zbaveno peří a poté byla sterilně stažena kůže ze zad a hrudi. Stažené kůžičky byly zbaveny tuku a propláchnuty 2krát po 10 minutách v etanolu a 2krát po 10 minutách ve sterilním fyziologickém roztoku. Připravené kůžičky byly uchovávány v -20 °C.

3.3.2 Infekční sání

Čtyři až šest dní stará kultura promastigotů leishmanií (exponenciální fáze růstu) byla dvakrát promyta ve sterilním fyziologickém roztoku. Pro zjištění koncentrace buněk bylo z promyté kultury odebráno 10 µl, smícháno s 990 µl ředícího roztoku a počet leishmanií stanoven v Bürkerově komůrce (P-lab). Kultura byla naředěna na koncentraci 10krát vyšší než byla požadovaná výsledná koncentrace leishmanií v krvi a poté smíchána s defibrinovanou a inaktivovanou (56 °C 35–40 min) králičí krví (Bioveta) v poměru 1:9 (300 µl kultury a 2700 µl krve). Sterilní skleněné krmítko s kuřecí kůžičkou připevněnou parafilmem bylo naplněno krví smíchanou s leishmaniemi. Krmítko bylo zahříváno na 37 °C vodní lázni s vnější cirkulací. Ke krmítku byla připevněna síťka se 4–7 dní starými samicemi *Lutzomyia longipalpis* (Brazílie). Samice sály dvě hodiny ve tmě. Poté byla síťka opatrně sundána a nenasáté samice byly vytríděny. Nasáté samice byly chovány v termostatu při teplotě 20 °C nebo 26 °C s neomezeným přístupem k cukru a při vlhkosti téměř 100 % (více o chovu flebotomů viz Volf a Volfova, 2011).

3.3.3 Pitvy střeva samic

Pitvy samic *Lutzomyia longipalpis* byly podle potřeb daného pokusu prováděny druhý až desátý den po infekčním sání. Samice uspané na ledu byly zbaveny končetin a poté byly přeneseny na podložní sklíčko do kapky trisového pufru či fyziologického roztoku a pitvány pitvacími drátky (minucie zasazená v dřevěné špejli) pod binokulární lupou. Nejprve byla oddělena hlava od zbytku těla. Střevo bylo vytaženo za poslední zadečkové články, přeneseno do nové kapky a prohlíženo pod světelným mikroskopem. Intenzita infekce byla stanovována do tří kategorií podle počtu promastigotů ve střevě: slabá (1–100 promastigotů), střední (100–1000 promastigotů) a silná infekce (více než 1000 promastigotů).

3.3.4 Schéma pokusů infekčního sání

1. Vliv teploty na vývoj *L. peruviana* (HB86) a *L. braziliensis* (LC2177) v *Lutzomyia longipalpis*

Samice *Lu. longipalpis* byly rozděleny do skupin po 100–150 samicích. Infekční dávka byla $5 \cdot 10^6$ leishmanií/1 ml krve. Nasáté samice byly chovány v termostatu, jedna skupina ve 20 °C a druhá skupina ve 26 °C. Pitvy byly provedeny 2.–3. a 8.–9. den po infekčním sání.

2. Porovnání vývoje *L. braziliensis* M2903 (WT) a jejích mutantů v *Lutzomyia longipalpis*

Samice *Lu. longipalpis* byly rozděleny do tří skupin po 100–150 samicích. Nasáté samice byly chovány ve 25–26 °C. Pitvy byly provedeny 3., 6. a 10. den po infekčním sání. U všech linií byly použity infekční dávky $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$ leishmanií/1 ml krve.

3. Porovnání vývoje *L. braziliensis* (M2903) a *L. braziliensis* (LC2177) v *Lu. longipalpis*

Samice *Lu. longipalpis* byly rozděleny do dvou skupin po 150 samicích. Infekční dávka byla $1 \cdot 10^6$ leishmanií/1 ml krve. Nasáté samice byly chovány ve 25–26 °C. Pitvy byly provedeny 3. a 7. den po infekčním sání.

Statistické vyhodnocení pokusů 1–3 bylo provedeno χ^2 testem pomocí programu S-Plus.

4. Vývoj *L. braziliensis* XD29 v *Lu. longipalpis*

Infekční dávka byla $1 \cdot 10^6$ leishmanií/1 ml krve. Nasáté samice byly chovány ve 25–26 °C. Pitvy byly provedeny 2., 4., 7. a 9. den po infekčním sání. Střeva byla prohlížena pod světelným mikroskopem s fluorescencí (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70). Buňky byly foceny pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus).

3.4 Porovnání růstu *L. peruviana* (HB86) a *L. braziliensis* (LC2177) v kultuře

Leishmanie byly přeočkovány z kultury v exponenciální fázi růstu (30 μ l kultury do 1970 μ l media) vždy od každého druhu do dvou zkumavek. Jedna zkumavka byla kultivována ve 20 °C, druhá ve 26 °C. V Bürkerově počítací komůrce (P-lab) byla spočítána koncentrace buněk ihned po přeočkování a poté každý den po šest dní. Z naměřených hodnot byla sestavena růstová křivka (program Microsoft Excel).

3.5 Morfologie leishmanií během vývoje v přenašeči

Pro přípravu preparátů byla použita střeva *Lutzomyia longipalpis* kolonizovaná *Leishmania braziliensis* (LC2177) pitvaná ve fyziologickém roztoku 3., 6., 8. a 9. den po infekčním sání. Vypitvaná střeva byla na podložním skle rozmáčkuta a opatrně rozetřena krycím sklíčkem. Po zaschnutí byly preparáty fixovány 5 minut metanolem, usušeny, barveny roztokem Giemsa-Romanovského (Giemsa stain (Fluka), ředěný 20krát) 25 minut a poté opláchnuty destilovanou vodou.

Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) při celkovém zvětšení 1000krát za použití imerzního oleje. Buňky byly foceny pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). Délka buňky, její šířka (v nejširší části) a délka bičíku byly měřeny v programu ImageJ (Java). Pro každou skupinu (den 3, 6 a 8–9) bylo náhodně vybráno sto měřených buněk. Získaná data byla vyhodnocena v programu SPSS.

Jednotlivé formy byly rozlišovány podle Walters et al. (1989), Čiháková a Volf (1997), Sádlová a Volf (2009) a Sádlová et al. (2010):

1. Procykliční promastigoti: délka bičíku < než délka těla, délka těla < 12,9 μm
2. Dlouhé nektomonády: délka těla \geq 12,9 μm
3. Krátké nektomonády: délka těla < 12,9 μm , poměr délky bičíku a délky těla < 2 a zároveň \geq délka těla
4. Metacykliční promastigoti: poměr délky bičíku a délky těla \geq 2, délka těla < 12,9 μm
5. Paramastigoti: kinetoplast leží laterálně u jádra

3.6 Kvantitativní PCR

Na izolaci DNA leishmanií byly použity samice flebotomů osmý den po infekčním sání uchovávané ve 100 μl Tissue lysis buffer (Roche) v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) podle protokolu od výrobce. Vyizolovaná DNA byla eluována do 100 μl elučního pufru (Roche) a skladována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Počet leishmanií ve flebotomech byl stanoven pomocí kvantifikace vyizolované DNA s využitím kvantitativní PCR (qPCR) založené na detekci vznikajícího dvouvláknového produktu (amplikonu) prostřednictvím metody SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na přístroji iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad). Byl amplifikován gen pro glukóza-6-fosfát dehydrogenázu (G6PD) s využitím primerů G6PD-LLF (5'→3': CTTGTTGCCTCCGGCTAC) a G6PD-LLR (5'→3':

GGCCATGTAAGCATCCTCAT) (Castilho et al., 2008). Výsledky byly vyhodnoceny Mann-Whitney U testem (program STATISTICA 6.1; StatSoft). Kvantitativní PCR byla provedena a statisticky vyhodnocena doc. RNDr. Janem Votýpkou, Ph.D.

3.7 Histologie a elektronová mikroskopie

Pro histologii a elektronovou mikroskopii byly použity samice *Lu. longipalpis* nakažené *L. braziliensis* LC2177 (infekční dávka: $5 \cdot 10^6$ leishmanií/1 ml krve) 6. den po infekčním sání. Samice zbavené končetin, hlavičky, větší části křídel a špičky zadečku byly fixovány 24 hodin při pokojové teplotě v modifikované karnovského fixáži (2,5% glutaraldehyd naředěný kakodylátovým pufrům s 10 % formaldehydu). Takto připravené vzorky byly odeslány do Laboratoře elektronové mikroskopie Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, kde byly dále zpracovány a zality do pryskyřice Epon-araldite.

Polosilné (1 μm) a ultratenké (70 nm) řezy byly připraveny na ultramikrotomu Reichert-Jung Ultracut E na pracovišti elektronové mikroskopie PřF UK. Polosilné řezy byly barveny na histologické plotýnce zahřáté na 60–65 °C 1–2 minuty roztokem 1% Toluidinové modři a poté byly opláchnuty destilovanou vodou. Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) a foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus).

Ultratenké řezy byly zpracovány pracovištěm elektronové mikroskopie PřF UK. Preparáty byly prohlíženy a foceny na transmisním elektronovém mikroskopu TEM JEOL 1011 s CCD kamerou Veleta na pracovišti elektronové mikroskopie na PřF UK v Praze.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vývoj *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis*

4.1.1 Vývoj kmene XD29

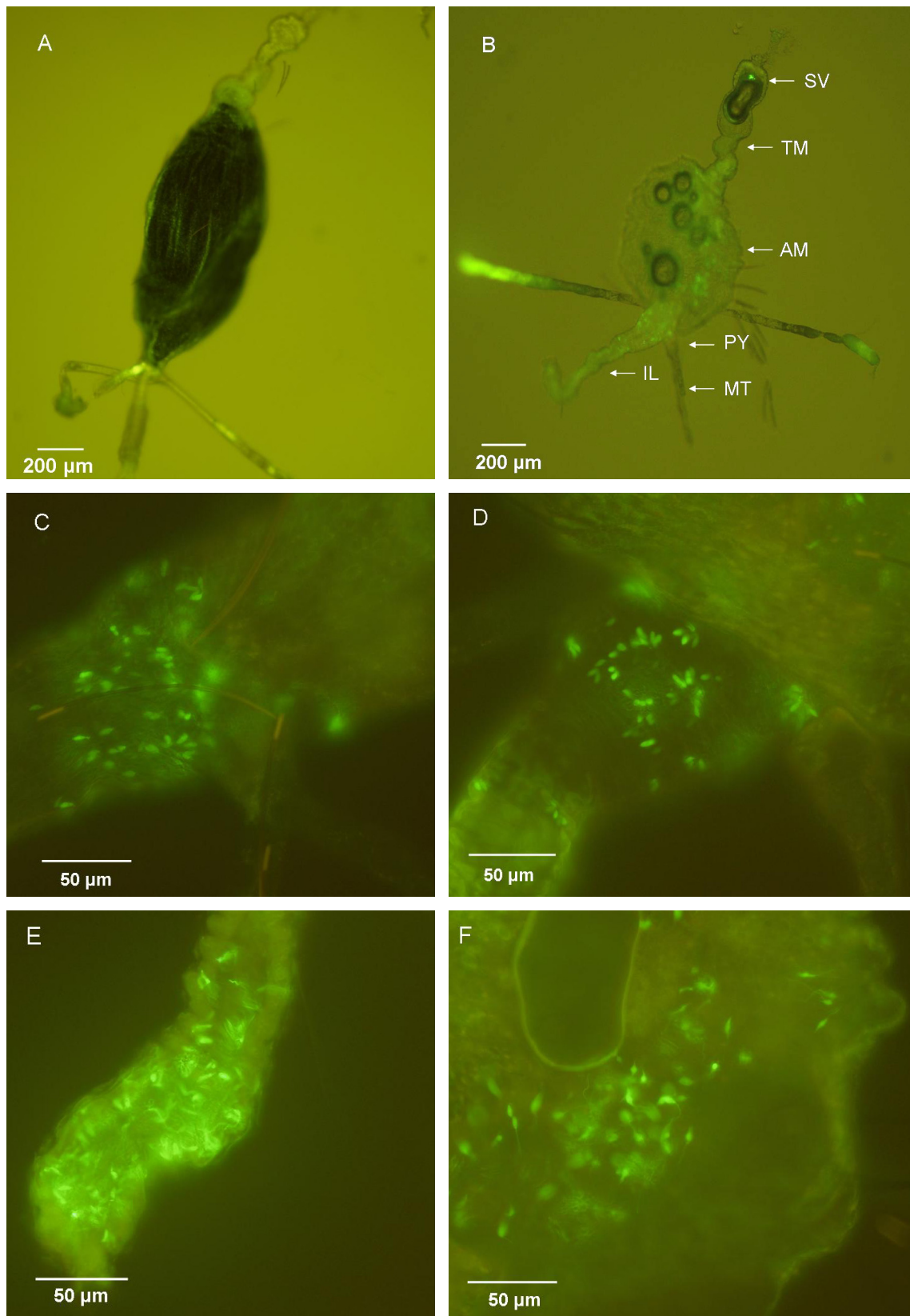
Vývoj GFP značené *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* byl sledován a 2., 4., 7. a 9. den po infekčním sání. Lokalizace leishmanií ve střevě je znázorněna na obr. 6.

Byl pozorován klasický peripylární vývoj. Druhý den byly leishmanie přítomné v krvi obklopené peritrofickou matrix (obr. 6 A). Čtvrtý den byli promastigoti lokalizováni v oblasti zadního střeva, především v ileu (obr. 6 E) a pyloru (obr. 6 C,D). Sedmý a devátý den se buňky vyskytovaly v oblasti zadního střeva a v mesenteronu (obr. 6 F). V několika případech byl zaznamenán výskyt v oblasti stomodeální valvy. Na stomodeální valvě promastigoti přichycení nebyli. Všechny dny pozorování byly infekce slabé. Přibližně polovina samic byla 9. den po infekčním sání negativní.

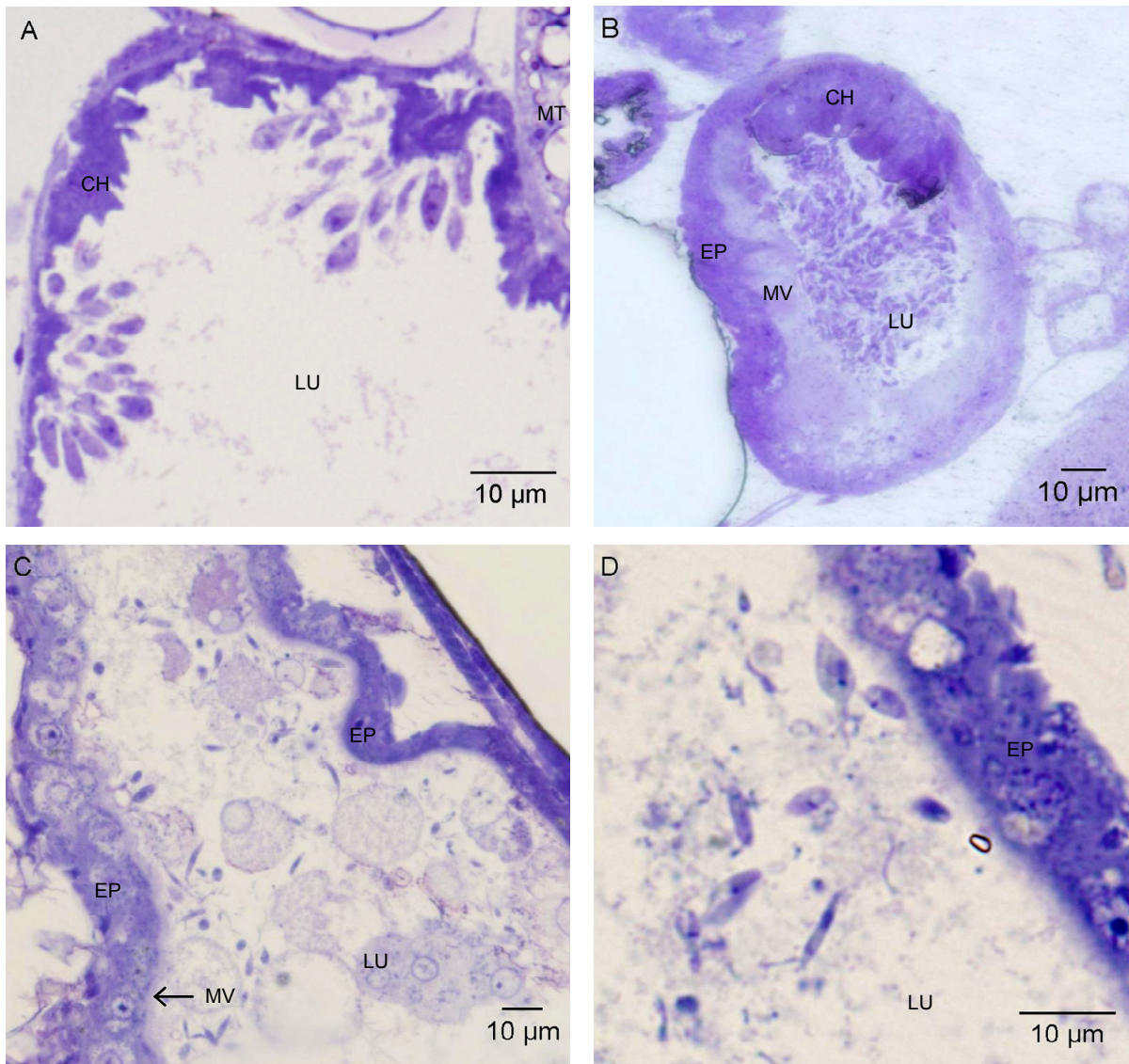
4.1.2 Histologie *Lu. longipalpis* nakažených kmenem LC2177

Samice *Lu. longipalpis* byly histologicky zpracovány šestý den po infekčním sání. Lokalizace promastigotů je zachycená na obr. 7.

V oblasti pyloru byli pozorováni promastigoti různých tvarů přichycení ke kutikulární výstelce (obr. 7 A). V lumen mesenteronu se vyskytovaly různé formy volných promastigotů (obr. 7 C, D). Leishmanie přichycené k epitelu mesenteronu nebyly pozorovány. Lumen stomodeální valvy bylo zcela vyplněno velkým množstvím promastigotů, ale ze snímku na optickém mikroskopu nelze rozpoznat, zda jsou někteří z nich přichycení či nikoliv (obr. 7 B).



Obr. 6: Vývoj *L. braziliensis* XD29 v *Lu. longipalpis*. A. Krev uzavřená v peritrofické matrix (zvětšení 40×), B. Promastigoti přítomní v oblasti pyloru, mesenteronu a stomodeální valvy (zvětšení 40×), C. a D. Promastigoti přichycení v pyloru (zvětšení 200×), E. Promastigoti v ileu (zvětšení 200×) F. Promastigoti lokalizovaní v abdominálním mesenteronu (zvětšení 200×).



Obr. 7: Histologie trávicího traktu *Lu. longipalpis* nakažené *L. braziliensis*. A. Promastigoti přichycení k chitinové výstelce pyloru (zvětšení 1000×), B. Promastigoti v lumen thorakálního mesenteronu na rozhraní se stomodeální valvou (zvětšení 400×), C. a D. Volní promastigoti v lumen abdominálního mesenteronu (zvětšení: C – 400×, D – 1000×). CH – chitinová výstelka, EP – epitel střeva, LU – lumen střeva, MT – malpighická trubice, MV – mikrovilli.

4.2 Morfologie *L. braziliensis* ze střeva *Lu. longipalpis*

Buňkám barveným na roztěrových preparátech střev *Lu. longipalpis* nakažených *L. braziliensis* (LC2177) byla změřena délka a šířka těla a délka bičíku. Podle morfologických znaků byly buňky přiřazeny k jednotlivým vývojovým stadiím. Byly rozlišeny čtyři základní formy:

1. dlouhé nektomonády (obr. 8 D vpravo)
2. krátké nektomonády (obr. 8 A, B, C)
3. paramastigoti (obr. 8 D vlevo)
4. metacykličtí promastigoti – široké i štíhlé formy (obr. 8 E, F)

Zastoupení jednotlivých forem třetí, šestý a osmý/devátý den po infekčním sání je uvedeno v tabulce 4. Počet dlouhých nektomonád v průběhu infekce klesal, naopak počet paramastigotů a metacyklických promastigotů rostl. Krátké nektomonády se vyskytovaly v nejvyšším počtu šestý den po infekci. Nejčastější formou byly krátké nektomonády. Procykličtí promastigoti nebyli detekováni.

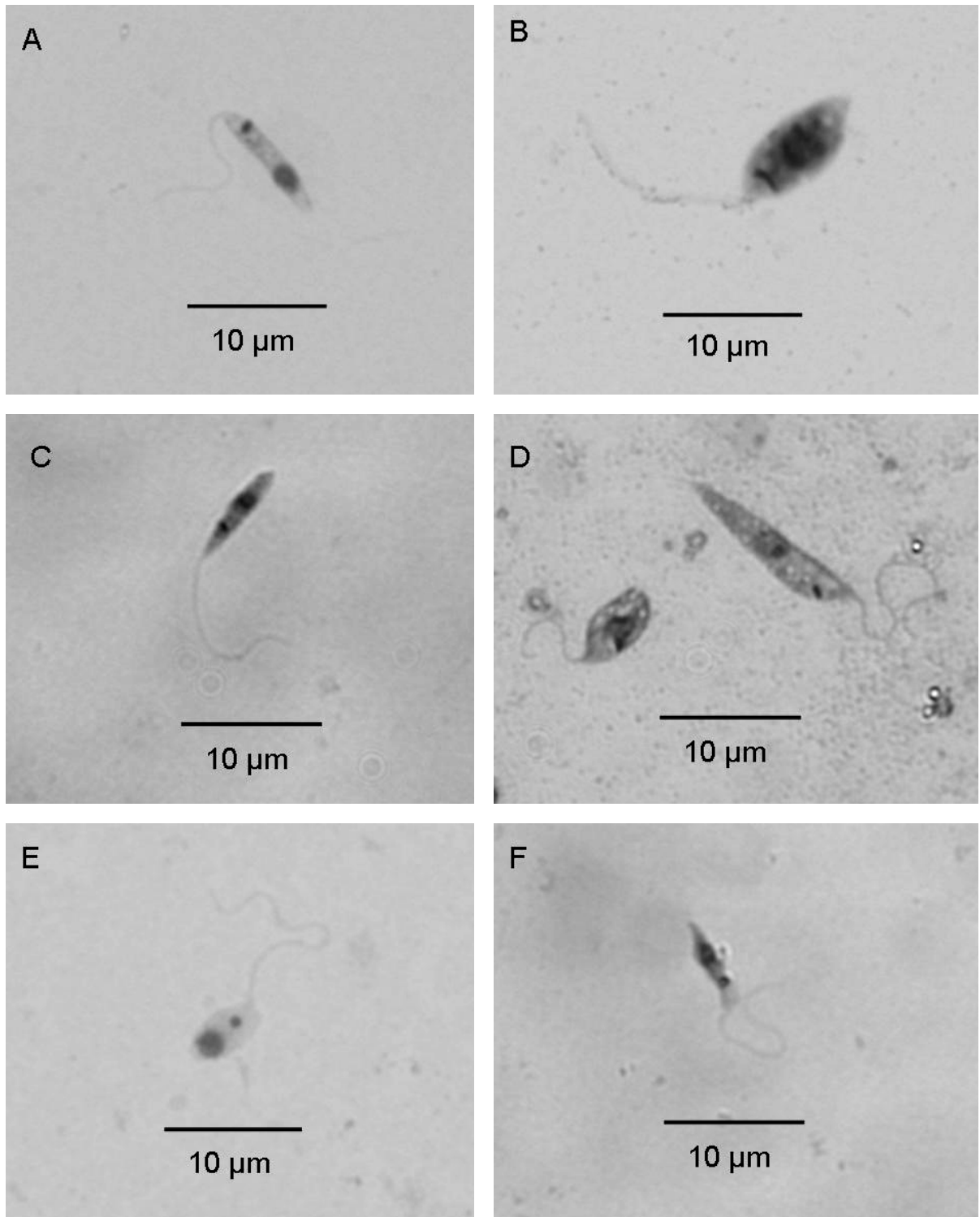
Krátké nektomonády byly morfologicky značně proměnlivé. Podle poměru délka bičíku/délka těla a podle šířky těla bylo možno rozlišit tři typy buněk:

- nektomonády s krátkým bičíkem (poměr délky bičíku a délky těla $< 1,4$), (obr. 8 A)
- tlusté nektomonády (poměr délky bičíku a délky těla $\geq 1,4$ a ≤ 2 , šířka těla $\geq 4 \mu\text{m}$), (obr.8 B)
- štíhlé nektomonády (poměr délky bičíku a délky těla $\geq 1,4$ a ≤ 2 , šířka těla $< 4 \mu\text{m}$), (obr.8 C)

Pro zjištění, zda se jedná o variabilitu v rámci jedné formy, nebo zda jde o různé morfologické formy by ale bylo potřeba změřit větší soubor buněk.

Tab. 4: Zastoupení jednotlivých morfologických forem *L. braziliensis* 3., 6. a 8. a 9. den po infekčním sání. Jednotlivé dny se mezi sebou signifikantně liší ($\chi^2 = 68,217$; $p = 0,0001$).

Den	Dlouhá nektomonáda	Krátká nektomonáda	Paramastigot	Metacyklický promastigot	celkem
3	50	48	1	1	100
6	11	71	2	16	100
8+9	16	51	4	29	100
Celkem	77	170	7	46	300



Obr. 8: Morfologické formy *L. braziliensis* (zvětšení 1000×). A. nektomonáda s krátkým bičíkem, B. tlustá nektomonáda, C. štíhlá nektomonáda, D. vpravo paramastigot, vlevo dlouhá nektomonáda, E. metacyklický promastigot: široká forma, F. metacyklický promastigot: štíhlá forma.

4.3 Vliv teploty na vývoj leishmanií podrodu *Viannia*

Vývoj *Leishmania peruviana* a *L. braziliensis* v přenašeči *Lu. longipalpis* byl zkoumán při teplotách 20 °C a 26 °C. Experimentální infekce byly provedeny několikrát (10krát pro *L. peruviana* a 11krát pro *L. braziliensis*), výsledky z jednotlivých opakování byly sloučeny a rozdíl mezi skupinami otestovány χ^2 testem. Hladina pravděpodobnosti byla stanovena 95% ($p = 0.05$). Počet leishmanií ve střevech flebotomů osmý den po infekčním sání byl stanoven také pomocí kvantitativní PCR a vyhodnocen Mann-Whitney U-testem.

Růst *L. peruviana* a *L. braziliensis* při 20 °C a 26 °C byl pro porovnání změřen také v kultuře. Z naměřených hodnot byla sestavena růstová křivka.

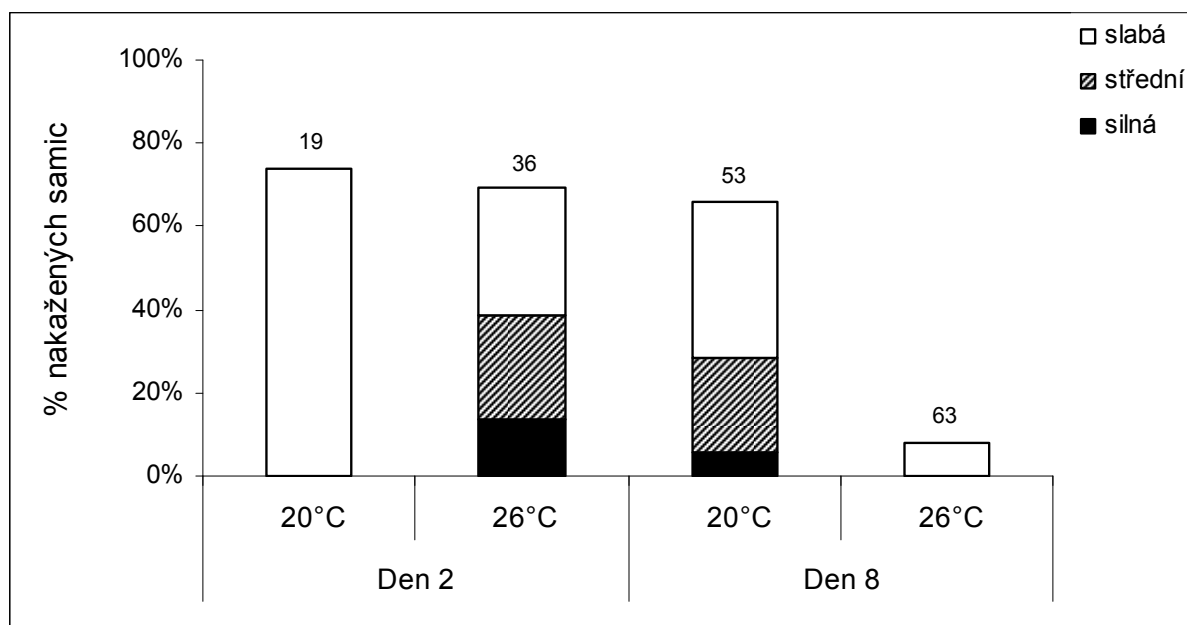
4.3.1 Vliv teploty na vývoj *L. peruviana* (HB86) v *Lu. longipalpis*

Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 5 a znázorněny na obrázku 9. Ve skupině chované ve 20 °C byl pozorován klasický peripylární vývoj. Druhý den byly leishmanie především v mesenteronu v natrávené krvi. Osmý den byly leishmanie lokalizovány v zadním střevě (především v pyloru), v abdominálním a thorakálním mesenteronu a na stomodeální valvě. U skupiny chované ve 26 °C byly leishmanie druhý den po infekčním sání rovněž přítomny v krvi v mesenteronu. Pátý den se leishmanie vyskytovaly v zadním střevě (pylorus), v mesenteronu a několik jedinců na stomodeální valvě. Osmý den byla v několika případech pozorována slabá infekce bez kolonizace valvy, ve většině samic leishmanie nebyly přítomny.

Druhý i osmý den byl zaznamenán signifikantní rozdíl v intenzitě infekce mezi skupinou chovanou ve 20 °C a 26 °C (2. den: $\chi^2 = 12,555$; $p = 0,0057$; 8. den: $\chi^2 = 44,521$; $p = 1,17 \cdot 10^{-9}$). Rozdíl v procentu infikovaných samic druhý den po infekci nebyl statisticky průkazný ($\chi^2 = 0,108$; $p = 0,742$), osmý den se skupiny signifikantně lišily ($\chi^2 = 43,01$; $p = 5,446 \cdot 10^{-11}$). Před defekací (2. den) se *L. peruviana* množila rychleji ve 26 °C. Naopak po defekaci (8. den) byl vývoj *L. peruviana* zaznamenán téměř výhradně ve 20 °C.

Tab. 5: Porovnání intenzity infekce *L. peruviana* 2. a 8. den po infekčním sání v *Lu. longipalpis* chovaných ve 20 °C a ve 26 °C.

Intenzita infekce	Den 2		Den 8	
	20 °C	26 °C	20 °C	26 °C
Silná	0	5	3	0
Střední	0	9	12	0
Slabá	14	11	20	5
Neinfikované	5	11	18	58
Celkem	19	36	53	63



Obr. 9: Porovnání intenzity infekce *L. peruviana* 2. a 8. den po infekčním sání v *Lu. longipalpis* chovaných ve 20 °C a ve 26 °C. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

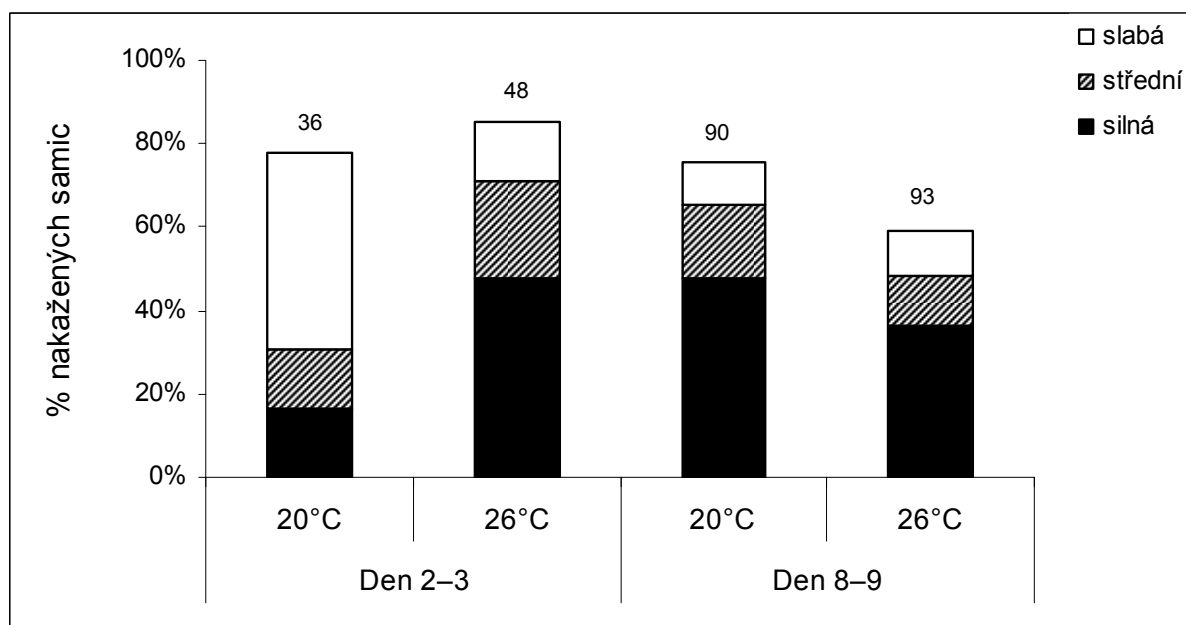
4.3.2 Vliv teploty na vývoj *L. braziliensis* (LC2177) v *Lu. longipalpis*

Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 6 a znázorněny na obrázku 10. V obou testovaných teplotách byl pozorován typický peripylární vývoj. Druhý den byly leishmanie přítomny v mesenteronu v natrávené krvi. Osmý den byl zaznamenán výskyt leishmanií v zadním střevě (především v pyloru), v mesenteronu a na stomodeální valvě.

Signifikantní rozdíl v intenzitě infekce mezi skupinami byl prokázán 2.–3. den po infekci ($\chi^2 = 15,042$; $p = 0,002$), 8.–9. den nebyl rozdíl statisticky průkazný ($\chi^2 = 6,25$; $p = 0,1$). Rozdíl v procentu infikovaných samic mezi skupinami 2.–3. den po infekci nebyl prokázán ($\chi^2 = 0,818$; $p = 0,366$), 8.–9. den se skupiny významně lišily ($\chi^2 = 5,593$; $p = 0,018$). Před defekací (den 2) se *L. braziliensis* rychleji vyvíjela ve 26 °C, po defekaci (den 8) byla intenzita infekce obdobná ve 20 °C i 26 °C.

Tab. 6: Porovnání intenzity infekce *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* chovaných ve 20 °C a ve 26 °C 2.–3. a 8.–9. den po infekčním sání.

Intenzita infekce	Den 2–3		Den 8–9	
	20 °C	26 °C	20 °C	26 °C
Silná	6	23	43	34
Střední	5	11	16	11
Slabá	17	7	9	10
Neinfikované	8	7	22	38
Celkem	36	48	90	93



Obr. 10: Porovnání intenzity infekce *L. braziliensis* 2.–3. a 8.–9. den po infekčním sání v *Lu. longipalpis* chovaných ve 20 °C a ve 26 °C. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

4.3.3 Porovnání vývoje *L. peruviana* a *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* při 20 °C a 26 °C pomocí qPCR

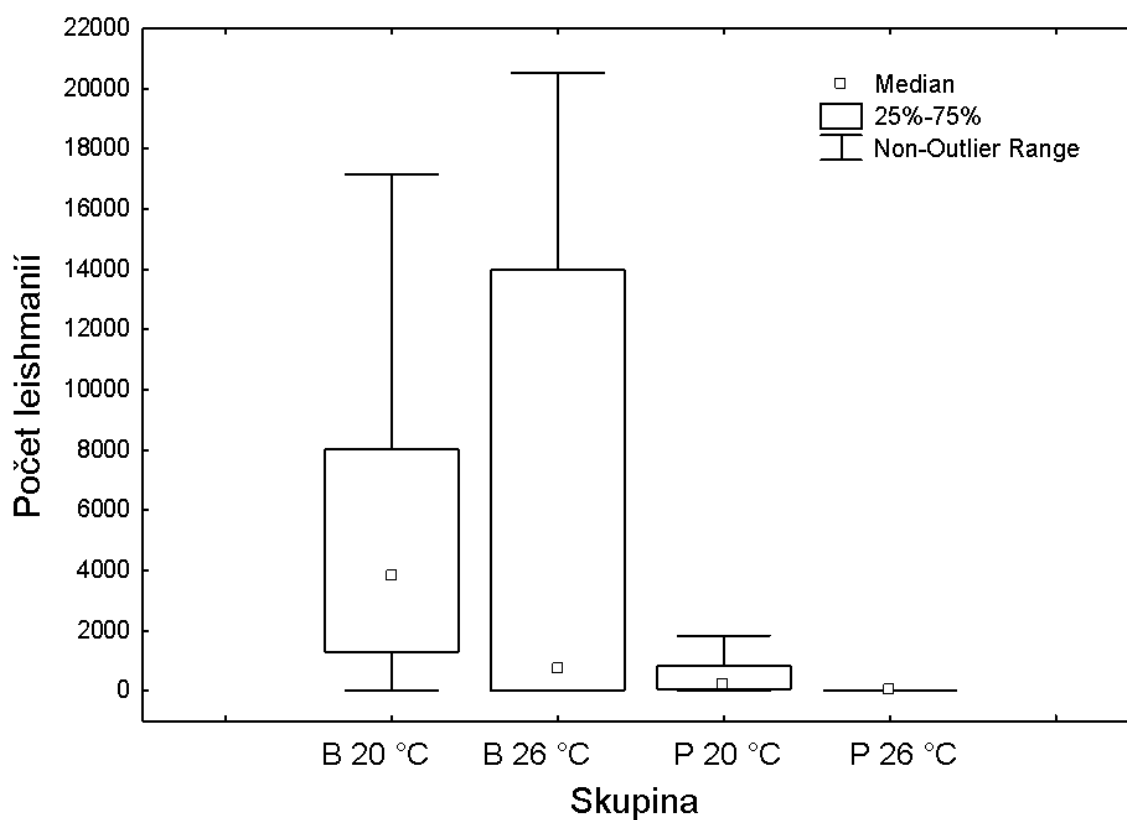
Porovnání počtu leishmanií *L. peruviana* a *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* ve 20 °C a 26 °C pomocí kvantitativní PCR je znázorněno na obrázku 11. Počet použitých samic je uveden v tabulce 7.

Kvantitativní PCR potvrdila výsledky z mikroskopického pozorování. Ve 20 °C *L. braziliensis* způsobovala vyšší nákazy a vyšší procento nakažených samic. U samic chovaných ve 26 °C byl zaznamenán vysoký rozptyl hodnot oproti samicím ve 20 °C. Hodně samic bylo negativních, infekce některých samic byly naopak velmi intenzivní. Rozdíl mezi samicemi z 20 °C a 26 °C není signifikantní.

U samic *Lu. longipalpis* infikovaných *L. peruviana* a chovaných ve 20 °C byly zaznamenány spíše nižší intenzity infekce, počty *L. peruviana* u samic ve 26 °C byly nulové. Rozdíl mezi skupinou samic chovaných ve 20 °C a 26 °C je statisticky průkazný ($P < 0,001$).

Tab. 7: Počty samic analyzovaných pomocí kvantitativní PCR. Analyzovány čtyři skupiny: samice nakažené *L. peruviana* chované ve 20 °C a 26 °C a samice nakažené *L. braziliensis* chované ve 20 °C a 26 °C.

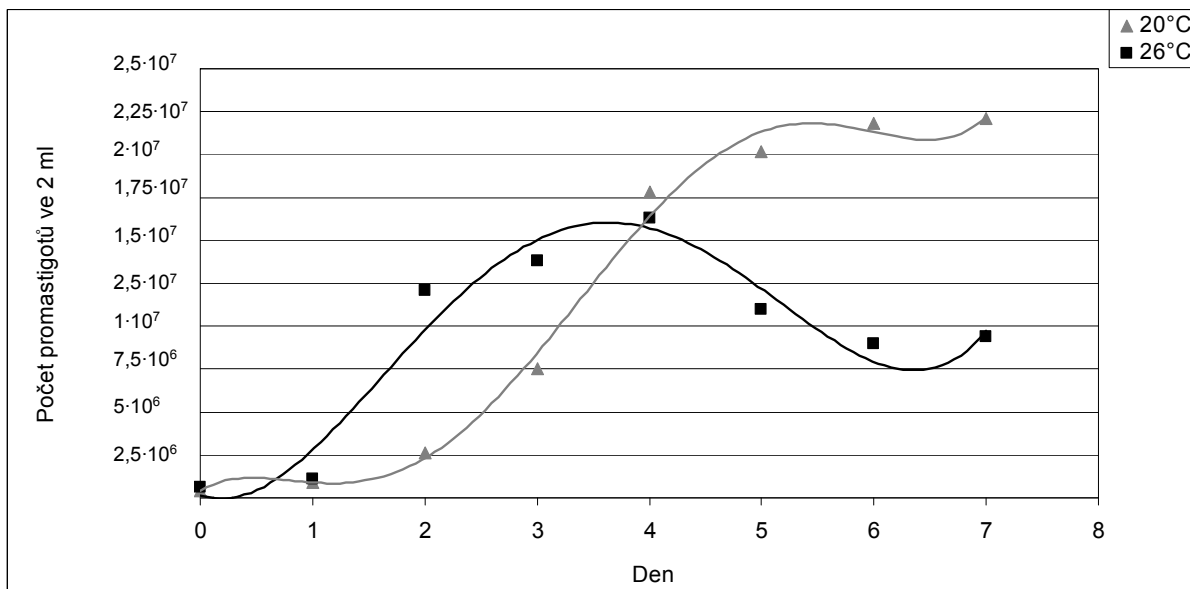
Leishmanie	Teplota	Počet samic
<i>L. braziliensis</i>	20 °C	43
<i>L. braziliensis</i>	26 °C	24
<i>L. peruviana</i>	20 °C	40
<i>L. peruviana</i>	26 °C	49



Obr. 11: Přehled rozložení hodnot intenzity infekce (bez extrémů a odlehlých hodnot) u samic *Lu. longipalpis* nakažených *L. braziliensis* (B) a *L. peruviana* (P) chovaných ve 20 °C a ve 26 °C.

4.3.4 Vývoj *L. peruviana* v kultuře při 20 °C a 26 °C

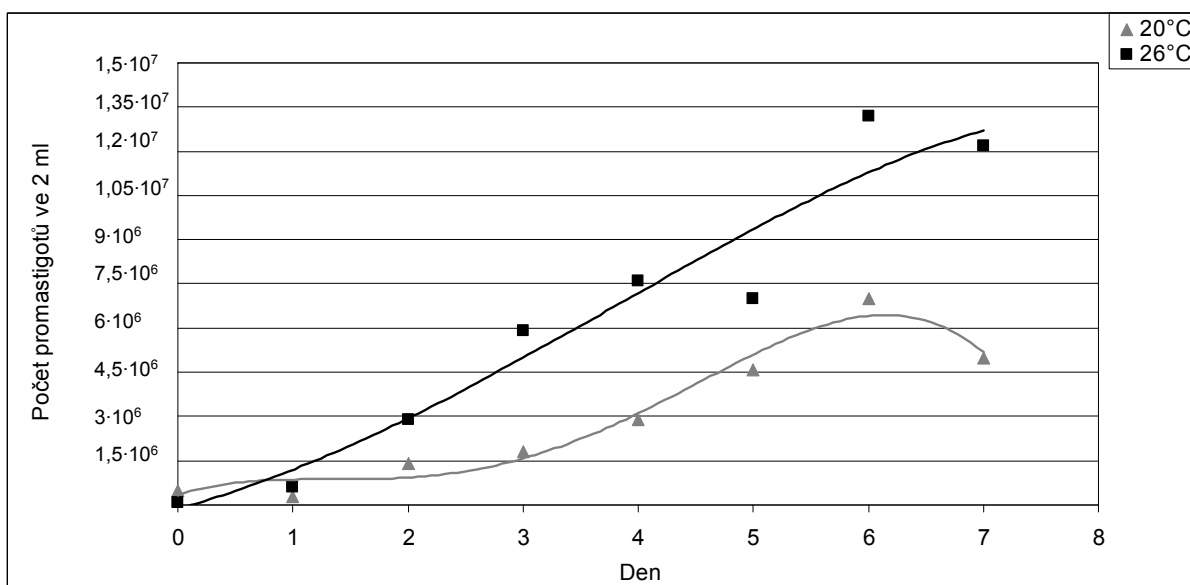
Vývoj *L. peruviana* v kultuře při 20 °C a 26 °C je znázorněn na obrázku 12. Buňky pěstované ve 20 °C se množily pomaleji oproti kultuře ve 26 °C, ale narostly do vyšší koncentrace.



Obr. 12: Porovnání růstu *L. peruviana* v kultuře při 20 °C a 26 °C.

4.3.5 Vývoj *L. braziliensis* v kultuře při 20 °C a 26 °C

Vývoj *L. braziliensis* v kultuře při 20 °C a 26 °C je znázorněn na obrázku 13. Buňky pěstované ve 26 °C se množily rychleji a dosáhly zhruba dvojnásobně vyšší koncentrace oproti buňkám pěstovaným ve 20 °C.



Obr. 13: Porovnání růstu *L. braziliensis* v kultuře při 20 °C a 26 °C.

4.4 Porovnání vývoje mutantů *L. braziliensis* M2903 v *Lu. longipalpis*

4.4.1 WT, c14, c401 v *Lu. longipalpis*

Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulkách 8 a 9 a znázorněny na obrázcích 14 a 15. Experimentální infekce byla provedena dvakrát s různými infekčními dávkami. Poprvé byla infekční dávka $1 \cdot 10^6/\text{ml}$, podruhé $5 \cdot 10^6/\text{ml}$. Pitvy byly provedeny 3., 6. a 10 den, u dávky $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ z důvodu vysoké mortality flebotomů pouze 3. a 6. den po infekčním sání.

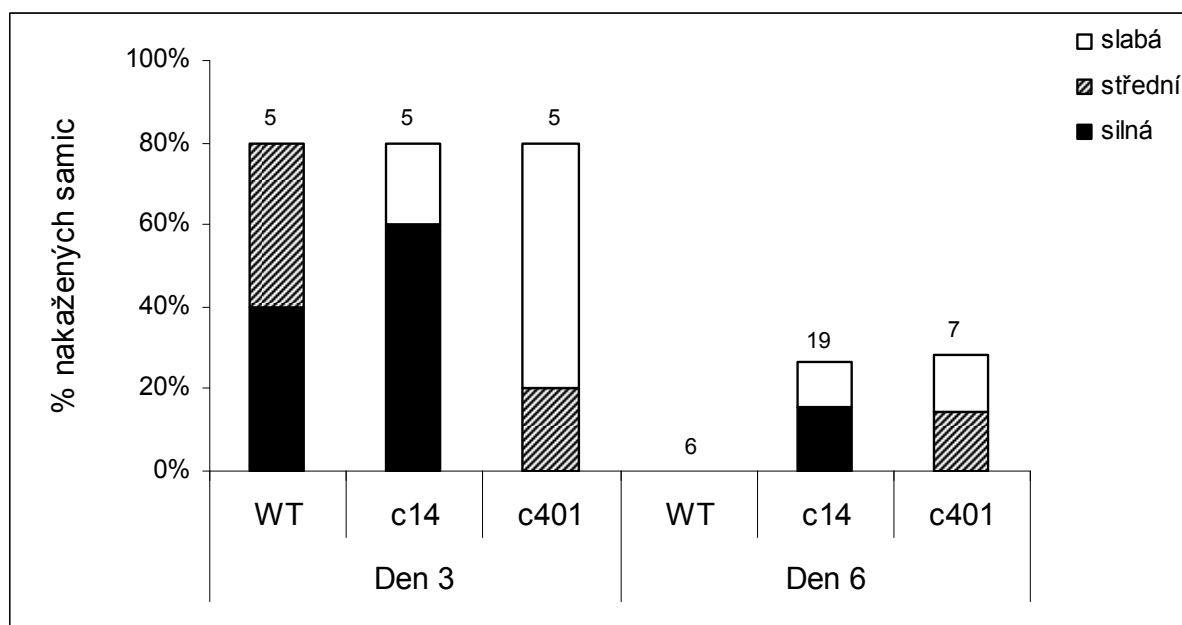
Výsledky byly otestovány χ^2 testem. Hladina pravděpodobnosti byla stanovena 95% ($p = 0.05$).

Infekční dávka $1 \cdot 10^6/\text{ml}$

Třetí den po infekčním sání se leishmanie všech tří linií vyvíjeli dobře. Šestý den nebyla žádná samice infikovaná WT, většina samic infikovaných c14 a c401 byla také negativních. Mezi liniemi nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ani v intenzitě infekce (3. den: $\chi^2 = 8,3$; $p = 0,21$; 6. den: $\chi^2 = 6,849$; $p = 0,335$) ani v procentu infikovaných samic (3. den: $\chi^2 = 0$; $p = 1$; 6. den: $\chi^2 = 2,083$; $p = 0,353$).

Tab. 8: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c14 a c401 v *Lu. longipalpis* 3. a 6. den po infekčním sání. Infekční dávka $1 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Intenzita infekce	Den 3			Den 6		
	WT	c14	c401	WT	c14	c401
Silná	2	3	0	0	3	0
Střední	2	0	1	0	0	1
Slabá	0	1	3	0	2	1
Neinfikované	1	1	1	6	14	5
Celkem	5	5	5	6	19	7



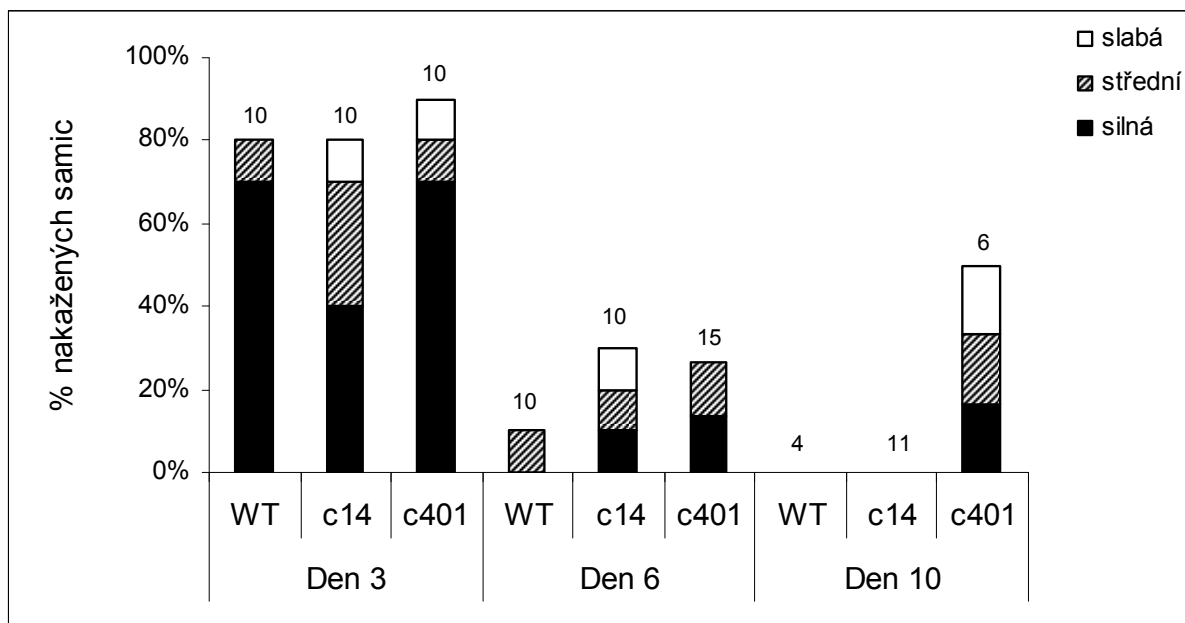
Obr. 14: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c14 a c401 v *Lu. longipalpis* 3. a 6. den po infekčním sání. Infekční dávka $1 \cdot 10^6$ /ml. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml

Třetí den po infekčním sání se všechny linie vyvíjely dobře, nelišily se ani v intenzitě infekce ($\chi^2 = 4$; $p = 0,677$) ani v procentu infikovaných samic ($\chi^2 = 0,48$; $p = 0,787$). Šestý den byla většina pitvaných samic negativních, linie se mezi sebou průkazně nelišily (intenzita infekce: $\chi^2 = 4,17$; $p = 0,654$; procento infikovaných samic: $\chi^2 = 0,48$; $p = 0,787$). Desátý den bylo signifikantně vyšší procento samic infikovaných linií c401 oproti c14 ($\chi^2 = 6,679$; $p = 0,009$), oproti WT se c401 nelišila ($\chi^2 = 2,857$; $p = 0,091$). V intenzitě infekce signifikantní rozdíl mezi liniemi zaznamenán nebyl ($\chi^2 = 8,75$; $p = 0,188$). Všechny samice nakažené WT a c14 byly negativní.

Tab 9: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c14 a c401 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml.

Intenzita infekce	Den 3			Den 6			Den 10		
	WT	c14	c401	WT	c14	c401	WT	c14	c401
Silná	7	4	7	0	1	2	0	0	1
Střední	1	3	1	1	1	2	0	0	1
Slabá	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Neinfikované	2	2	1	9	7	11	4	11	3
Celkem	10	10	10	10	10	15	4	11	6



Obr. 15: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c14 a c401 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

4.4.2 WT, c16, c605 v *Lu. longipalpis*

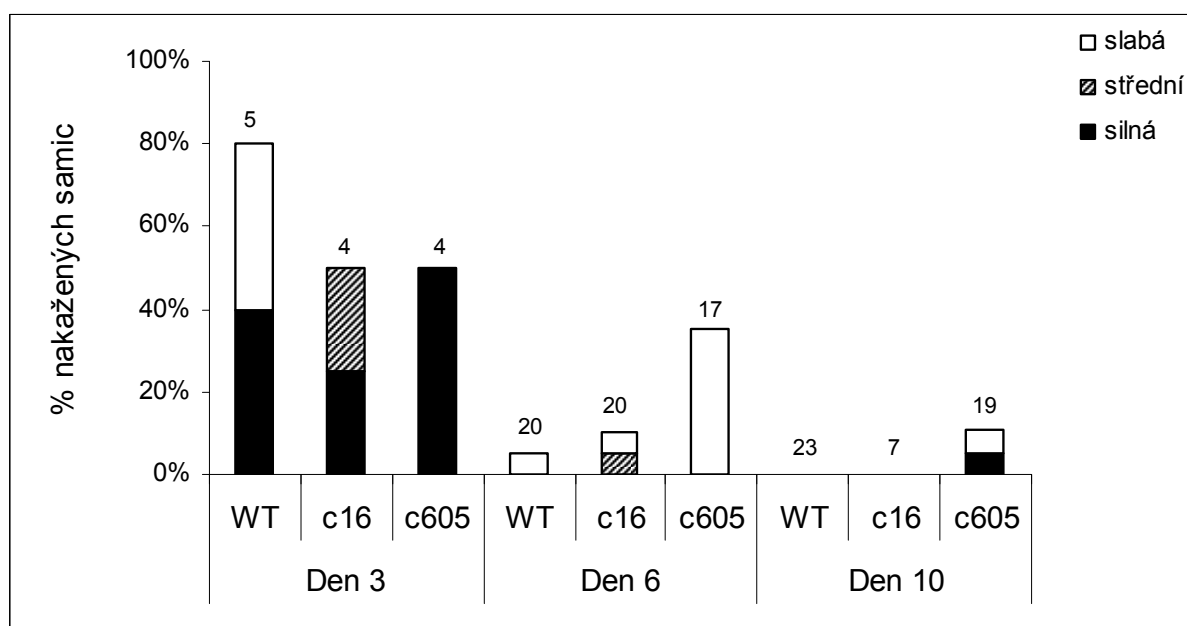
Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11 a znázorněny na obrázcích 16 a 17. Experimentální infekce byla provedena se dvěma infekčními dávkami. Poprvé byla infekční dávka $1 \cdot 10^6$ /ml, podruhé $5 \cdot 10^6$ /ml. Pitvy byly provedeny 3., 6. a 10. den. Výsledky byly otestovány χ^2 testem. Hladina pravděpodobnosti byla stanovena 95% ($p = 0.05$).

Infekční dávka $1 \cdot 10^6$ /ml

Třetí den po infekci byl pozorován normální vývoj, mezi liniemi nebyl signifikantní rozdíl (intenzita infekce: $\chi^2 = 6,5$; $p = 0,37$; procento infikovaných samic: $\chi^2 = 1,17$; $p = 0,557$). Šestý den byla většina vypitvaných střev bez infekce. Nejvíce infikovaných samic bylo pozorováno u linie c605. Vývoj c605 se signifikantně lišil od WT v intenzitě infekce ($\chi^2 = 5,498$; $p = 0,019$), signifikantně vyšší bylo také procento infikovaných samic ($\chi^2 = 5,498$; $p = 0,019$). Linie c604 se signifikantně lišila v intenzitě infekce oproti c16 ($\chi^2 = 6,057$; $p = 0,048$). Vývoj linií desátý den po infekčním sání se signifikantně nelišil (intenzita infekce: $\chi^2 = 3,292$; $p = 0,510$; procento infikovaných samic: $\chi^2 = 3,292$; $p = 0,193$), většina samic byla negativních.

Tab 10: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c16 a c605 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $1 \cdot 10^6$ /ml.

Intenzita infekce	Den 3			Den 6			Den 10		
	WT	c16	c605	WT	c16	c605	WT	c16	c605
Silná	2	1	2	0	0	0	0	0	1
Střední	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Slabá	2	0	0	1	1	6	0	0	1
Neinfikované	1	2	2	19	18	11	23	7	17
Celkem	5	4	4	20	20	17	23	7	19



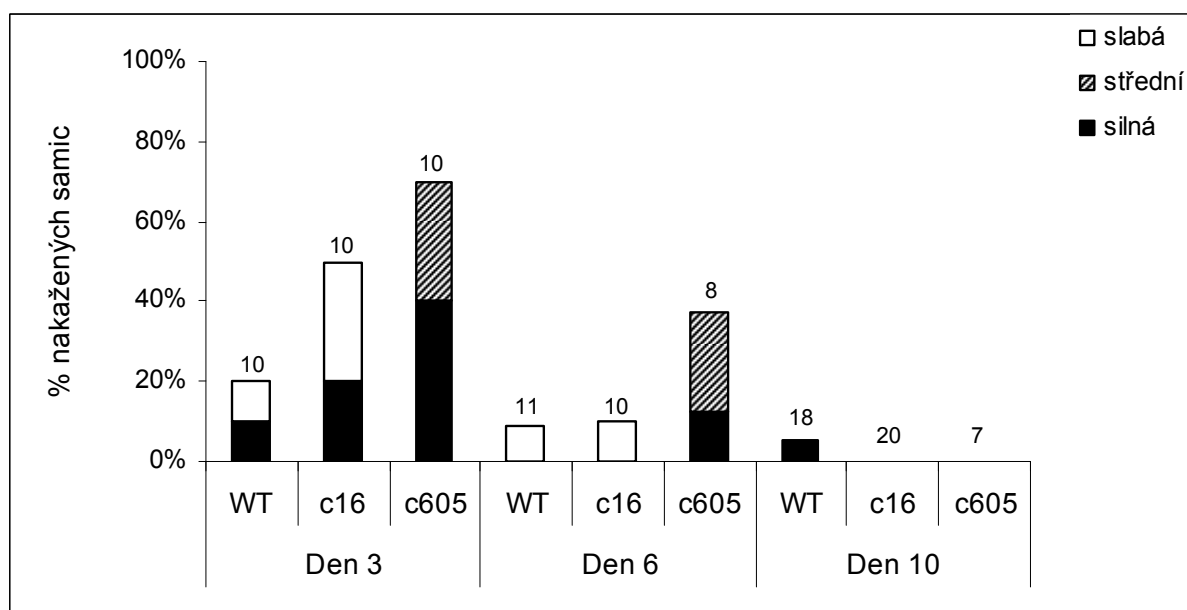
Obr. 16: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c16 a c605 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $1 \cdot 10^6$ /ml. Čísla nad sloupci značí počet vpitvaných samic.

Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml

Třetí den po sání se všechny linie vyvíjely dobře. Byl zaznamenán rozdíl v intenzitě infekce ($\chi^2 = 13,875$; $p = 0,031$), linie c605 způsobovala signifikantně vyšší intenzitu infekce oproti WT ($\chi^2 = 8,073$; $p = 0,045$). Mezi ostatními liniemi nebyl rozdíl statisticky průkazný. V procentu infikovaných samic se linie nelišily ($\chi^2 = 5,089$; $p = 0,079$). Šestý a desátý den většina pitvaných samic nebyla infikována. Mezi liniemi nebyl signifikantní rozdíl ani v intenzitě infekce (6. den: $\chi^2 = 9,192$, $p = 0,163$; 10. den: $\chi^2 = 1,534$, $p = 0,464$) ani v procentu infikovaných samic (6.den: $\chi^2 = 3,181$; $p = 0,204$; 10. den: $\chi^2 = 1,534$; $p = 0,464$).

Tab 11: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c16 a c605 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml.

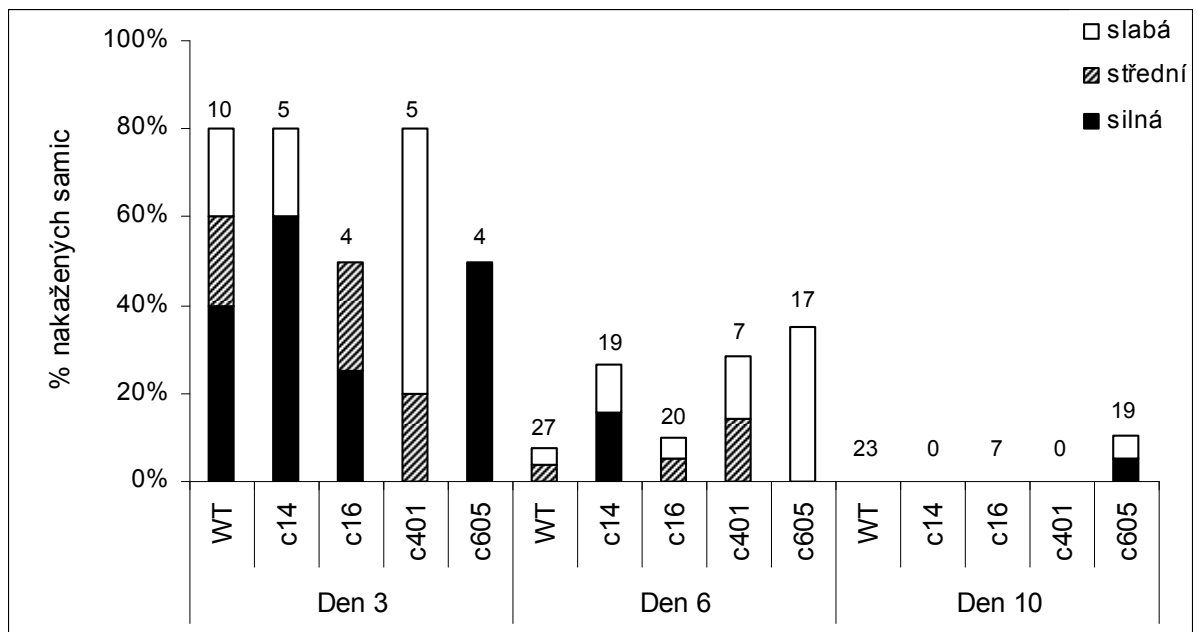
Intenzita infekce	Den 3			Den 6			Den 10		
	WT	c16	c605	WT	c16	c605	WT	c16	c605
Silná	1	2	4	0	0	1	1	0	0
Střední	0	0	3	0	0	2	0	0	0
Slabá	1	3	0	1	1	0	0	0	0
Neinfikované	8	5	3	10	9	5	17	20	7
Celkem	10	10	10	11	10	8	18	20	7



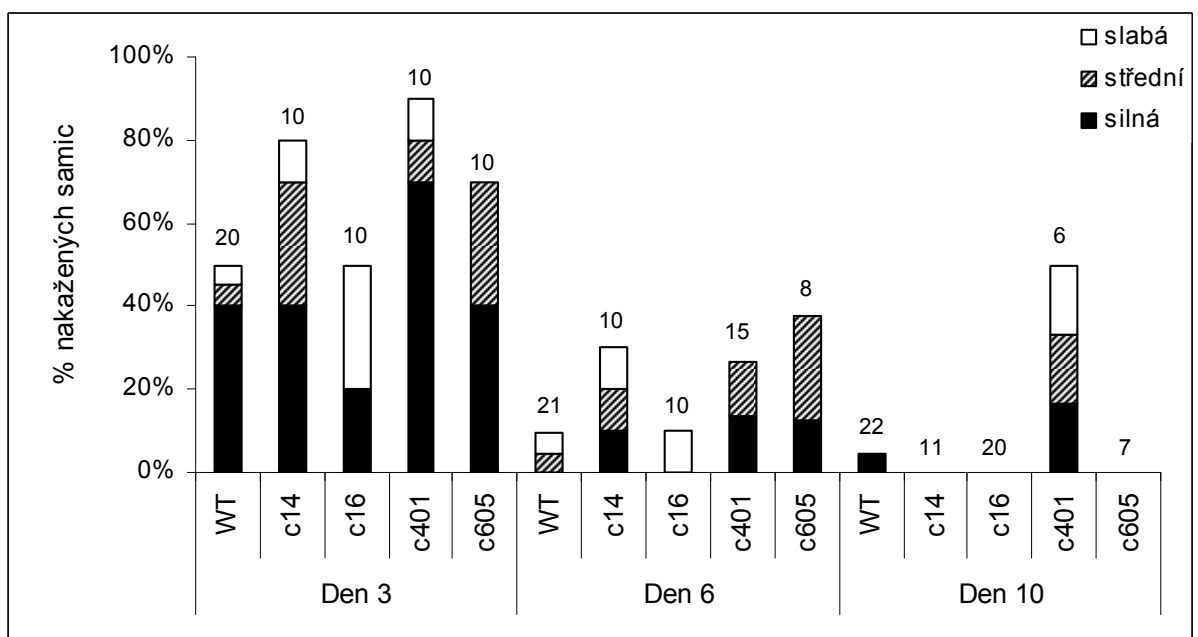
Obr. 17: Porovnání intenzity infekce mezi liniemi WT, c16 a c601 v *Lu. longipalpis* 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka $5 \cdot 10^6$ /ml. Čísla nad sloupci značí počet vypočítaných samic.

4.4.3 Shrnutí výsledků vývoje *L. braziliensis* M2903 a jejích mutantů v *Lu. longipalpis*

Ve všech experimentech se linie vyvíjely dobře pouze třetí den po infekci, šestý a desátý den byla většina vypočítaných samic negativních a to i u kontrolní linie WT. Rozdíl ve vývoji mezi liniemi c14 a c16 nebyl průkazný ani při jedné infekční dávce. Vývoj linií c401 a c605 se signifikantně lišil v procentu nakažených samic desátý den po infekčním sání při infekční dávce $5 \cdot 10^6$ /ml ($\chi^2 = 4,55$; $p = 0,033$). Porovnání vývoje linií c14/c16 a c401/c605 při infekční dávce $1 \cdot 10^6$ /ml a $5 \cdot 10^6$ /ml je znázorněno na obrázcích 18 a 19. Hodnoty pro WT jsou pro danou infekční dávku spojeny. Pro vysvětlení těchto překvapivých výsledků jsme vývoj linie WT porovnali s vývojem dříve testovaného kmene LC2177, viz následující podkapitola.



Obr. 18: Porovnání vývoje linií c14/c16 a c401/c605 při infekční dávce $1 \cdot 10^6$ /ml.



Obr. 19: Porovnání vývoje linií c14/c16 a c401/c605 při infekční dávce $5 \cdot 10^6$ /ml.

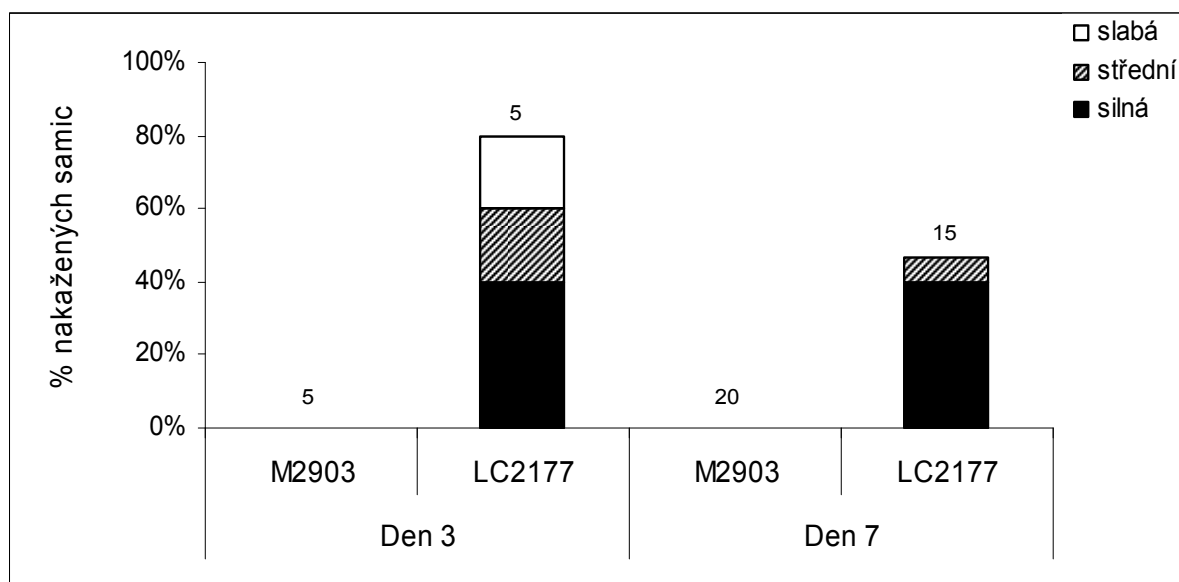
4.4.4 Porovnání vývoje *L. braziliensis* (M2903) a *L. braziliensis* (LC2177) v *Lu. longipalpis*

Neočekávané výsledky infekcí kmenem M2903 WT jsme se pokusili vysvětlit srovnáním s již dříve sledovaným kmenem LC2177. Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 12 a znázorněny na obrázku 20. Infekční dávka byla $1 \cdot 10^6$ /ml. Samice byly pitvány 3. a 7. den po infekčním sání.

Samice nakažené kmenem M2903 nebyly infikovány ani třetí ani sedmý den po experimentálním sání. Kmen LC2177 se vyvíjel výrazně lépe, sedmý den byla infikována zhruba polovina samic a téměř všechny infikované samice měly kolonizovanou stomodeální valvu.

Tab 12: Porovnání vývoje kmenů *L. braziliensis* M2903 a LC2177 v *Lu. longipalpis* 3. a 7. den po infekčním sání.

Intenzita infekce	Den 3		Den 7	
	M2903	LC2177	M2903	LC2177
Silná	0	2	0	6
Střední	0	1	0	1
Slabá	0	1	0	0
Neinfikované	5	1	20	8
Celkem	5	5	20	15



Obr. 20: Porovnání vývoje kmenů *L. braziliensis* M2903 a LC2177 v *Lu. longipalpis* 3. a 7. den po infekčním sání.

5 DISKUZE

5.1 Vývoj *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis*

Charakter vývoje *L. braziliensis* v trávicím traktu *Lu. longipalpis* byl sledován pomocí GFP značeného kmene XD29. Tento kmen se vyznačoval klasickým peripylárním vývojem. Po defekaci byli v oblasti zadního střeva (především v ileu a pyloru) pozorováni přichycení promastigoti. Anteriorní migrace promastigotů do oblasti stomodeální valvy byla však oproti očekávání zaznamenána pouze u několika samic. Vysvětlujeme si to tím, že použitá infekční dávka byla pro tento kmen nízká. Vývoj leishmanií byl navíc sledován pouze do devátého dne po infekčním sání. Je možné, že anteriorní migrace u tohoto kmene nastává v pozdější fázi infekce. Pro další pokusy bude proto nutné zvýšit infekční dávku a sledovat vývoj leishmanií po delší dobu infekce.

Dále jsme se v této práci pokusili pomocí histologie osvětlit, zda se *L. braziliensis* během svého vývoje váže k epitelu mesenteronu *Lu. longipalpis*. Schopnost leishmanií podrodu *Leishmania* přichytávat se k mesenteronu přenašeče vkládáním bičíků mezi mikrovilli je známý, do detailů prozkoumaný a všeobecně uznávaný fenomén (shrnutí v Bates, 2008). Jiná situace ovšem panuje u podrodu *Viannia*. Pokud je mi známo, k přichycování leishmanií tohoto podrodu k mesenteronu přenašeče se přímo vyjadřují pouze dvě práce. Jediná práce, kde autoři tvrdí, že zaznamenali promastigoty *L. braziliensis* přichycené k mesenteronu *Lu. sanguinaria* a *Lu. gomezi* je staršího data (Johnson a Hertig, 1970). Naproti tomu Walters et al. (1989) uvádějí, že během vývoje *L. panamensis* v *Lu. gomezi* nepozorovali žádnou buňku interagující s mikrovilli epitelu mesenteronu. Vazba leishmanií podrodu *Viannia* k mesenteronu přenašeče tak nebyla v literatuře jednoznačně prokázána.

Naše výsledky potvrzují údaje Walters et al. (1989); histologie neprokázala vazbu promastigotů *L. braziliensis* k mesenteronu *Lu. longipalpis*. V oblasti abdominálního mesenteronu byli pozorováni pouze promastigoti lokalizovaní volně v lumen střeva. Výsledek je potřeba potvrdit na větším počtu infikovaných samic, nicméně z něj můžeme usuzovat, že se *L. braziliensis* během svého vývoje v *Lu. longipalpis* přichycují jen pomocí hemidesmosomů, a to ke kutikulární výstelce zadního střeva a stomodeální valvy, stejně jak to bylo popsáno u *L. panamensis* v práci Walters et al. (1989).

Vazba v oblasti zadního střeva chrání *L. braziliensis* před vydefekováním zřejmě stejně dobře jako leishmanie podrodu *Leishmania* přichycení k mikrovillární výstelce

mesenteronu (Sacks et al., 2000; Myskova et al., 2007; Bates, 2008). Po defekaci flebotoma by tak promastigoti *L. braziliensis* mohli migrovat přes lumen mesenteronu přímo do oblasti kardie a ke stomodeální valvě, aniž by docházelo k jejich přichycení k mesenteronu přenašeče. Zda tomu tak skutečně je nám potvrdí až další výsledky z optického a elektronového mikroskopu.

5.2 Morfologie buněk *Leishmania braziliensis*

Morfologie leishmanií v trávicím traktu přenašeče byla u podrodu *Viannia* detailně popsána pouze u *L. panamensis* v práci Walters et al. (1989). Nieves a Pimenta (2000) sice popisují morfologii *L. braziliensis* ze střeva *Lu. migonei*, rozlišují ale pouze procyklické promastigoty, nektomonády, haptomonády a paramastigoty. Gontijo et al. (1995) pozorovali pouze dvě formy *L. braziliensis* ve střevě *Lu. longipalpis*, krátké promastigoty a oválné formy. Autoři však sami přiznávají, že jejich výsledky byly ovlivněny nedostatečným množstvím amastigotů v lézích křečků, na nichž samice sály, a z toho vyplývající nízkou infekcí a nízkým počtem nakažených flebotomů. Johson a Hertig (1970) popisují morfologii *L. braziliensis* v *Lu. pomezi* a *Lu. sanguinaria*, ale neuvádějí rozměry ani názvosloví pozorovaných tvarů buněk. Proto jsme se rozhodli provést podrobnější studii morfologie *L. braziliensis*.

Buňky *L. braziliensis* ze střeva *Lu. longipalpis* byly podle délky těla, délky bičíku a vzájemného umístění jádra a kinetoplastu rozděleny do čtyř základních morfologických skupin: dlouhé nektomonády, krátké nektomonády, paramastigoty a metacyklické promastigoty. Mezi krátkými nektomonádami bylo možné rozlišit další tři skupiny: nektomonády s krátkým bičíkem, tlusté nektomonády a štíhlé nektomonády.

Morfologie buněk *L. braziliensis* byla ve srovnání s morfologií *L. panamensis* podle Walter et al. (1989) odlišná. Například ne všichni paramastigoti *L. braziliensis* měli poměr délky bičíku a délky buňky větší než tři, jak tomu bylo u *L. panamensis*. Dlouhé nektomonády *L. braziliensis* byly více variabilní co do šířky buňky i délky bičíku. Vřetenovitým nektomonádám *L. panamensis* s bičíkem přibližně stejně dlouhým jako tělo buňky by mohly v našich pokusech odpovídat nektomonády s krátkým bičíkem. Walters et al. (1989) také popisovali krátké promastigoty s poměrem délek bičíku a buňky v rozmezí hodnot 1,4–1,6, z nichž vznikali metacykličtí promastigoti. K těmto formám by se daly přirovnat námi pozorované štíhlé krátké nektomonády. Výskyt krátkých širokých nektomonád s dlouhým bičíkem, jež jsme pozorovali u *L. braziliensis*, Walters et al. (1989)

u *L. panamensis* nezmiňují. Je možné, že z těchto forem také vznikají metacykličtí promastigoti.

Kromě krátkých štíhlých metacyklických promastigotů byly u *L. braziliensis* zaznamenány také tlusté formy s dlouhým bičíkem. Podobní ovální promastigoti s bičíkem alespoň 1,8krát delším než tělo byli pozorováni u *L. major* v *P. papatasi* (Čiháková et al. 1997; Sádlová et al., 2010). Na jejich povrchu byl detekován protein HASPB (Gene B protein) (Jovana Sádlová, osobní sdělení), který je u promastigotů specificky exprimován pouze u metacyklických stádií (Rangarajan et al., 1995). Oválné formy *L. major* tak lze považovat za metacyklické promastigoty (Jovana Sádlová, osobní sdělení). Proto jsme krátké tlusté promastigoty *L. braziliensis* s bičíkem alespoň 2krát delším než je délka těla též pokládali za metacyklické promastigoty.

Oproti práci Walters et al. (1989) a Nieves a Pimenta (2000) nebyli pozorováni procykličtí promastigoti. Je pravděpodobné, že většina procyklických promastigotů se do třetího dne přeměnila na krátké a dlouhé nektomonády, jak je to popsáno ve Walters et al. (1989). Haptomonády, jejichž výskyt je uveden v obou výše zmíněných studiích, nebylo možné na nátěrech identifikovat. Pod světelným mikroskopem a na histologických preparátech byly v oblasti zadního střeva, pyloru a na stomodeální valvě pozorovány přichycené formy. Přítomnost haptomonád *L. braziliensis* ve střevě *Lu. longipalpis* proto můžeme potvrdit.

5.3 Vliv teploty na vývoj *L. peruviana* a *L. braziliensis*

Na možný vliv teploty na vývoj leishmanií podrodu *Leishmania* upozorňují Leaney (1977) a Rioux et al. (1985) u *L. major* a *L. infantum*, respektive. V této práci jsme prokázali, že teplota ovlivňuje také vývoj *L. peruviana* a *L. braziliensis*, zástupce leishmanií podrodu *Viannia*. Stejně jako Leaney (1977) a Benkova a Volf (2007) předpokládáme, že teplota primárně ovlivňuje rychlost trávení a defekace flebotomů. V nižší teplotě je trávení pomalejší a leishmanie pak mají více času se namnožit a transformovat z procyklických promastigotů na dlouhé nektomonády. Dlouhé nektomonády jsou formy, které unikají z endoperitrofického prostoru po prasknutí peritrofické matrix a jsou zodpovědné za kolonizaci mesenteronu u podrodu *Leishmania* (Sádlová a Volf, 2009). *Leishmania braziliensis*, ačkoliv je druh žijící v teplých oblastech deštných lesů a nížin v Amazonii, se vyvíjela relativně dobře jak ve 20 °C tak i ve 26 °C. Naopak, *L. peruviana* je vysokohorský druh vyskytující se v údolí And v Peru.

Je tedy adaptovaná na vývoj za nižších teplot a na pomalejší trávení přenašeče. Ve 20 °C se proto *L. peruviana* v *Lu. longipalpis* vyvíjela dobře i po defekaci.

Ve 26 °C byl u *L. peruviana* v *Lu. longipalpis* druhý den po infekci pozorován normální vývoj, zatímco osmý den byla většina samic negativních. Předpokládali jsme proto, že byly leishmanie vydefekovány společně s natrávenou krví. Abychom si tuto hypotézu potvrdili, bylo vypitváno několik samic pátý den po sání. Většina pozitivních samic měla velmi slabou infekci (10–20 parazitů), pouze v jednom případě se jednalo o infekci silnou. Tento výsledek je potřeba interpretovat opatrně s ohledem na počet vypitvaných samic a počet nalezených leishmanií. Můžeme pouze konstatovat, že v některých případech se *L. peruviana* byla schopna udržet ve střevě *Lu. longipalpis* během defekace, ale nebyla schopna dospět do stádia zralé infekce. Co je příčinou neschopnosti *L. peruviana* dokončit vývoj v *Lu. longipalpis* ve 26 °C zůstává otázkou. S největší pravděpodobností to podle nás bude příliš časná defekace flebotomů v kombinaci s neschopností leishmanií překonat ještě jinou bariéru v pozdějších fázích infekce.

Pro porovnání přesnosti našich odhadů počtu promastigotů *L. peruviana* a *L. braziliensis* ve střevě *Lu. longipalpis* osmý den po infekci jsme využili kvantitativní PCR (qPCR). Výsledky z qPCR a naše odhady se téměř shodují. Vyjimku tvoří skupina samic nakažených *L. braziliensis* a chovaných ve 26 °C, u níž byl kvantitativní PCR stanoven vysoký rozptyl hodnot, jež nebyl pod mikroskopem zaznamenán. Tento rozdíl může být zapříčiněn tím, že počet leishmanií u silných infekcí nelze při mikroskopickém pozorování dobře odhadnout. Dalším důvodem by mohl být nižší počet samic testovaných metodou qPCR v této skupině.

Růst *L. peruviana* a *L. braziliensis* ve 20 °C a 26 °C byl pro porovnání studován také v kultuře. *Leishmania braziliensis* narostla do vyšší koncentrace ve 26 °C, *L. peruviana* naopak ve 20 °C. Obě leishmanie se tedy vyvíjely v kultuře lépe v pro ně přirozenější teplotě.

Přestože jsou *L. peruviana* a *L. braziliensis* blízké příbuzné druhy (Fraga et al., 2010), jsou uzpůsobeny k životu v jiných podmínkách. Neschopnost *L. peruviana* vyvíjet se ve vyšší teplotě svědčí o její těsné koevoluci s jejími vektory v relativně chladných horských údolích. To vedlo ke specializaci na vývoj v nízkých teplotách a tedy ve střevě s pomalejším trávením. Tato adaptace ovšem mohla způsobit ztrátu schopnosti *L. peruviana* přizpůsobit se odlišným podmínkám za vyšších teplot.

5.4 Porovnání vývoje mutantů *L. braziliensis* M2903 v *Lu. longipalpis*

Leishmanie podrodu *Viannia* mají funkční dráhu RNA interference (Ley et al., 2010). Její role při vývoji leishmanií v přenašeči není známa. Rozhodli jsme se proto ve spolupráci s laboratoří S. Beverleyho otestovat, zda bude mít vyřazení dráhy RNA interference vliv na vývoj *L. braziliensis* (M2903) v *Lu. longipalpis*. Mutantní linie (c14 a c16) byly získány delecí genu pro protein Argonaut, který je jednou z esenciálních molekul této dráhy a bez něhož by RNA interference neměla fungovat. Pro ověření životaschopnosti mutantů byl použit add-back (linie c401 a c605).

Fakt, zda je RNA interference pro vývoj *L. braziliensis* důležitá či ne, se nám bohužel nepodařilo prokázat. Všechny použité linie se vyvíjely dobře třetí den po infekčním sání. Leishmanie byly lokalizovány nejen v krvi uvnitř endoperitrofického prostoru, ale byly pozorovány také v oblasti zadního střeva a v lumen abdominálního a thorakálního mesenteronu. Šestý a desátý den však byla většina samic bez infekce. Vývoje v *Lu. longipalpis* nebyla schopná ani linie WT. Napadlo nás tedy, že infekční dávka byla pro tento kmen příliš nízká, a proto jsme infekční dávku zvýšili. Výsledek se ale od předchozích experimentů v podstatě nelišil, počet pozitivních samic byl ve většině případů nulový. Průběh pokusů byl navíc ztížen vysokou mortalitou flebotomů.

Abychom se ujistili, že negativní výsledky jsou způsobeny defektním kmenem leishmanií, zkusili jsme porovnat vývoj linie WT s vývojem kmene *L. braziliensis* (LC2177), který byl používán pro experimenty s vlivem teploty. Zatímco u kmene LC2177 byl pozorován normální vývoj třetí i sedmý den po infekčním sání, výskyt leishmanií kmene M2903 nebyl zaznamenán ani třetí, ani sedmý den po infekci. Mortalita flebotomů byla opět vysoká, ale hlavní problém je na straně leishmanií. Je možné, že kmen M2903 ztratil schopnost se vyvíjet v přenašeči díky dlouhodobému pasážování *in vitro* v laboratoři. Sníženou schopnost vývoje leishmanií v přenašeči díky dlouhodobému pasážování *in vitro* popsali Sádlová et al. (1999) u *L. major* v *P. papatasi*. U linie dlouhodobě pasážované *in vitro* v laboratoři bylo zaznamenáno prokazatelně nižší procento infikovaných samic a nižší intenzity infekce oproti virulentní linii (Sádlová et al., 1999).

Při pozorování buněk M2903 v kultuře nebylo zaznamenáno nic abnormálního a jejich vývoj byl typický pro *L. braziliensis*. Buňky měly tendenci se shlukovat do velkých plovoucích útvarů či byly ve velkých shlucích přisedlé ke dnu zkumavky. Abychom vyloučili záměnu linie WT s ostatními liniemi, poslali jsme ji na otestování zpět do laboratoře

S. Beverleyho. Do odevzdání této práce jsme bohužel nezískali odpověď. V testování vývoje *L. braziliensis* defektních v dráze RNAi v *Lu. longipalpis* bychom chtěli nadále pokračovat.

Jak již bylo zmíněno výše, po celou dobu práce s oběma kmeny *L. braziliensis* a s *L. peruviana* jsme měli problémy s vysokou mortalitou flebotomů. Abychom dosáhli dostatečného počtu vypitvaných samic, musely být pokusy s teplotou opakované mnohokrát. Kolonie *Lu. longipalpis* byla ale většinou v dobré kondici. Navíc v experimentech prováděných s jinými druhy leishmanií (např. *L. infantum*) kolegové neměli s mortalitou samic výraznější problém. Samice nakažené *L. braziliensis* či *L. peruviana* přežívaly dobře do druhého či třetího dne po sání, nejvyšší mortalita byla zaznamenána mezi třetím a pátým dnem po infekci, tedy v době defekace. Toto pozorování nás dovedlo k myšlence, zda leishmanie podrodu *Viannia* nejsou pro svého přenašeče více patogenní, než leishmanie podrodu *Leishmania*. U podrodu *Leishmania* se o patogenním účinku na přenašeče dlouho vedly spory. Teprve nedávno Rogers et al. (2007) prokázali, že samice *Lu. longipalpis* nakažené *L. mexicana* i *L. infantum* přežívají kratší dobu než nenakažené kontrolní samice. U leishmanií podrodu *Viannia* je možné, že dochází k částečnému ucpání zadního střeva a pyloru a tím také možná k částečnému blokování vývodů malpighických trubíc. Flebotomové by tak mohli mít problém s trávením a osmotickou regulací. Rádi bychom proto v budoucích pokusech porovnali vývoj *L. braziliensis* s *L. infantum*, tedy s druhem, který *Lu. longipalpis* přenáší v Latinské Americe.

6 ZÁVĚREČNÉ SHRNU TÍ

Pro *L. braziliensis* v trávicím traktu *Lu. longipalpis* je typický peripylární vývoj. Promastigoti byli přítomní v zadním střevě, v mesenteronu a v oblasti stomodeální valvy. V oblasti pyloru se promastigoti přichytávali ke kutikulární výstelce, v oblasti mesentronu se vyskytovali pouze volně v lumen. Přichycení promastigotů ke stěně mesenteronu nebylo pozorováno.

V trávicím traktu *Lu. longipalpis* byly rozlišeny čtyři morfologické formy: dlouhé nektomonády, krátké nektomonády, metacykličtí promastigoti a paramastigoti. Krátké nektomonády bylo možné rozdělit na nektomonády s krátkým bičíkem, tlusté nektomonády a štíhlé nektomonády.

Teplota ve studovaném rozmezí 20 °C a 26 °C ovlivňovala vývoj *L. peruviana*, zatímco na vývoj *L. braziliensis* neměla vliv. *Leishmania peruviana* se ve 20 °C vyvíjela dobře před i po defekaci, zatímco ve 26 °C byla osmý den po infekci (po defekaci) většina samic negativních. *Leishmania braziliensis* se vyvíjela stejně dobře v obou sledovaných teplotách. Jedním z důvodů neschopnosti vývoje *L. peruviana* je pravděpodobně její adaptace na pomalejší trávení přenašeče za nižších teplot a její neschopnost přizpůsobit se vývoji ve vyšších teplotách.

Vliv RNA interference na vývoj *L. braziliensis* v *Lu. longipalpis* nebyl objasněn. Třetí den po infekci se všechny testované linie vyvíjely dobře. Šestý a desátý byla většina samic negativních, vývoje v přenašeči nebyla schopna ani kontrolní linie WT. Je možné, že testovaný kmen ztratil schopnost vývoje v trávicím traktu přenašeče díky dlouhodobému pasážování *in vitro* v laboratoři.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adler, S. and Theodor, O. (1935).** Investigations on Mediterranean Kala Azar. VIII.: Further observations on Mediterranean sandflies. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 116: 505–515.
- Añez, N., Nieves, E. and Cazorla, D. (1989).** The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83: 634–635.
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, Ch. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., Mimori, T., Gomez, E. A. L., Hashiguchi, Y., Uezato, H. (2009).** Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrom *b* gene sequencing. Experimental Parasitology, 121: 352-361.
- Azevedo-Pereira, R. L., Pereira, M. C. S., Oliveria-Junior, F. O. R., Brazil, R. P., Côrtes, L. M. C., Madeira, M. F., Santos, A. L. S., Toma, L., Alves, C. R. (2007).** Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. Veterinary Parasitology, 145: 234–239 .
- Barbosa, A. F., Oliveira, S. M. P., Bertho, A. L., Franco, A. M. R., Rangel, E. F. (2006).** Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101: 851–856.
- Bates, P. A. (2008).** *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Current Opinion in Microbiology, 11: 340–344.
- Benkova, I. and Volf, P. (2007).** Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology, 44: 150–154.
- Castilho, T. M., Camargo, L. M. A., McMahon-Pratt, D., Shaw, J. J. and Floeter-Winter, L. M. (2008).** A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 78: 122–132.
- Cerutti H. and Casas-Mollano, J. A. (2006).** On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. Current Genetics, 50: 81–99.

- Coelho-Finamore, J. M., Freitas, V. C., Assis, R. R., Melo, M. N., Novozhilova, N., Secundino, N. F., Pimenta, P. F., Turco, S. J., Soares, R. P. (2011).** *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International Journal for Parasitology*, 41: 333–342.
- Croan, D. G., Morrison, D. A. and Ellis, J. T. (1997).** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 149–159.
- Čiháková, J. and Volf, P. (1997).** Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. dubosqi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 91: 267–279.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Doncker, S., Dujardin, J. C., Auwera, G. V. (2010).** Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 238–245.
- Gontijo, C. M. F., Falcão, A. R., Falcão, A. L., Coelho, M. V. (1995).** The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Nieva, 1912). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 367–373.
- Hannon, G. J. (2002).** RNA interference. *Nature*, 418: 244–251.
- Hertig, M. and McConnell, E. (1963).** Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 14: 92–106.
- Ilg, T., Etges, R. and Overath, P. (1992).** Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 6834–6840.
- Jaramillo, C., Travi, B. L. and Montoya J. (1994).** Vector competence of some Neotropical sandflies for *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, 8: 1–7.
- Johnson, P. T. and Hertig M. (1970).** Behavior of *Leishmania* in Panamanian phlebotomine sandflies fed on infected animals. *Experimental Parasitology*, 27: 281–300.
- Kasap, O. E. and Alten, B. (2005).** Laboratory estimation of degree-day developmental of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology*, 30: 328–333.
- Killick-Kendrick, R. (1979).** Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: *Biology of Kinetoplastida*, vol II. Academic Press, London/New York, p. 395–460.

- Killick-Kendrick, R., Lainson, R., Leaney, A. J., Ward, R. D. and Shaw, J. J. (1977a).** Promastigotes of *Leishmania b. braziliensis* in the gut wall of a natural vector, *Psychodopygus wellcomei*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71: 381.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., Hommel, M., Leaney, A. J. and Robertson, E. S. (1977b).** *Leishmania* in phlebotomid sandflies. V. The nature and significance of infections of the pylorus and ileum of the sandfly by leishmaniae of *braziliensis* complex. Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences, 198: 191–199.
- Lainson, R. (2010).** The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 1(2): 13–32.
- Lainson, R. and Shaw, J. J. (2010).** New World leishmaniasis. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections, p. 313–349.
- Lainson, R. and Shaw, J. J. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine, ed: Peters, W. and Killick-Kendrick, R., Academic Press, p. 1–120.
- Lainson, R., Ready, P. D. and Shaw, J. J. (1979).** *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences, 206: 307–318.
- Lainson, R., Ward, R. D. and Shaw, J. J. (1977).** *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences, 199: 309–320.
- Leaney, A. J. (1977).** The effect of temperature on leishmania in sandflies. Parasitology 75: 28–29.
- Lehane, M. J. (1997).** Peritrophic matrix structure and function. Annual Review of Entomology, 42: 525–550.
- Lye, L. F., Owens, K., Shi, H., Murta, S. M. F., Vieira, A. C., Turco, S. J., Tschudi, Ch., Ullu, E., Beverley, S. M. (2010).** Retention and loss of RNA interference pathways in Trypanosomatid protozoans. PLOS Neglected Tropical Diseases, 6: e1001161.
- Mahoney, A. B., Sacks, D. L., Saraiva, E., Modi, G. and Turco, S. J. (1999).** Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani* – sand fly interactions. Biochemistry, 38: 9813–9823.

- McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, Ch. and Schneider, P. (1995).** Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*, 310: 807–818.
- McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Ferguson, M. A. J. and Homans, S. W. (1990).** Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 19611–19623.
- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, A. J. and Sacks, D. L. (1992).** Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO Journal*, 11: 3593–3600.
- Muskus, C., Segura, I., Oddone, R., Turco, S. J., Leiby, D. A., Toro, L., Robledo, S. and Saravia, N. G. (1997).** Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania Viannia* subgenus. *The Journal of Parasitology*, 83: 671–678.
- Myšková, J. (2007).** Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. p. 1–53.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S. M., Volf, P. (2007).** A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*, 9: 317–324.
- Nieves, E. and Pimenta, P. F. P. (2000).** Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 37: 134–140.
- Nieves, E. and Pimenta, P. F. P. (2002).** Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 640–647.
- Novozhilova, N. M. and Bovin, N. V. (2010).** Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. cell surface. *Biochemistry (Moscow)*, 75: 770–780.
- Peacock, CH. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertzak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbino-witsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R. O., Barrel, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C.,**

- Smith, D. F. and Berriman, M. (2007).** Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39: 839–847.
- Pimenta, P. F. P., Saraiva, E. M. B., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., Turco, S. J. and Sacks, D. L. (1994).** Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 9155–9159.
- Pimenta, P.F., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V., Sacks, D. L. (1992).** Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256: 1812–1815.
- Rangarajan, D., Gokool, S., McCrossan, M. V. and Smith, D. F. (1995).** The Gene B protein localises to the surface of *Leishmania major* parasites in the absence of metacyclic stage lipophosphoglycan. *Journal of Cell Science*, 108: 3359–3366.
- Rangel, E. F., Barbosa, A. F., Andrade, C. A., Sousa, N. A. and Wermelinger, E. D. (1992).** Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Nieva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 235–238.
- Rangel, E. F., Travi, B. L., Barbosa, A. F. and Montoya, J. (1993).** Development of Colombian isolates of *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Le. (V.) guyanensis* and *Le. (V.) braziliensis* in the sandfly *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Nieva, 1912) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 1993.
- Rioux, J. A., Aboulker, J. P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R. and Martini-Dumas, A. (1985).** Écologie des leishmanioses dans le sud de la France 21: Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale. *Annales de Parasitologie*, 60: 221–229.
- Robinson, K. A. and Beverley, S. M. (2003).** Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128: 217–228.
- Rogers, M. E., Bates, P. A. (2007).** *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLOS Pathogens*, 3: e91.

- Rogers, M. E., Chance, M. L. and Bates, P. A. (2002).** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124: 495–507.
- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P. and Bates, P. A. (2008).** *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10: 1363–1372.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J. and Beverley, S. M. (2000).** The role of phosphoglycans in *Leishmania* – sand fly interactions. *PNAS*, 97: 406–411.
- Sacks, D. L., Pimenta, P. F. P., McConville, M. J., Schneider, P. and Turco, S. J. (1995).** 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*, 181: 685-697.
- Sádlová, J. (1999).** The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 63: 331-366.
- Sádlová, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votýpka, J., Volf, P. and Smith, D. F. (2010).** The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular Microbiology*, 12: 1765–1779.
- Sádlová, J., Svobodová, M. and Volf, P. (1999).** *Leishmania major*: effect of repeated passages through sandfly vectors or murine hosts. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 93: 599–611.
- Sádlová, J. and Volf, P. (2009).** Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research*, 337: 313–325.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. and Messer, G. (1992).** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 9944–9948.
- Schlein, Y., Schnur, L. F. and Jacobson, R. L. (1990).** Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 353–355.

- Sheffter, S. M., Ro, Y. T., Chung, I. K. and Patterson, J. L. (1995).** The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*, 212: 84–90.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, Ch. and Ullu, E. (2004).** Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of Small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Molecular and Cell Biology*, 24: 420–427.
- Siomi, H. and Siomi, M. C. (2009).** On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457: 396–404.
- Smith, D. F., Peacock, CH. S. and Cruz, A. K. (2007).** Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, 37:1173–1186.
- Soares R. P. P., Barron, T., McCoy-Simandle, K., Svobodova, M., Warburg, A. and Turco, S. J. (2004).** *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Experimental Parasitology*, 107: 105–114.
- Soares, R. P. P., Cardoso, T. L., Barron, T., Araújo, M. S. S., Pimenta, P. F. P., Turco, S. J. (2005).** *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, 35: 245–253.
- Soares, R. P. P., Macedo, M. E., Ropert, C., Gontijo, N. F., Almeida, I. C., Gazzinelli, R. T., Pimenta, P. F. P., Turco, S. J. (2002).** *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 121: 213–224.
- Soares, R. P., Margonari, C., Secundino, N. C., Macedo, M. E., Costa, S. M., Rangel, E. F., Pimenta, P. F. and Turco, S. J. (2010).** Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: ID 439174, 7 pages.
- Stierhof, Y-D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., Ilg, T. (1999).** 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*, 78: 675–689.

- Svárovská A., Ant, T. H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S. M., Volf, P. (2010).** *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2⁻) but not lipophosphoglycan (lpg1⁻) for survival in permissive sand fly vectors. Public Library of Science Neglected Tropical Diseases, 4: e580.
- Svobodova, M., Votypka, J., Peckova, J., Dvorak, V., Nasereddin, A., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L. F., Volf, P and Warburg, A. (2006).** Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. Emerging Infectious Diseases, 12: 1860–1868.
- Turco, S. J. and Descoteaux, A. (1992).** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annual Review of Microbiology, 46: 65–94.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., Votypka, J. (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. International Journal for Parasitology, 34: 1221–1227.
- Volf, P. and Myskova, J. (2007).** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends in Parasitology, 23: 91–92.
- Volf, P. and Volfova, V. (2011).** Establishment and maintenance of sand fly colonies. Journal of Vector Ecology, 36: 1–9.
- Waki, K., Dutta, S., Ray D., Kolli, B. K., Akman, L., Kawazu, S. I., Lin, Ch. P. and Chang, K. P. (2007).** Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic protists: *Leishmania*-specific informative sites in hydrophilic loops of trans-endoplasmic reticulum *N*-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. Eukaryotic Cell, 6: 198–210.
- Walters, L. L. (1993).** *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. Journal of Eukaryotic Microbiology, 40: 196–206.
- Walters, L. L., Chaplin, G. L., Modi, G. B. and Tesh, R. B. (1989).** Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 40: 19–39.
- Walters, L. L., Irons, K. P., Modi, G. B., Tesh, R. B. (1992).** Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus Papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania Panamensis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 46: 211–228.
- Walters, L. L., Modi, G. B., Tesh, R. B. and Burrage, T. (1987).** Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36: 294–314.

- Warburg, A. (2008).** The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102: 161–166.
- Warburg, A., Tesh, R. B. and McMahon-Pratt, D. (1989).** Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. The Journal of Protozoology, 36: 613–617.
- Widmer, G. and Dooley, S. (1995).** Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus – parasite association. Nucleic Acid Research, 23: 2300–2304.
- Wilson, R., Bates, M. D., Dostalova, A., Jecna, L., Dillon, R. J., Volf, P., Bates, P. A. (2010).** Stage-specific adhesion of leishmania promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. PLOS Neglected Tropical Diseases, 4: e816.
- Yu, J. Y., DeRuiter, S. L. and Turner, D. L. (2002).** RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 6047–6052.