

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



**Rozdíly ve vývoji podrodů *Leishmania* a
Viannia v přenašeči**

Bakalářská práce

Jana Hlaváčová

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

2009

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu profesorovi Petru Volfovi za jeho pomoc a trpělivost při sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Luce Ječné, Aničce Svárovské a Jitce Hostomské za jejich pomoc při mých prvních krůčcích v laboratoři.

Obsah

1 Abstrakt.....	3
2 Úvod.....	4
3 Trávicí trakt flebotomů.....	4
4 Klasifikace leishmanií.....	5
5 Vývoj v přenašeči: podrod <i>Leishmania</i>	8
6 Vývoj v přenašeči: podrod <i>Viannia</i>	10
7 Lipofosfoglykan leishmanií.....	15
8 Závěr.....	20
9 Seznam použité literatury.....	21

1 Abstrakt

Leishmanie jsou parazitické prvoci přenášené flebotomy (Diptera: Phlebotominae). Rod *Leishmania* je rozdělen do tří podrodů: *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Podrody *Leishmania* a *Viannia* jsou patogenní pro člověka. Ve své práci porovnávám vývoj těchto dvou podrodů v přenašeči. Pro podrod *Leishmania* je typický suprapylární vývoj omezený na oblasti mesenteronu a stomodea, podrod *Viannia* se vyvíjí peripylárně, tj. v přední části proctodea (pyloru) a dále pak v mesenteronu a stomodeu. Odlišný způsob vývoje v přenašeči se odráží i ve složení lipofosfoglykanu, povrchové molekuly leishmanií důležité pro interakci s přenašečem.

Klíčová slova: *Leishmania*, *Viannia*, vývoj, flebotomus, přenašeč, lipofosfoglykan

Abstract

Leishmania are parasitic protozoa transmitted by phlebotominae sand flies. Genus *Leishmania* is divided into three subgenera: *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania*. *Leishmania* and *Viannia* are human pathogens. In this work I compare development of these two subgenera in their sand fly vectors. Suprapylarial development is typical for the subgenus *Leishmania*, which is restricted to the midgut and the foregut. Development of the subgenus *Viannia* is peripylarial, it takes place in anterior part of the hindgut (pylorus) and also in the midgut and the foregut. Different mode of development is associated with different structure of lipophosphoglycan, parasite surface molecule important for interaction with the sand fly vector.

Key words: *Leishmania*, *Viannia*, development, sand fly, vector, lipophosphoglycan

2 Úvod

Rod *Leishmania* je významným rodem parazitických prvoků způsobujících leishmaniózu, onemocnění s celou škálou projevů, od kožních až po viscerální, jehož následky mohou být pro neléčeného jedince fatální. Leishmanióza je přenášena krevsajícími dvoukřídlými čeledi Phlebotomidae a je rozšířena v tropech a subtropích Starého i Nového Světa. Lepší porozumění životnímu cyklu leishmanií, jejich vývoji a chování v trávicím traktu přenašeče by mohlo pomoci s leishmaniózou účinněji bojovat.

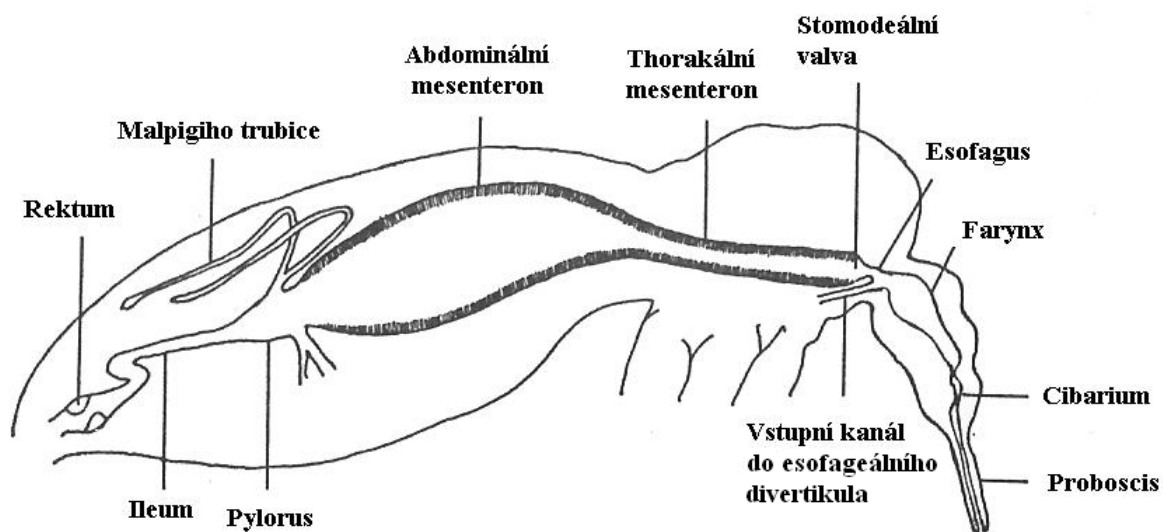
Rod *Leishmania* lze rozdělit do tří podrodů – *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*, jež se vyznačují odlišným vývojem v přenašeči. Lidské onemocnění způsobují zástupci prvních dvou podrodů, zatímco podrod *Sauroleishmania* parazituje pouze u plazů. Vývoj podrodu *Leishmania* v přenašeči je relativně dobře prostudován. I naše laboratoř, která má dlouholeté zkušenosti se studiem leishmaniózy a flebotomů, se doposud zabývala pouze vývojem podrodu *Leishmania*. Ve své diplomové práci bych měla pracovat s druhy *L. braziliensis* a *L. peruviana*, které patří do podrodu *Viannia*. V bakalářské práci proto shrnuji dosavadní poznatky o jednotlivých fázích vývoje podrodu *Viannia* v trávicím traktu přenašeče a porovnávám je s vývojem mnohem lépe prozkoumaného podrodu *Leishmania*.

3 Trávicí trakt flebotomů

Trávicí trakt flebotomů je místem vývoje leishmanií. Pro snazší orientaci v dalších kapitolách bych jej zde proto stručně popsala.

Trávicí trubice flebotomů je rozdělena na tři základní části – stomodeum, mesenteron a proctodeum. Stomodeum je vystláno chitinovou kutikulou a skládá se z proboscis (sosák), cibaria (ústní dutina), faryngu (hltan), esofagu (jícen) a esofageálního divertikula (vole). Mesenteron se člení na úzkou anteriorní (thorakální) oblast a širokou posteriorní (abdominální) oblast. Celý mesenteron je pokryt epitelem s mikrovilli. Na začátku thorakální části se nachází takzvaná cardie, mezi ní a stomodeem leží stomodeální valva. Předěl mezi mesenteronem a proctodeem tvoří pylorická valva. Proctodeum je vystláno chitinovou kutikulou a je složeno z pyloru, kde ústí malpighické trubice, a dále pak z ilea, rektální ampule a rekta (shrnuto ve Walters et al., 1987), viz obr. 1.

Důležitou součástí trávicího traktu je peritrofická matrix sekretovaná epitelem mesenteronu po nasátí krve. Rozděluje mesenteron na ekto- a endoperitrofický prostor. Její funkce je spojována s ochranou epitelu proti patogenům, oxidovým radikálům a



Obr. 1: Schéma trávicího traktu flebotoma (podle Killick-Kendrick, 1979, upraveno).

mechanickému poškození. Je složena z chitinu, proteinů a proteoglykanů (Lehane, 1997, Pascoa et al., 2002).

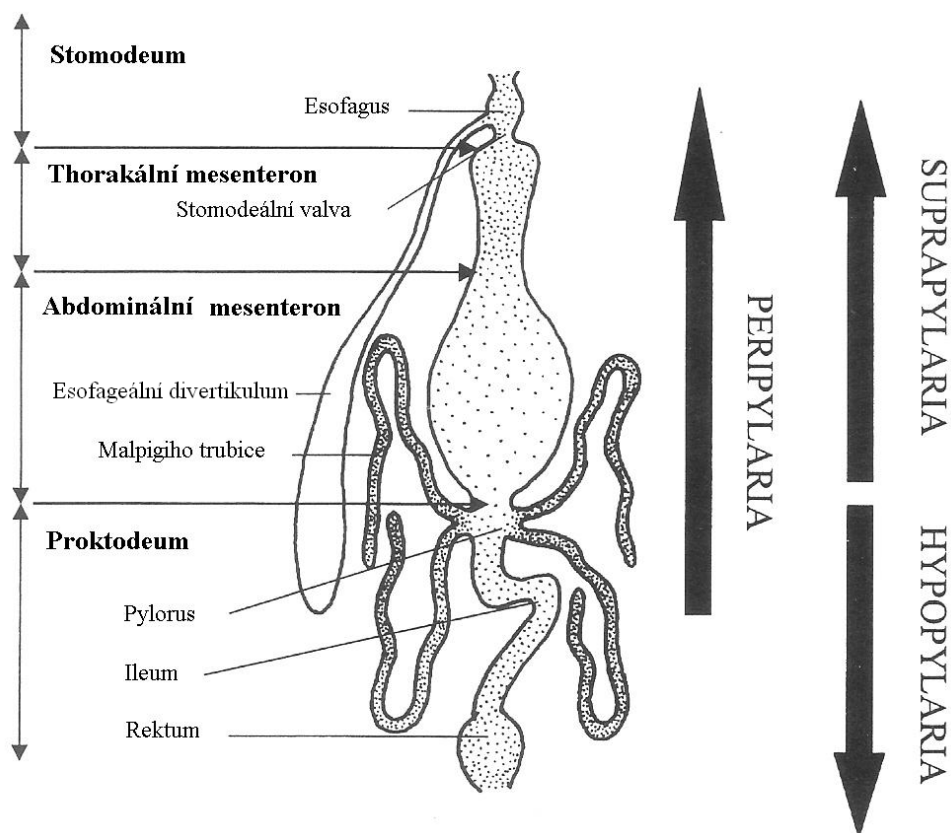
4 Klasifikace leishmanií

Rod *Leishmania* lze rozdělit podle způsobu vývoje v přenašeči na tři skupiny: Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria (shrnuto v Lainson a Shaw, 1987). Skupina Suprapylaria omezila svůj vývoj na část mesenteronu a stomodea, skupina Hypopylaria se vyvíjí pouze v zadní části střeva a skupina Peripylaria se vyvíjí jak v proctodeu, tak v mesenteronu a stomodeu (viz obr. 2).

Lainson a Shaw (1987) vytvořili dva podrody – podrod *Leishmania* se suprapylárním vývojem a s rozšířením v Novém i Starém Světě, a podrod *Viannia* s peripylárním vývojem a rozšířením pouze v Novém Světě. Ranque (shrnuto v Lainson a Shaw, 1987) vytvořil podrod *Sauroleishmania*, jehož zástupci mají hypopylární vývoj v přenašeči, jejich obratlovčím hostitelem jsou plazi a vyskytují se ve Starém Světě. Zástupci podrodu *Viannia* spolu s vektory a klinickým projevem jsou uvedeni v tabulce 1.

Asato et al. (2009) porovnali fylogenetickou analýzu rodu *Leishmania* s klasifikací leishmanií podle Lainson a Shaw (1987) a zjistili, že se téměř shodují. Fylogenetický strom se štěpí na tři základní větve – *Sauroleishmania* (*L. tarantolae*), *Leishmania* a *Viannia*. Podrod *Viannia* tvoří jeden monofyletický komplex *L. braziliensis*. Asato et al. (2009)

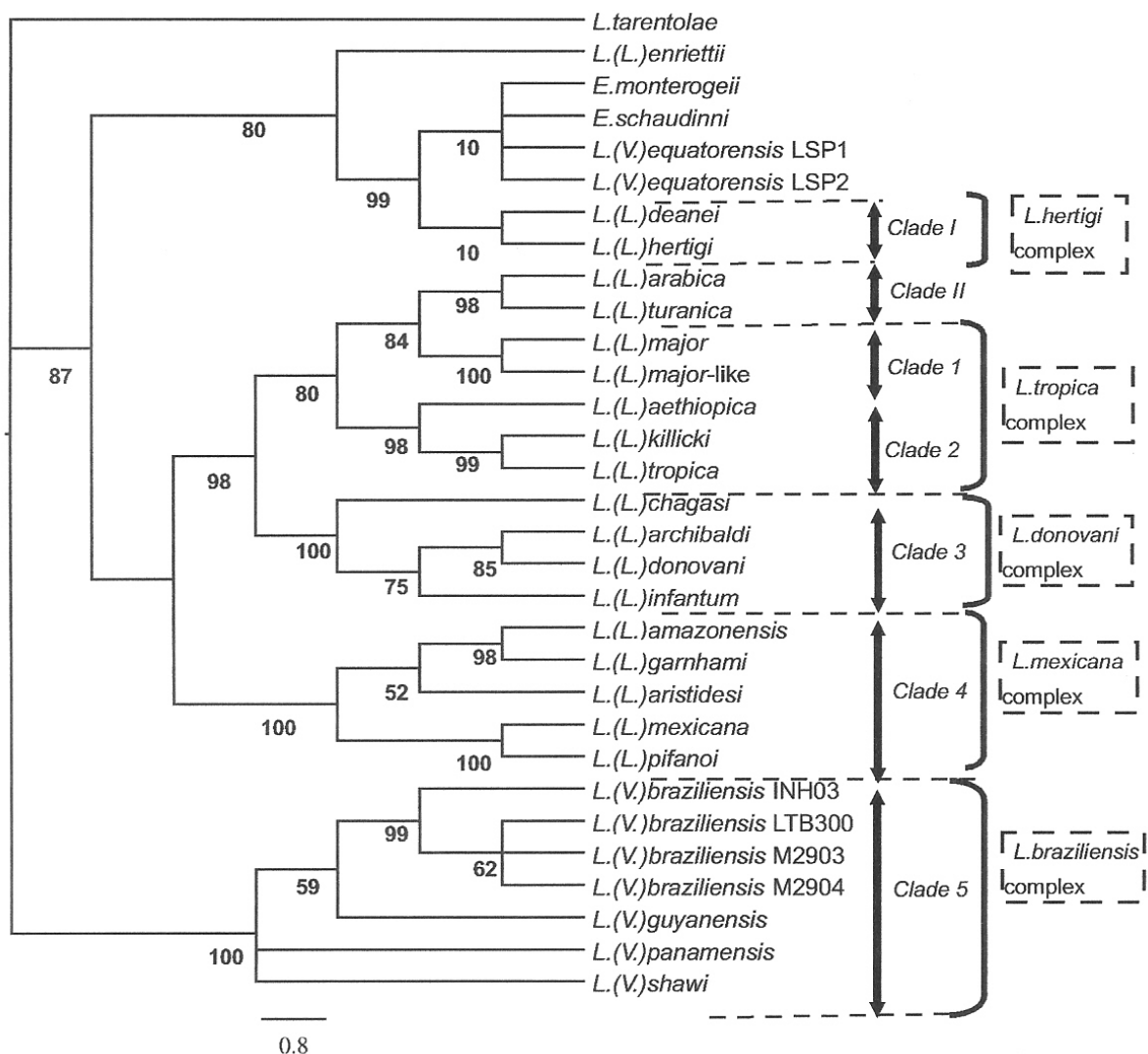
zároveň objasnili, že *Leishmania (V.) equatorensis* je součástí rodu *Endotrypanum*. Sporné zůstává postavení komplexu *L. hertigi* a *L. enrietti*, které jsou posazené poblíž rodu *Endotrypanum* (viz. obr. 3).



Obr. 2: Schematické znázornění suprapylárního, peripylárního a hypopylárního vývoje (podle Sádlová, 1999, upraveno).

Druh	Vektor	Klinický projev
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. carrerrai</i> <i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. welcomei</i> <i>Lu. whitmani</i>	kutánní mukokutánní
<i>L. guayanensis</i>	<i>Lu. anduzei</i> <i>Lu. umbratilis</i>	kutánní mukokutánní
<i>L. panamensis</i>	<i>Lu. trapidoi</i>	kutánní mukokutánní
<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	kutánní
<i>L. lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitous</i>	kutánní mukokutánní
<i>L. naiffi</i>	<i>Lu. isquamiventris</i>	kutánní
<i>L. schawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	kutánní

Tab. 1: Přehled zástupců podrodu *Viannia* s vektory a klinickým projevem. Prokázání vektorů tučně (podle Lawyer a Perkins, 2004, upraveno).



Obr. 3: Fylogeneze rodu *Leishmania*, cytochrom b, MLE (Maximum-likelihood estimation). Závorky a přerušované čáry naznačují komplexy leishmanií, jak je popsali Laison a Shaw (1987). Šipky označují skupiny založené na genu cytochromu b. Skupiny označené arabskými číslicemi jsou patogenní pro člověka, skupiny označené římskými číslicemi jsou pro člověka nepatogenní (převzato z Asato et al., 2009).

5 Vývoj v přenašeči: podrod *Leishmania*

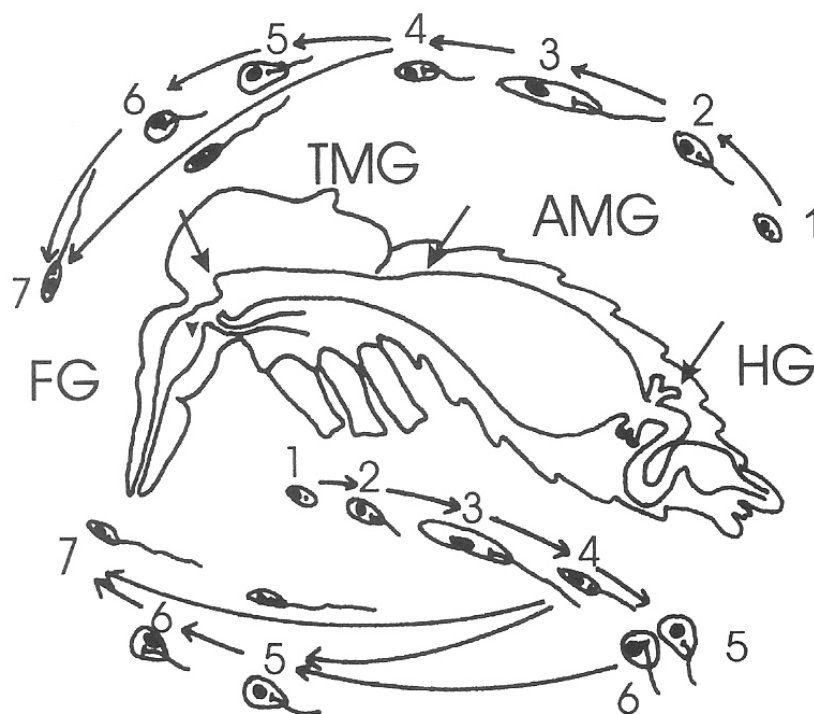
Vývojem různých druhů podrodu *Leishmania* se již v minulém století zabývalo mnoho prací využívajících technik světelné a elektronové mikroskopie (např. Warburg et al., 1986, Lawyer et al., 1987, 1990, Walters et al., 1987, 1989a, Elnaiem et al., 1992, Walters 1993). Jednotlivé práce se lišily v názoru na počet dělicích se forem a neshodovaly se ani v pohledu na vznik infekčního stadia, tzv. metacyklických promastigotů. V následujícím textu jsem se pokusila shrnout nejdůležitější a hlavně nejnovější poznatky o vývoji tohoto podrodu.

Velmi podrobně se vývojem *L. mexicana* v *Lu. longipalpis* zabývali Rogers et al., (2002), proto při popisu jednotlivých vývojových stádií podrodu *Leishmania* vycházím zejména z této práce. Několik hodin po nasátí flebotomem se amastigoti transformují na procyklické (tlusté a krátké) promastigoty. Druhý den jsou přítomni převážně procykličtí promastigoti, v nízkých počtech se objevují také dlouhé nektomonády. To vše se odehrává v endoperitrofickém prostoru v abdominálním mesenteronu. Třetí den po infekci jsou převládající formou dlouhé nektomonády. Pátý den po infekci dlouhé nektomonády naopak částečně vymizí a asi polovinu populace promastigotů tvoří krátké nektomonády. Od čtvrtého dne se objevují ještě dvě další formy, přichycené hruškovité haptomonády s krátkým bičíkem s diskovitě tvořeným koncem a vysoce pohybliví metacykličtí promastigoti s krátkým štíhlým tělem a dlouhým bičíkem. Haptomonády se vyskytují v nízkých počtech po celou dobu vývoje, naopak metacyklické formy tvoří 10. den po sání asi polovinu populace (Rogers et al., 2002), viz obr. 4.

Jak bylo zmíněno výše, uvnitř endoperitrofického prostoru obklopeného peritrofickou matrix probíhá dělení promastigotů a jejich diferenciaci na dlouhé nektomonády. Dlouhé nektomonády unikají po prasknutí peritrofické matrix do ektoperitrofického prostoru mesenteronu a přichycují se k epitelu vsunutím bičíků mezi mikrovilli. Následuje migrace nektomonád z abdominálního do thorakálního mesenteronu. V oblasti thorakálního mesenteronu jsou paraziti často zanořeni v gelovité hmotě nazývané jako PSG – promastigote secretory gel, jehož hlavní složku tvoří fPPG (filamentous proteophosphoglycan) (Stierhof et al., 1999). Podle Rogerse et al. (2002) vše nasvědčuje tomu, že právě PSG je místem diferenciaci krátkých nektomonád do metacyklických promastigotů. Ve stomodeu byly pozorovány haptomonády a paramastigoti přichycení ke kutikulární výstelce stomodeální valvy, esofagu a faryngu pomocí tzv. hemidesmozomů (Walters et al., 1989a). Díky chitinolytické aktivitě leishmanií dochází k poškození chitinové výstelky a epiteliálních buněk stomodeální valvy (Schlein et al., 1991, 1992, Volf et al., 2004, Rogers et al., 2008). Je možné,

že jsou do tohoto procesu zapojeny proteázy, jako například leishmaniolysin gp63 (Volf et al., 2004).

Volf et al. (2004) předpokládají, že poškození stomodeální valvy spolu s mechanickým zablokováním díky PSG usnadňuje přenos leishmanií do hostitele. Tento předpoklad potvrzuje experiment, který uskutečnili Rogers et al. (2008). Autoři prokázali, že samice *Lu. longipalpis* nakažené mutanty *L. mexicana* se zvýšenou expresí chitinázy sály 2,5krát déle oproti kontrole. Chitináza navíc působí jako virulentní faktor v hostiteli. Experimentálně přenesení mutanti způsobovali prokazatelně větší a rychleji se vyvíjející léze u myši (Rogers et al., 2008).



Obr. 4: Schéma vývoje jednotlivých stadií podrodu *Leishmania* (nahore) a podrodu *Viannia* (dole) v přenašeči. 1 – amastigot, 2 – procyklický promastigot, 3 – dlouhá nektomonáda, 4 – krátká nektomonáda, 5 – haptomonáda, 6 – paramastigot, 7 – metacyklický promastigot, FG – stomodeum, TMG – thorkální mesenteron, AMG – abdominální mesenteron, HG – proktodeum, (převzato ze Sádlová, 1999).

6 Vývoj v přenašeči: podrod *Viannia*

Popsání přesného vývoje podrodu *Viannia* v přenašeči je poměrně obtížný úkol. Oproti podrodu *Leishmania* bylo na toto téma publikováno poměrně málo. Většinu tvoří práce z 60. – 80. let a poznatky autorů se navíc v detailech rozcházejí. V dalším textu vycházím především ze dvou podrobných studií (Walters et al., 1989b, Walters 1993), u ostatních zmiňuji pouze odlišnosti nebo nově získané poznatky.

Patrně nejdůkladněji popsali jednotlivá vývojová stádia podrodu *Viannia* Walters et al. (1989b) u *L. panamensis* v přirozeném přenašeči *Lu. gomezi*. Experimentální infekci provedli sáním přes kuřecí membránu, nasáté samice chovali při teplotě 25 °C. Autoři ve své práci definovali osm vývojových forem: 1. amastigoty, 2. zavalité promastigoty (pravděpodobně procykly), 3. vřetenovité nektomonády, 4. dlouhé nektomonády, 5. krátké promastigoty A, 6. krátké promastigoty s dlouhým bičíkem B (pravděpodobně metacykly), 7. paramastigoty – volně plovoucí i přichycené hemidesmosomy, 8. hruškovité haptomonády přichycené ke stomodeální valvě.

Při počáteční fázi infekce se amastigoti přijatí s infekční krví transformovali uvnitř peritrofické matrix na zavalité promastigoty s krátkým bičíkem, kteří se intenzivně dělili až do 3. dne po infekci, kdy se začali transformovat na vřetenovité formy a dlouhé nektomonády. Třetí den po infekci, po protržení peritrofické matrix, se obě posledně zmíněné formy objevovaly v oblasti pyloru a ilea, kde se přichycovaly ke kutikulární výstelce pomocí hemidesmosomů (haptomonádní fáze). Zajímavé je, že pylorus i rektální ampule a papily mají na svém povrchu kutikulární trnovité výběžky, které se na žádném jiném místě zadního střeva nevyskytují. Dělení těchto stádií bylo omezené. U přibližně 75 % samic nektomonády migrovaly po protržení matrix i anteriorně k oblasti thorakálního mesenteronu.

Šestý den po infekci následovala anteriorní migrace leishmanií ze zadního střeva, u některých jedinců úplná (leishmanie z pyloru vymizely), ale u většiny samic převládala kolonizace pyloru po celou dobu pozorování. Nebylo pozorováno přichycování k mesenteronu. Migrující formy nebyly identifikovány, autoři však předpokládají, že by to mohly být vřetenovité nektomonády, které se v některých případech vyskytovaly v přední části thorakálního mesenteronu (cardii). V cardii byli pozorováni také krátkí promastigoti A s krátkým bičíkem (bičík cca 1,5krát delší než tělo), krátkí promastigoti B s dlouhým bičíkem (bičík cca 2,5krát delší než tělo, pravděpodobně metacykly) a paramastigoti s bičíkem třikrát delším než tělo. Promastigoti s krátkým bičíkem převládali a dělili se. Hruškovité haptomonády byly nalezeny přichycené ke stomodeální valvě pomocí hemidesmosomů, stejně

jako kulatí paramastigoti. Autoři proto předpokládali, že paramastigoti vznikli právě z těchto hruškovitých haptomonád. Přítomnost volně plovoucích paramastigotů vysvětlili jejich uvolněním a migrací do stomodea. Podobně jako u podrodu *Leishmania* byli i u podrodu *Viannia* nalezeni paraziti v cardii obaleni gelovitou elektrondenzní matrix (pravděpodobně PSG), což způsobilo jejich imobilitu.

Ve faryngu a esofagu našli Walters et al. (1989b) paramastigoty (malé, kulaté nebo srdcovité formy s jádrem a kinetoplastem vedle sebe) přichycené ke kutikulární výstelce hemidesmosomy. Někteří paramastigoti se dělili. Dále zde pozorovali promastigoty s krátkými a dlouhými bičíky. Jako infekční formu autoři označili promastigoty s dlouhým bičíkem a předpokládali i infekčnost paramastigotů.

Walters et al. (1989b) tedy určili 2 hlavní fáze multiplikace:

1. zavalití promastigoti (pravděpodobně procykličtí promastigoti)
2. krátkí promastigoti s krátkým bičíkem

Walters et al. (1989b) navíc v této práci použili názvosloví, ve kterém všechny volně plovoucí promastigoty nazvali nektomonádami a všechny přichycené promastigoty haptomonádami.

Walters (1993) dále porovnával vývoj leishmanií v přirozeném a nepřirozeném přenašeči. Součástí této studie byla i experimentální infekce *L. panamensis* v *Lu. gomezi* (přirozený přenašeč) a v *Lu. longipalpis* (nepřirozený přenašeč) metodou sání suspenze myších makrofágů infikovaných amastigoty spolu s lidskými erytrocyty přes kuřecí membránu. Nasáté samice byly chovány při teplotě 25 °C. V obou druzích flebotomů probíhala časná fáze infekce tak, jak bylo popsáno ve Walters et al. (1989b), viz výše. V pozdější fázi infekce byla v pyloru přirozeného vektora, oproti dřívějšímu článku, pozorována čtyři haptomonádní stádia – dlouhé, větvenovité, hruškovité haptomonády a paramastigoti (Walters, 1993). V pyloru nepřirozeného přenašeče byly přítomny pouze tři haptomonádní formy: lopatkovité, větvenovité a paramastigoti. V mesenteronu v oblasti cardie se v přirozeném přenašeči vyskytovaly tři formy nektomonád: dlouhé, krátké a paramastigoti. V nepřirozeném přenašeči se tyto formy vyvíjely uvnitř peritrofické matrix. Autor se domníval, že metacyklické stadium je odvozeno z dělících se krátkých nektomonád v mesenteronu, stejně jako paramastigoti (ale ti většinou v mesenteronu nejsou přítomni). Stejně jako v předchozí studii, i zde jsou dominantní formou na stomodeální valvě hruškovité haptomonády, které vznikají z dlouhých nektomonád, které se přichytí a rychle transformují (v předchozí studii předpokládali větvenovité haptomonády). Dále zde byli přichycení paramastigoti, jejichž předpokládaný vznik je z hruškovitých haptomonád, jak již bylo zmíněno výše. Vývojová stádia přítomná v esofagu a faryngu se shodovala s těmi popsávanými

v předchozí studii: paramastigoti různých tvarů (kulatí, ovální a hruškovití) přichycení k výstelce faryngu a esofagu a metacykličtí promastigoti (Walters, 1993).

Snad vůbec první experimentální infekci s podrodem *Viannia* provedli Hertig a McConnell (1963). Infikovali *Lu. sanguinarius*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* a *Lu. ylephiletor* krví smíchanou s kulturou *L. braziliensis sensu lato*. U všech druhů flebotomů byly pozorovány shodné hlavní rysy peripylárního vývoje. Třetí den po sání probíhalo dělení parazitů, přičemž hlavní formou byly podlouhlé štíhlé formy (dlouhé nektomonády). Zároveň byla zahájena migrace směrem k zadnímu střevu a přichycování k epitelu anteriorní části zadního střeva (pylorus), kde byly pozorovány i rozety dělicích se parazitů. Čtvrtý až pátý den byl pylorus plný parazitů. Vyskytovaly se zde přichycené haptomonády, široké a krátké formy, a také nektomonády, dlouhé štíhlé formy v lumen střeva. V jiných částech zadního střeva bylo parazitů málo. Infekce zadního střeva perzistovala celý život flebotoma.

V cardii byli paraziti koncentrováni u stomodeální valvy, nebo k ní přichycení, čtvrtý a pátý den byla valva vyplněná a rozšířená přichycenými leishmanii. Infekce stomodea nebyla nikdy vysoká a u jednotlivých druhů měla různou lokalizaci (farynx, esofagus, cibarium). Pokusy o přenos infekce sáním *Lu. sanguinarius* a *Lu. gomezi* na hlodavci *Proechimys semispinosus* (Echimyidae) nebo na dobrovolnících byly neúspěšné (Hertig a McConnell, 1963).

Neobvyklý vývoj *L. braziliensis* pozorovali pomocí elektronového mikroskopu Killick-Kendrick et al. (1977a) ve stěně střeva dvou odchycených samic přirozeného vektora *Lu. wellcomei*. Obě samice měly silnou infekci a promastigoti byli přítomni i pod kutikulární výstelkou esofagu a stomodeální valvy. Někteří promastigoti byli navíc netypicky lokalizováni v epiteliálních buňkách s degenerovanými mitochondriemi. Žádný parazit nebyl nalezen v abdominálním mesenteronu a ani v pyloru. Vzhledem k omezenému počtu vyšetřených jedinců je však otázkou, zda není tento typ vývoje náhodný nebo zda se nejedná o artefakt.

Killick-Kendrick et al. (1977b) též nakazili *Lu. longipalpis* sáním na myši infikované *L. braziliensis*, popřípadě na křečkovi (nižší úspěšnost). Nasáté samice byly chovány při teplotě 25 °C. V pyloru byly popsány malé, oválné nebo kulaté formy – paramastigoti, kulatější sphaeromastigoti (dle *Trypanosomy cruzi*) a promastigoti. Téměř všichni parazité byli přichyceni hemidesmozomy k výstelce pyloru a v mnoha případech bylo patrné jejich dělení.

Lainson et al. (1977) porovnávali vývoj komplexu *L. braziliensis* (*L. braziliensis*,

L. guyanensis, *L. panamensis*) a komplexu *L. mexicana* v *Lu. longipalpis*. Flebotomy infikovali sáním na lézích nakažených křečků, nasáté samice byly chovány při teplotě 24-26 °C. Autoři potvrdili, že se *L. braziliensis* vyvíjí především v pyloru.

V další práci Lainson et al. (1979) porovnávali vývoj *L. peruviana*, *L. tropica* a *L. major* v *Lu. longipalpis*. Flebotomové sáli suspenzi promastigotů přes kuřecí membránu (*L. peruviana*) nebo sáli na lézích křečků (*L. major*, *L. tropica*). Nasáté samice byly chovány při teplotách v rozmezí 22-28 °C. U infekce *L. peruviana* autoři pozorovali kulaté nebo tlusté promastigoty přichycené k pyloru a ileu, dlouhé aktivní promastigoty v mesenteronu a v pozdějších fázích infekce přítomnost parazitů v thorakálním mesenteronu. V cardii nebyli promastigoti *L. peruviana* přítomni. Naopak vývoj *L. major* a *L. tropica* byl omezen na mesenteron a oblast cardie.

Typický peripylární vývoj u dvou kmenů *L. braziliensis* v *Lu. intermedia* (přirozený vektor) pozorovali i Rangel et al. (1992). Experimentální infekce byly provedeny dvěma způsoby – sáním flebotomů na lézích infikovaného křečka nebo sáním suspenze promastigotů s krví přes kuřecí membránu. Nasáté samice byly chovány při přibližně 25 °C. Autoři bohužel neuvádí výskyt haptomonád, ale pouze promastigotů (přichycení nebo volní?) a paramastigotů, a to jak v zadním, tak předním střevě. Navíc zaznamenali výskyt promastigotů v mesenteronu, bohužel však neupřesnili jejich lokalizaci (abdominální nebo thorakální část?).

V následující studii Rangel et al. (1993) sáli *Lu. intermedia* na lézích křečků infikovaných *L. panamensis*, *L. guyanensis* a *L. braziliensis*. Nasáté samice byly chovány při teplotě 25 °C. Zjistili, že pro *L. guyanensis* je nejlepším vektorem *Lu. intermedia*. Pozorovali typický peripylární vývoj – promastigoti a paramastigoti přichycení k pyloru, promastigoti v mesenteronu a kolonizace stomodeální valvy. S výjimkou *L. braziliensis* nezaznamenali výskyt parazitů v ileu.

Jaramillo et al. (1994) zjišťovali kompetenci *Lu. gomezi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis* a *Lu. hartmanni* pro *L. braziliensis* a *L. panamensis*. Experimentální infekce byly provedeny sáním směsi defibrinované králičí krve s promastigoty ($1 \cdot 10^6$ /ml) nebo s amastigoty ($2,5 \cdot 10^6$ /ml) a nebo sáním na lézích křečka infikovaným *L. braziliensis* nebo *L. panamensis*. Nasáté samice byly chovány při přibližně 26 °C. K pokusům byli použiti flebotomové chycení v přírodě, nebo jejich F1 generace. *Lutzomyia trapidoi* se projevila jako lepší vektor než *Lu. gomezi*. *Lutzomyia panamensis* a *Lu. hartmanni* se ukázaly být špatnými vektory.

Porovnání vývoje *L. braziliensis* a *L. amazonensis* v *Lu. migonei* provedli Nieves a Pimenta (2000). Flebotomové sáli směs myší krve a amastigotů ($2 \cdot 10^7$ /ml) přes kuřecí

membránu, nasáté samice byly chovány při teplotě 25 °C. Autoři pozorovali po celou dobu infekce nízký počet paramastigotů, haptomonády byly převládající formou u *L. braziliensis* od 7. dne infekce, u *L. amazonensis* od 6. dne. Nakažení flebotomové byli infekční pro křečky, přičemž u *L. braziliensis* byl přenos úspěšnější než u *L. amazonensis* (52 % oproti 11 % infikovaných). Autoři proto předpokládali, že *Lu. migonei* je lepším vektorem pro *L. braziliensis*.

Nieves a Pimenta navázali na předchozí práci v další studii s *L. braziliensis* a *L. amazonensis* v *Lu. migonei* (Petr Volf, osobní sdělení). Samice sály směs krve a amastigotů ($2 \cdot 10^7$ /ml) přes kuřecí membránu. Nasátí flebotomové byli chováni při teplotě 25 °C. Autoři pozorovali promastigoty *L. braziliensis*, kteří byli po celou dobu pozorování přichyceni k pyloru, při počátečních fázích kolonizace střeva byli promastigoti přichyceni v abdominálním mesenteronu u 77 % samic. Šestý den detekovali vazbu promastigotů v abdominálním a thorakálním mesenteronu u 50 % samic. Promastigoti *L. amazonensis* byli přichyceni k abdominálnímu mesenteronu u 81 % samic a k thorakálnímu mesenteronu u 48 % samic (Nieves a Pimenta, nepublikováno).

V jiném experimentu Nieves a Pimenta (2002) porovnávali vývoj *L. braziliensis* a *L. amazonensis* v *Lu. migonei* sáte na různých druzích obratlovčí krve. *Leishmania braziliensis* byla pozorována v pyloru, abdominálním a thorakálním mesenteronu, přičemž od 3. do 10. dne autoři pozorovali úbytek parazitů v pyloru a jejich nárůst ve thorakálním mesenteronu. Podle mého názoru tento úbytek souvisí s anteriorní migrací parazitů. Míra kolonizace ostatních částí zadního střeva a malpigických trubic byla nízká. Naproti tomu *L. amazonensis* zpravidla pylorus nekolonizovala. U obou druhů autoři zaznamenali nejnížší mortalitu leishmanií v samicích sátých na kuřecí krvi, střední v samicích sátých na lidské krvi. Nejvyšší mortalitu *L. amazonensis* pozorovali u samic sátých na psí krvi, nejvyšší mortalitu *L. braziliensis* u samic sátých na myší krvi.

Experimentální infekci *L. guyanensis* v *Lu. longipalpis* provedli Barbosa et al. (2006). Pozorovali ukázkový peripylární vývoj – přichycení parazitů v pyloru, ileu a rektální ampuli a následnou anteriorní migraci a kolonizaci stomodeální valvy.

7 Lipofosfoglykan leishmanií

Lipofosfoglykan (LPG) je jednou z nejvíce prozkoumaných povrchových molekul leishmanií. Je přítomen na povrchu promastigotních stadií uvnitř přenašeče, kde hraje hlavní roli v interakci parazit – vektor a má zásadní vliv na způsob vývoje leishmanií v přenašeči. Proto jsem se rozhodla věnovat této molekule samostatnou kapitulu.

V minulosti se lipofosfoglykanu přisuzovaly dvě funkce: ochrana parazita před hydrolytickými proteázami při počátečních fázích infekce (Schlein et al., 1990) a přichycení k mesenteronu přenašeče, jenž zabrání vyloučení parazita během defekace (Pimenta et al., 1992). Později se ukázalo, že tyto funkce se uplatňují jen v určitých momentech infekce (Sacks et al., 2000) nebo jen v některých přenašečích (Myskova et al., 2007).

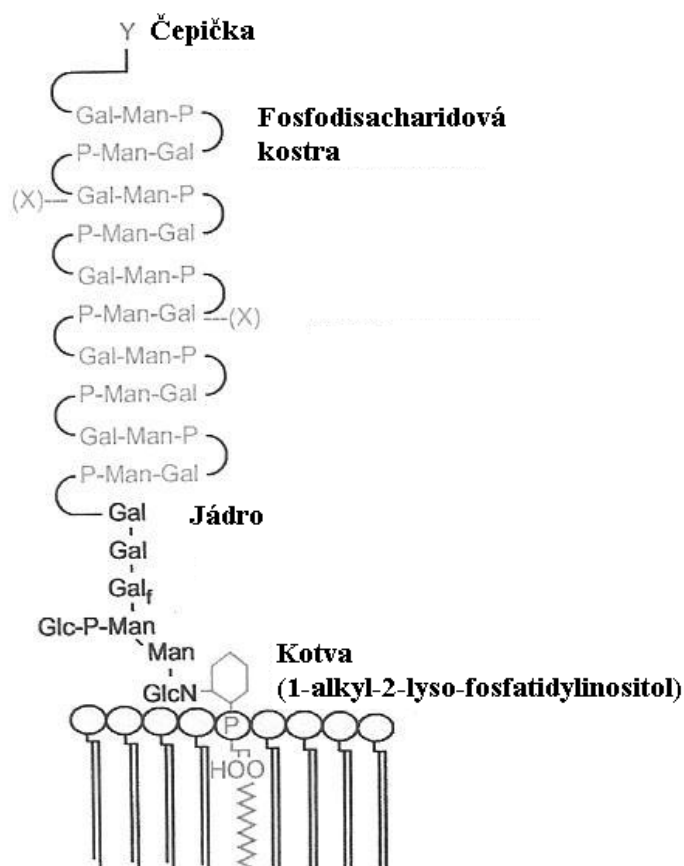
Lipofosfoglykan je lokalizován na celém povrchu promastigotních stadií včetně bičíku. Skládá se ze čtyř základních domén (Turco a Descoteaux 1992):

1. fosfatidylinositolové kotvy
2. fosfodisacharidové kostry z opakujících se jednotek (-Gal-Man-PO₄-)
3. jádra – fosforylovaného hexasacharidu spojujícího kotvu s kostrou
4. oligosacharidové čepičky

Fosfatidylinositolová kotva, jádro a fosfodisacharidová kostra jsou konzervované struktury. Naopak čepička a substituce na galaktóze fosfodisacharidové kostry jsou co do skladby a uspořádání cukrů variabilní (Turco a Descoteaux, 1992), viz obr. 5.

LPG je inter- i intraspecificky velmi polymorfní. Tento jev je velmi dobře prozkoumán u podrodu *Leishmania*. U *L. tropica* je většina LPG substituována více než devatenácti různými glykanovými postranními řetězci, přičemž všechny tyto řetězce obsahují hlavně arabinózu a glukózu, *L. aethiopica* má opakující se lipofosfoglykanové podjednotky substituované částečně (35 %) manózou (McConville et al., 1995). *Leishmania major* má ve struktuře vysoce substituovaného LPG terminálně umístěné galaktózové zbytky (McConville et al., 1990). Lipofosfoglykan *L. mexicana* je částečně substituován glukózou (Ilg et al., 1992), *L. chagasi* má LPG substituován též glukózou (Soares et al., 2002), viz obr. 6.

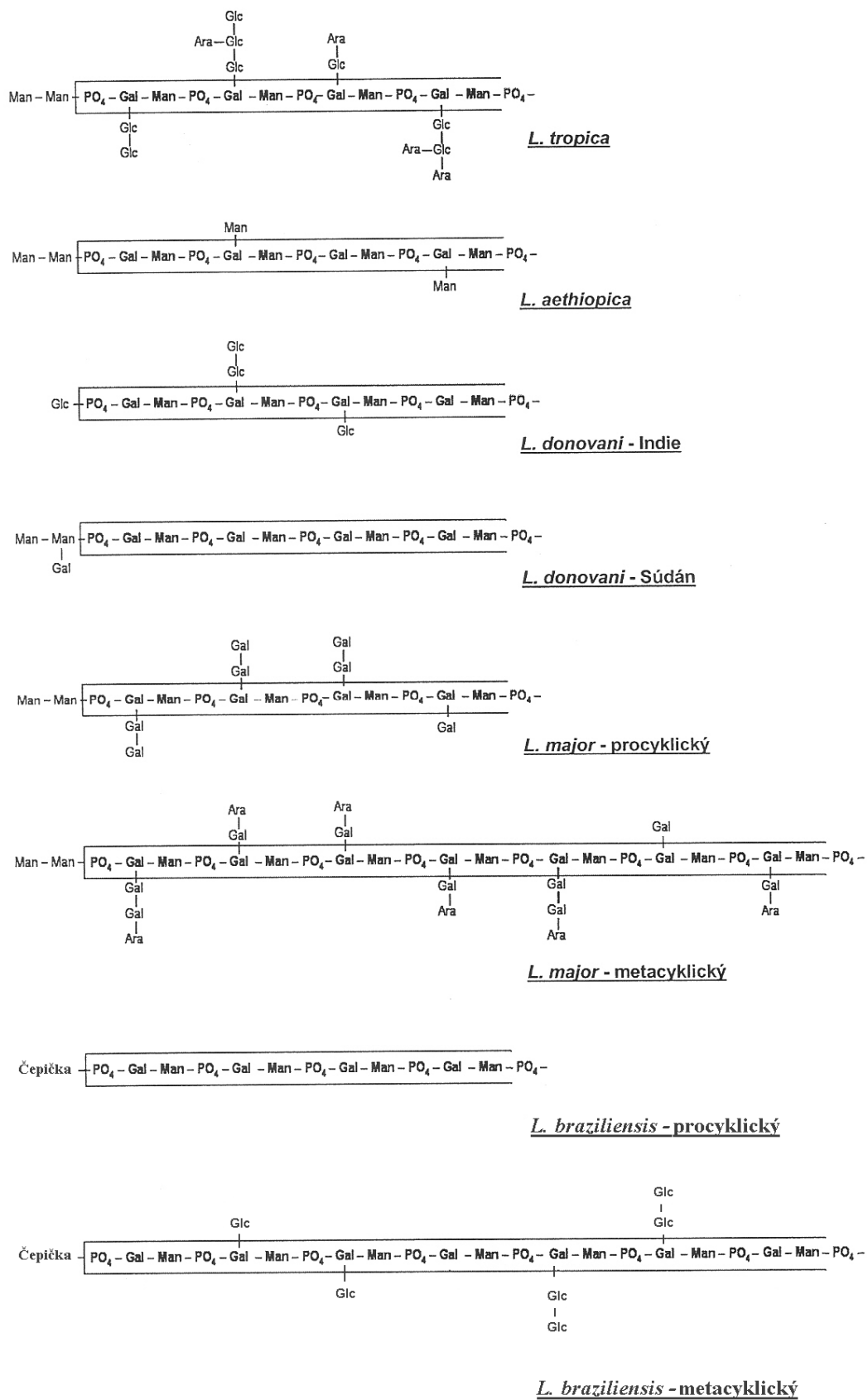
Mezi druhy se zjištěným vnitrodruhovým polymorfismem patří *L. major* (McConville et al., 1995), *L. donovani* (Mahoney et al., 1999) a *L. tropica* (Soares et al., 2004, Svobodova et al., 2006). McConville et al. (1995) zjistili, že lipofosfoglykan *L. major* z Izraele je vysoce substituován galaktózou, zatímco LPG *L. major* z Keni nemá téměř žádné substituce (méně



Obr. 5: Schematické znázornění struktury lipofosfoglykanu. Y– čepička, X – druhově variabilní cukerné substituce (podle Turco et al., 2001, upraveno).

než 5 %). Zatímco *L. donovani* ze Súdánu nemá žádné postranní řetězce, LPG indické *L. donovani* obsahuje postranní glukózové oligosacharidy (Mahoney et al., 1999), viz obr. 6. Podobně je na tom i *L. tropica*. Kmen izolovaný nedaleko Jeruzaléma, s typickou strukturou LPG s postranními řetězci složenými z galaktózy a arabinózy, se liší od dvou kmenů izolovaných v regionu Galilee na severu Izraele (Soares et al., 2004). Rozdílné složení postranních řetězců má zásadní vliv na vývoj infekce v přenašeči, jak prokázali Svobodova et al. (2006) u kmenů *L. tropica* na dvou místech severního Izraele vzdálených od sebe pouhých 10 kilometrů. V jižním ohnisku okolo města Tiberias byl hlavním vektorem *P. sergenti*. *Phlebotomus arabicus* se zde nevyskytoval, ale byl naopak v severním ohnisku okolo vesnice Amnun. Při experimentálních infekcích v *P. arabicus* se vyvíjely oba kmeny *L. tropica*, v *P. sergenti* pouze kmen z jižního ohniska, který měl typickou strukturu LPG.

Podle schopnosti přenášet různé druhy leishmanií, lze vektory rozdělit na specifické, (kteří umožňují dokončení vývoje pouze jednomu druhu leishmanií), a nespecifické, nebo-li permissivní schopné přenášet více druhů leishmanií (Volf a Myskova, 2007). V prvním



Obr. 6: Schematické znázornění druhově a stadiálně variabilních částí LPG (podle Myšková, 2007, upraveno).

případě můžeme hovořit o těsné koevoluci mezi parazitem a jeho vektorem (Killick-Kendrick, 1985). Jako příklad specifického přenosu může sloužit interakce *L. major* – *P. papatasi* (Pimenta et al., 1994) nebo *L. tropica* – *P. sergenti* (Kamhawi et al., 2000). Jako zástupce permissivních vektorů lze jmenovat například *Lu. longipalpis* (Myskova et al., 2007), *P. halepensis* (Sadlova et al., 2003), *P. arabicus* (Svobodova et al., 2006) a *P. argentipes* (Pimenta et al., 1994).

Zajímavý pokus provedli Warburg et al. (1989), kteří zjišťovali schopnost vazby bičíku *L. major* a *L. panamensis* k mesenteronu *P. papatasi* in vitro. Oba druhy vykazovaly vysoký stupeň specifity k epitelium mesenteronu, což je překvapivé vzhledem k tomu, že *P. papatasi* je specifickým přenašečem *L. major* a ostatní druhy leishmanií v něm nedokončí vývoj.

Dříve se předpokládalo, že LPG je klíčový pro přichycení parazita ve střevě u různých druhů flebotomů (Sacks et al., 2000). Nyní je známo, že LPG je nepostradatelný jen ve specifickém přenašeči (Myskova et al., 2007). U *P. papatasi* je znám receptor pro LPG, touto molekulou je PpGalec. PpGalec je lektin vázající glykoproteiny obsahující β -galaktózu, lipofosfoglykan *L. major* je vysoce substituován terminálně vystavenými galaktózovými zbytky (Kamhawi et al., 2004). Naopak v permissivních přenašečích (*Lu. longipalpis*, *P. halepensis*, *P. arabicus*, *P. perniciosus*, *P. argentipes*) se uplatňuje jiný mechanismus (Volf a Myskova, 2007). U všech zmíněných permissivních vektorů jsou ve střevě přítomny glykoproteiny obsahující N-acetylgalaktosamin (GalNac). Tyto glykoproteiny jsou lokalizovány na mikrovilárním povrchu střeva a in-vitro se vážou na povrch leishmanií. Jedná se pravděpodobně o interakci parazitárního lektinového receptoru a glykoproteinů obsahujících GalNac. (Myskova et al., 2007).

Roli LPG v přenašeči potvrdily i pokusy s leishmaniemi, které jsou přirozenými hybridy *L. major/L. infantum*. *Leishmania major* je přenášena *P. papatasi*, zatímco *L. infantum* má jiné přenašeče, například *Lu. longipalpis*. Ukázalo se, že hybridy, způsobující u HIV pozitivních pacientů viscerální formu onemocnění, exprimují LPG typu *L. major* a jsou schopni vývoje ve specifickém přenašeči *P. papatasi* (Volf et al., 2007).

Struktura LPG v promastigotních stádiích není po celý vývojový cyklus v přenašeči stejná. Změna nastává během transformace do infekčních metacyklických promastigotních stádií, takzvané metacyklogenezi. Změna složení a struktury LPG je preadaptací metacyklických stádií na infekci v obratlovci, kde se silná vrstva LPG uplatňuje zřejmě jako ochrana parazita před komplementem hostitele. U *L. major* se při tomto procesu zvyšuje počet

Man-Gal disacharidů kostry ze 14 na 30. Navíc dochází k relativnímu poklesu množství postranních řetězců zakončených galaktózou a naopak ke zvýšení počtu podjednotek zakončených arabinózou (McConville et al., 1992), viz obr. 6. Pimenta et al. (1992) předpokládají, že substituce nebo skrytí galaktózy arabinózou u *L. major* vysvětluje ztrátu schopnosti metacyklických promastigotů vázat se na střevo vektora. Při metacyklogenezi *L. donovani* také dochází k prodlužování nesubstituované fosfodisacharidové kostry (Sacks et al., 1995), kmen *L. donovani* z Indie navíc přitom ztrácí glukózové substituce přítomné na kostře LPG u procyklických stádiích (Mahoney et al., 1999). Prodloužení lipofosfoglykanového řetězce a snížení množství postranních glukózových substitucí bylo pozorováno i u *L. chagasi* (Soares et al., 2002).

Odlišný mechanismus změny LPG při metacyklogenezi byl zjištěn u podrodu *Viannia*, konkrétně u druhu *L. braziliensis* (Soares et al., 2005). Opět se prodlužuje fosfodisacharidová kostra, pozoruhodný je ovšem fakt, že se též tvoří postranní řetězce. Ačkoli procyklické promastigoti *L. braziliensis* mají LPG bez postranních cukerných řetězců, podobně jako súdánský kmen *L. donovani*, u metacyklických promastigotů je kostra substituována glukózou (Soares et al., 2005), viz obr. 6.

8 Závěr

Při vyhledávání a zpracovávání studií, které se zabývají leishmaniami, jsem zjistila, že vývoji podrodu *Viannia* v přenašeči nebyla věnována zdaleka taková pozornost jako podrodu *Leishmania*. Zůstává zde proto hodně nezodpovězených otázek.

Z uvedených studií je zřejmé, že podrody *Viannia* a *Leishmania* se ve vývoji v přenašeči zásadně liší především v kolonizaci proctodea a v mechanismu udržení se ve střevě během defekace. Zatímco podrod *Viannia* se přichycuje pomocí hemidesmosomů v anteriorních oblastech zadního střeva, především v pyloru, podrod *Leishmania* se v okamžiku defekace přichycuje pouze v mesenteronu pomocí vkládání bičků mezi mikrovilli.

Při porovnání výsledků získaných studiem podrodu *Viannia* je patrné, že se jednotlivá pozorování od sebe liší počtem dělicích se forem a místem jejich dělení. Neshody jsou i v popisu kolonizace proctodea. Někteří autoři uvádí výskyt stádií v celé délce proctodea, jiní jen v oblasti pyloru a ilea, v některých studiích byla infekce pozorována pouze v pyloru. To může být způsobeno například rozdílnou velikostí infekční dávky a druhem leishmanie a vektora. Otázkou nadále zůstává, zda se podrod *Viannia* během své anteriorní migrace přichytává ke stěně mesenteronu. Tento jev byl pozorován pouze v některých studiích (Nieves a Pimenta; Petr Volf, osobní sdělení).

U většiny zástupců podrodu *Viannia* doposud neznáme strukturu LPG. Této problematice bylo věnováno pouze několik prací (Musculus et al., 1997), přičemž na detailní strukturu LPG byla zaměřena pouze jedna studie na *L. braziliensis* (Soares et al., 2005). Prostudování složení LPG u dalších druhů podrodu *Viannia* by mohlo pomoci lépe pochopit mechanismy vývoje a chování peripylárních leishmanií uvnitř trávicího traktu svého přenašeče.

Ve své diplomové práci bych mimo jiné chtěla pomocí metod optické a elektronové mikroskopie odpovědět na otázku, zda se *L. braziliensis* a *L. peruviana* přichytávají k mesenteronu svého přenašeče. Dále bych chtěla experimentálně vyzkoušet, jaký vliv má na vývoj těchto leishmanií v přenašeči teplota. Různí autoři doposud dělali pokusy za rozdílných teplot a my z našich předběžných pokusů víme, že teplota je pro vývoj leishmanií v přenašeči velmi důležitá.

9 Seznam použité literatury

- 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 cytochrome *b* gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121: 352-361
- 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
- Elnaiem, D. A., Ward, R. D., Young, P. E. (1992).** An ultrastructural study on the early development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in its vector *Lutzomyia longipalpis*. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 67: 3-8
- 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
- Jaramilo, C., Travi, B. L. and Montoya, J. (1994).** Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, 8: 1-7
- Jacobs-Lorena, M., Lemos, F. J. A. (2002).** *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 517-523
- Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F. P., Rowton, E. and Sacks, D. L. (2000).** The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, 121: 25-33
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L. and Valenzuela, J. G. (2004).** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119: 329-341
- 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. (1985).** Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their Phlebotomine vectors. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, 78: 747-755
- 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. 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
- Lawyer, P. G. and Perkins, P. V. (2004).** Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In: *Medical entomology*, ed: Eldridge, B. F. and Edman, J. D., Kluwer Academic Publishers, p. 231-298
- Lawyer, P. G., Ngumbi, P. M., Anjili, Ch. O., Odongo, S. O., Membrahtu, Y. B., Githure, J. I., Koech, D. K. and Roberts, C. R. (1990).** Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus dubosqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 31-43
- Lawyer, P. G., Young, D. G., Butler, J. F. and Akin, D. E. (1987).** Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 24: 347-355

- Lehane, M. J. (1997).** Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42: 525-550
- 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
- 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
- Myšková, J. (2007).** Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. p. 1-53
- 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
- Pascoa, V., Oliveira, P. L., Dansa-Petretski, M., Silva, J. R., Alvarenga, P. H., Pimenta, P. F. P, 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J. (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., Hájmová, M. and Volf, P. (2003).** *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. Medical and Veterinary Entomology, 17: 1-7
- 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
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. and Shlomai, J. (1991).** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 245: 121-126
- 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
- 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
- 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
- Turco, S. J., Späth, G. F. and Beverley, S. M. (2001).** Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, 17: 223-226
- Volf, P. and Myskova, J. (2007).** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23: 91-92

- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., Campino, L., Ravel, Ch. (2007).** Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*, 37: 589-593
- 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
- 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. (1989b).** 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., Modi, G. B., Chaplin, G. L. and Tesh, R.B. (1989a).** Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 295-317
- 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., Hamada, G. S., Schlein, Y. and Shire, D. (1986).** Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72: 423-431
- 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