

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra parazitologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Kateřina Kvapilová

Sexuální rozmnožování řádu Trypanosomatida

Sex in Trypanosomatids

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím citované literatury.

V Praze, dne 27. 7. 2010

.....

Kateřina Kvapilová

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu profesorovi Petru Volfovi za odborné vedení, čas a trpělivost. Dále děkuji laboratornímu týmu za ochotu pomoci, zejména pak Veronice Šeblové za pomoc při získávání prvních zkušeností v laboratoři.

Abstrakt

Rody *Leishmania* a *Trypanosoma* jsou původci vážných lidských onemocnění: leishmaniózy a trypanosomózy. Dlouhá léta nebyly u těchto parazitů nalezeny přesvědčivé důkazy o genetické výměně, a proto byly rody *Trypanosoma* a *Leishmania* považovány za klonálně se rozmnožující, a to binárním štěpením jako většina prvoků. Výzkum ztěžovaly i skutečnosti, že pohlavní dimorfismus není patrný a chromosomy nekondenzují, tudíž nejsou viditelné. Nicméně klonální model začaly zpochybňovat pozorování přirozeně se vyskytujících hybridních druhů. Nejdříve byla existence sexu popsána u trypanosom a to prvním přímým důkazem hybridů *T. brucei*, získaných po společném přenosu rodičů mouchou tsetse. U leishmanii byl důkaz poskytnut na základě dvojité rezistentních hybridů a sexuální výměna podstupovala stejný meiotický proces jako *T. brucei*. Byli pozorováni přirozeně se vyskytující hybridy Nového i Starého světa jak u rodu *Viannia*, tak i u rodu *Leishmania*. Otázkou dalších výzkumů bylo, jaký je mechanismus genetické výměny, ale odpověď dodnes není jasná.

Klíčová slova: genetická výměna, *Trypanosoma*, *Leishmania*, klonalita, meióza, GFP, přenašeč

Abstract

Genera *Leishmania* and *Trypanosoma* are agents of serious human diseases: leishmaniasis and trypanosomózy. For many years these parasites were considered clone-replicating by binary fission as the most protozoa, because there have not been found any convincing evidence of genetic exchange in *Trypanosoma* and *Leishmania*. The research was further impeded the fact that sexual dimorphism of those two generas is not evident and chromosomes do not condensate, therefore are not visible. However, the clonal model started to question the observations of naturally occurring hybrid species. First, the existence of sex reported in trypanosomes by the first direct evidence of *T. brucei* hybrids obtained after transfer of the common parent by tsetse fly. In *Leishmania*, the evidence provided by double-resistant hybrids and sexual meiotic exchange underwent the same process as *T. brucei*. Naturally occurring hybrids in the New and Old World as in the genus *Viannia* and *Leishmania* species have been also observed. The question of the further researches was, what is the mechanism of genetic exchange. The answer is still not clear.

Keywords: genetic exchange, *Trypanosoma*, *Leishmania*, clonality, meiosis, GFP, vector

Obsah

1. Úvod	5
2. Význam sexuální reprodukce	7
3. Sexuální rozmnožování leishmanií	8
4. Důkazy hybridů leishmanií Nového světa	9
5. Důkazy hybridů leishmanií Starého světa	10
6. Sexuální rozmnožování u <i>Trypanosoma brucei</i> a dalších afrických trypanosom	12
7. Sexuální rozmnožování u <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
8. Závěr	21
9. Citace	22

1. Úvod

Do řádu Trypanosomatida náleží výhradně parazitičtí bičíkovci s jedním bičíkem, patřící do třídy Kinetoplastea a kmene Euglenozoa. Trypanosomatidi jsou široce rozšíření paraziti a mnoho z nich je nebezpečnými zvířecími i lidskými patogeny, kteří se nejčastěji vyskytují v tropech a subtropích Starého i Nového světa. Z hlediska medicíny obsahuje tento řád důležitý rod *Leishmania* a *Trypanosoma*, spadající do dvouhostitelských trypanosomatid, jejichž vývojový cyklus se odehrává v bezobratlém přenašeči a obratlovčím hostiteli.

Přenašečem rodu *Leishmania* jsou flebotomové (Diptera: Psychodidae) rod *Phlebotomus* ve Starém světě a rod *Lutzomyia* v Novém světě. *Leishmanie* se množí v makrofázích savce jako amastigotní stádia, a v lumen střeva flebotoma jako volní nebo přichycení promastigoti. *Leishmanie* způsobují onemocnění (leishmaniózy) kožní (*L. tropica*, *L. major*, Starý svět), kožně-slizniční (*L. viannia braziliensis*, Nový svět) a viscerální (komplex *L. donovani*, Nový i Starý svět).

Přenašeči rodu *Trypanosoma* jsou dvoukřídlí (Diptera) a ploštice (*Heteroptera*), ve kterých se parazit množí i diferencuje až v metacyklická stádia, která napadají hostitele. Přenáší se sterkorárním (výkaly) nebo salivárním (slinami) způsobem. Sterkorární trypanosomou je *T. cruzi*, jejíž vývoj končí v zádni části trávicí soustavy ploštice podčeledi *Triatominae*. Metacykličtí trypomastigoti vnikají do buněk hostitele a následně se tam množí jako amastigotní stádia způsobující americkou trypanosomózu. Vývoj salivárních druhů je ale ukončen v přední části trávicí soustavy a přenos metacyklických trypomastigotů je tedy inokulativní, a to při sání krve na hostiteli, ve kterém se paraziti množí jako trypomastigoti. Zástupcem je například *T. brucei*, a její poddruhy: zvířecí parazit *T. b. brucei*, původce Nagany; *T. b. rhodesiense*, způsobující u lidí akutní spavou nemoc končící bez léčení smrtí do pár týdnů; a *T. b. gambiense*, jako původce chronické spavé nemoci, která probíhá i několik let.

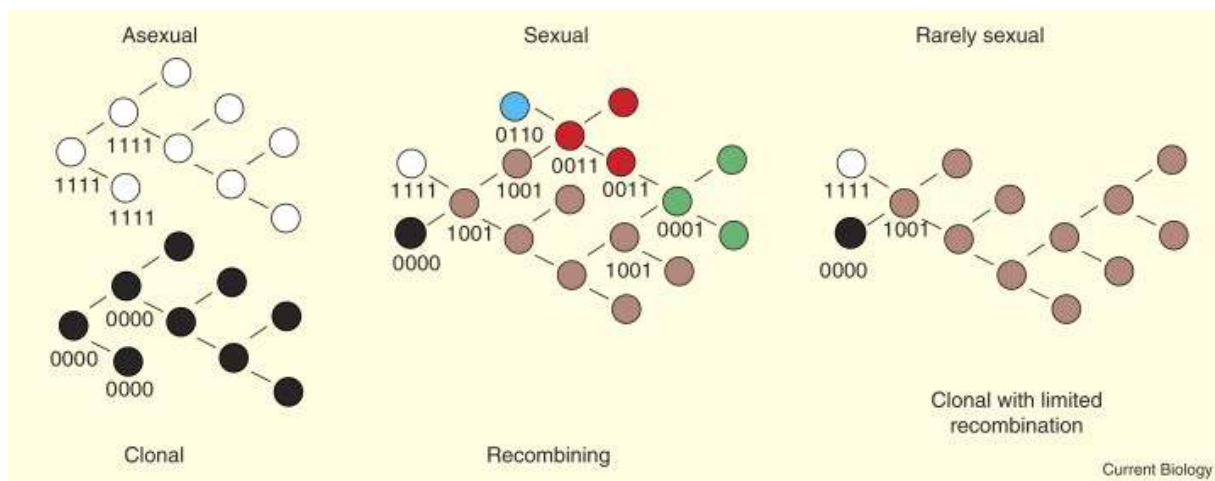
Nejběžnější formou rozmnožování prvoků je obecně nepohlavní způsob, a to binární rozdělení buňky na dva většinou stejné jedince, buď podélně (bičíkovci) nebo příčně (nálevníci). V případě kmene Apikomplexa je úspěšné mnohobuněčné dělení, jehož výsledkem je velký počet jedinců, schopných zaplavit hostitele. Na počátku 20. století si někteří mysleli, že sexuální rekombinace je nepotřebná, protože asexuální mechanismus dostatečně efektivně poskytuje množství genotypů pro optimální fitness parazita. Prvoci se ale rozmnožují i pohlavně. Základním znakem pohlavního rozmnožování je kombinace genetického materiálu jader buněk různých jedinců. Je také spojeno s redukcí počtu

chromozomů, čehož se dosahuje meiósou, u diploidních organismů, za vzniku haploidních jader a následnou fúzí v diploidní zygotu. U některých prvoků, například Euglenozoa, nebylo sexuální rozmnožování dlouho pozorováno.

Cílem mé bakalářské práce je proto shrnutí dosavadních poznatků a hypotéz o sexuálním rozmnožování řádu Trypanosomatida.

2. Význam sexuální reprodukce

Evoluce je řízena mutacemi, sexuální reprodukcí, rekombinací a přírodní selekcí (Goddard a kol. 2005). Vznik a existence sexu proto patří k často zkoumaným otázkám evoluční biologie. Sex může mít malý důsledek pro klonální parazity v ideálním prostředí, kde jejich růst je exponenciální. Jakmile ale začnou být podmínky stresující, může sex vést k přežití a navíc k rozpínavosti (Heitman 2006). Mnoho moderních teorií o výhodách sexu do svých vysvětlení zahrnují myšlenku navrhovanou již před více než sto lety Weismannem: sex zefektivňuje přirozenou selekci, jelikož zvyšuje genetickou variabilitu. Naproti tomu v nově vytvořeném prostředí, kde je malá selekce, nemá znatelný efekt na fitness organismů (Goddard a kol. 2005). Autoři věří, že sexuální rekombinace hraje hlavní roli v inovaci a adaptivní evoluci, a nese dvě výhody (*Obr. 1*). Jednou z nich je míšení genů, bez něhož je adaptivní evoluce omezena na kumulaci příznivých mutací. Druhou výhodou jsou opravy DNA, kdy u diploidního organismu může DNA jednoho haplotypu sloužit jako templát pro opravu DNA druhého haplotypu (Ayala 1998). Genetická rekombinace umožňuje adaptaci na nové ekologické niky, vektory a hostitele. Sex však může přinášet i nevýhody. Sex může například přerušit koadaptivní kombinaci genů, která byla výhodná u rodičů. Na potomka se také přenáší jen půlku genů z každého rodiče (Victoir and Dujardin 2002).



Obr. 1. Asexuální, sexuální, a omezená sexuální reprodukce. Asexuální model reprodukce podporuje vznik populace klonálních struktur. Sexuální model reprodukce umožňuje rekombinaci. Řada patogenů vykazuje klonální populace s omezenou rekombinací. Sexuální reprodukce je tedy zachována ale jen v omezené míře (Heitman 2006).

3. Sexuální rozmnožování leishmanií

Od dob objevení těchto škodlivých organismů se vedly debaty, zdali se leishmanie rozmnožují pouze klonálně či zda jsou schopny genetické rekombinace. Ještě donedávna nebylo prokázáno, že genetická výměna je základním mechanismem rozsáhlé diversity leishmanií. Myslelo se, že ji způsobuje postupná akumulace rozdílných mutací. Poslední dobou jsou opakovaně prokazováni mezidruhová a vnitrodruhová hybridy. Nejspíše vznikli nedávnou genetickou rekombinační událostí, ačkoli se dlouho předpokládalo, že leishmanie mají klonální model reprodukce (Lukes a kol. 2007).

Obecnou teorii klonálního rozmnožování parazitických protozoí navrhl Tibayrenc a kol. (1991). Na základě analýzy izoenzymatických dat z této teorie vyplývalo, že genetická výměna u rodu *Leishmania* v přírodních populacích nenastává vůbec nebo jen velmi zřídka. Tato vzácnost byla podporovaná analýzami isolátů leishmanií technikami MLEE (multi-locus enzyme electrophoresis) a RAPD (random amplified polymorphic DNA). Výsledky těchto analýz odhalily klonální propagaci podobně jako u jiných trypanosomatid. Navíc zaznamenané klony se jeví jako stabilní v čase i na velkých geografických oblastech.

Dvě základní konsekvence sexuální reprodukce jsou segregace a rekombinace. Pokud chybí, chybí i sex.

Zákon segregace říká, že dvě alely genového páru od sebe segregují do gamet, takže polovina gamet nese jednu alelu a druhá polovina gamet nese druhou alelu genového páru. Meiotická rekombinace - crossing over je pak proces, během kterého si dva homologní chromozómy spárované v profázi I meiózy vymění část své DNA. Výsledkem správně provedeného crossing-overu je výměna části alel mezi chromozómy - tj. narušení vazby genů. Důsledkem je značné zvýšení variability potomstva.

Tibayrenc a kol. (1991) uvádí, že hlavními kritérii klonality jsou: fixovaná heterozygotnost, rozšířené identické genotypy, absence rekombinantních genotypů, vazebná nerovnováha (nenáhodná asociace genotypů působících na odlišných lokusech) a vzájemný vztah dvou nezávislých sad genetických markerů. Na základě analýz též navrhli formální nomenklaturní systém pro pojmenování a identifikování geneticky charakterizovaných klonů. Rozdíly mezi klony mohou mít závažný dopad pro medicínu, protože geneticky odlišné klony se mohou lišit patogenními a dalšími biologickými vlastnostmi, například mohou různě reagovat na antibiotika a vakcíny. Proto charakterizace a pojmenování široce rozšířených a patogenních klonů je pro zdravotnictví významná.

V současnosti je již prokázáno, že i u leishmanii dochází k sexuálnímu rozmnožování. Akopyants a kol. (2009) poskytli důkaz o sexuální rekombinaci během vývoje *Leishmania major* v přenašeči *Phlebotomus papatasi*. Zjistili, že ve flebotomovi jsou leishmanie schopny podstoupit sexuální cyklus shodný s meiotickým procesem, který byl popsán u africké trypanosomy. Tento důkaz získali pomocí experimentu, ve kterém infikovali přirozeného vektora párem transgenních leishmanií, které byly rezistentní k rozdílným antibiotikům. Reisolací pak získali parazity rezistentní k oběma lékům. Leishmanie mohou tedy podstupovat genetickou výměnu během růstu a vývoje ve flebotomovi a mohou se přenášet ve formě hybridů do savčího hostitele. Výsledky analýzy 18 hybridních klonů dokázaly dědičnost nejméně jedné sady chromozomů od každého rodiče a dědičnost mitochondriální DNA (maxikroužku kDNA v kinetoplastu) od jednoho z rodičů. Dědičnost jaderné DNA zahrnuje Mendelovský model meiózy rodičovských druhů a fúzy haploidních buněk.

Nízká frekvence genetické výměny parentálních klonů v pokusu Akopyants a kol. (2009) se shoduje s obecnou představou, že k výměně musí docházet vzácně, neboť v přírodních populacích se často vyskytovala heterozygotnost a vazebná nerovnováha mezi alelami genů (Tibayrenc a kol. 1993). Genetická výměna je tedy rozhodujícím krokem k adaptaci na stresové prostředí. U leishmanií může takové prostředí stimulující genetickou výměnu představovat například střevo flebotoma, kde se parazité vyskytují jako promastigotní stádia.

4. Důkazy hybridů leishmanií Nového světa

Klonální představy o leishmaniích byly zpochybňovány i zprávami o přirozeně se vyskytujících hybridních druzích z Nového světa. Zde se kromě podrodu *Leishmania* vyskytuje i podrod *Viannia*, způsobující kožní (CL) a kožně-slizniční leishmaniózu (MCL), a který se dělí na *braziliensis* a *guyanensis komplex*. Nolder a kol. (2007) poskytli důkaz o vývoji a rozšíření *L. braziliensis/L. peruviana* hybridů v Peru a na základě výsledků zahrnuli tyto hybridy mezi potenciální původce MCL, jejichž hlavním původcem v Jižní Americe je *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *L. braziliensis* a *L. peruviana* se mohou vyskytovat sympatricky například ve východoandské nížině města Huanuco a právě z tohoto regionu Peru byli hybridy získáni (Dujardin a kol. 1995). Autoři popsali fenotypy (metodou MLEE, multi-locus enzyme electrophoresis) a genotypy (metodou MLMT, microsatellite multilocus typing) u 59 isolátů z oblasti Huanuco. Analýza isolátů ukazuje pozoruhodnou diverzitu. Autoři překvapivě našli 4 fenotypy a 7 mikrosatelitních genotypů mezi

L. braziliensis/L. peruviana hybridy. To by mohl být důsledek výskytu více než jedné hybridizační události. Rozhodně je velmi nepravděpodobné, že by genotypy mohly být vysvětleny mutacemi (Nolder a kol. 2007).

V jiném výzkumu byly zkoumány fenotypické a genotypické vlastnosti 40 isolátů leishmanií, tentokrát z pacientů z Nicaragui postižených leishmaniózami (Belli a kol. 1994). Vědci v této oblasti identifikovali tři rozdílné parazity, kteří jsou spojováni s kožními leishmaniózami: 16 isolátů *L. panamensis* (40% případů), 13 izolátů *L. braziliensis* (33% případů) a 11 izolátů hybridů *L. panamensis/L. braziliensis* (27% případů). Posledně jmenované izoláty vykazovaly heterozygotní enzymatické i DNA znaky svědčící o přirozeně se vyskytujících hybridech. Všichni domnělí hybridy byli získáni z endemického ohniska v horském regionu severní Nicaragui, kde se rodičovské druhy vyskytují sympatricky (Belli a kol. 1994). Zatím posledními objevenými hybridy Nového světa, byli *L. (Viannia) braziliensis/L. (V.) guyanensis* z Venezuely, způsobující kožní leishmaniózy, které jsou zde vážným zdravotním problémem (Delgado a kol. 1997).

5. Důkazy hybridů leishmanií Starého světa

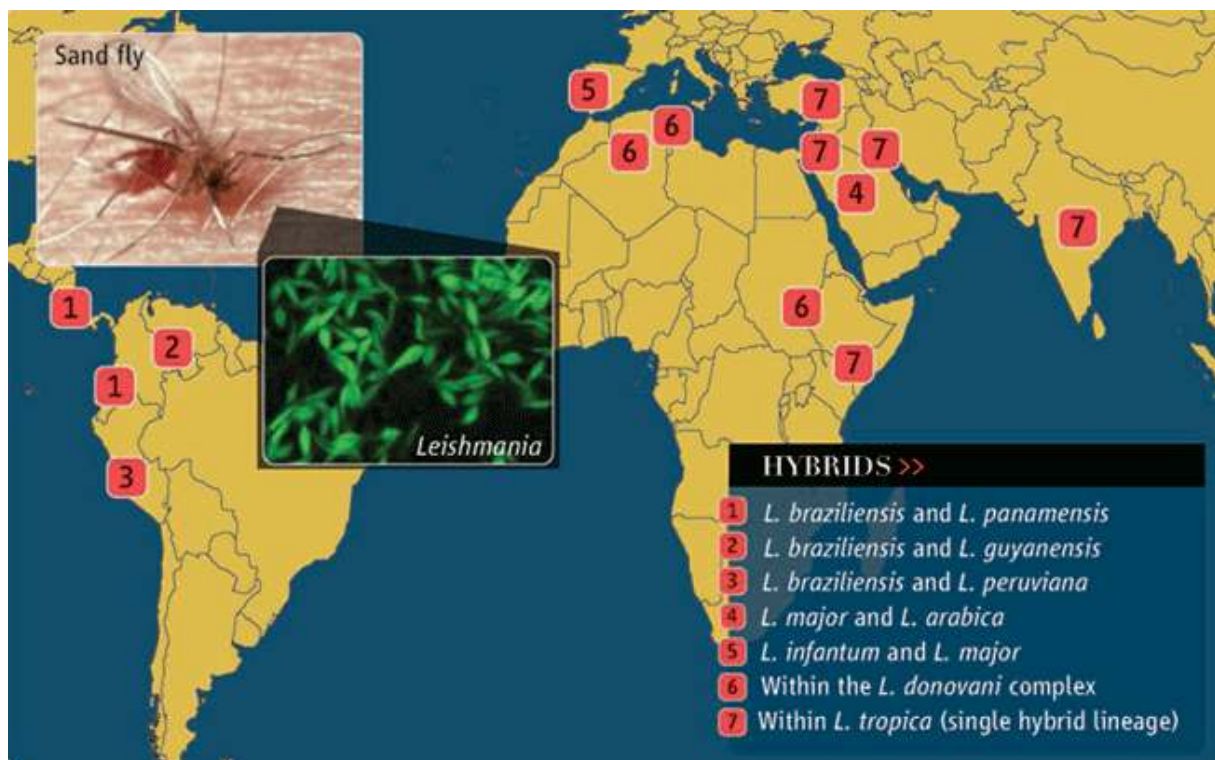
Ve Starém světě byli nejprve popsáni hybridy *L. major* a *L. arabica*, izolované z divokých zvířat v zoonóze kožních leishmanióz (Kelly a kol. 1991). Tyto dva druhy leishmanií žijí v oblasti oázy Al- Ahsa v Saudské Arábii sympatricky a jsou přenášeny vektorem *Phlebotomus papatasi* (Evans a kol. 1987). Izoenzymatické analýzy a molekulární karyotyp klonálních organismů signalizovaly, že domnělí hybridy mají vlastnosti jak *L. major* tak i *L. arabica*. Tyto důkazy silně podporovaly hypotézu, že se jedná o přirozeně se vyskytující hybridy *L. major* a *L. arabica*. Analýza kDNA minikroužků tuto hypotézu potvrdila. Mitochondriální kDNA se dědila jen od *L. major* kDNA nezávisle na jaderné dědičnosti, která vykazovala genotypické a fenotypické znaky obou druhů leishmanií (Kelly a kol. 1991).

Genetické analýzy prokázaly genetickou výměnu i mezi populací *L. tropica* na Středním východě (Schwenkenbecher a kol. 2006). Vysoká míra heterogenity *L. tropica* je zřejmě výsledkem mutací asociovaných snad i s genetickou výměnou (Pratlong a kol. 1991).

První zprávu o hybridech mezi dvěma velmi geneticky vzdálenými druhy leishmanií podali Ravel a kol. (2006), když popsali *L. infantum/L. major* hybridy. Tyto dva druhy se liší geografickou distribucí, rozdílnými přenašeči i savčími rezervoáry. Hybridy byli izolováni v Portugalsku z imunosuprimovaných HIV pozitivních pacientů. Molekulárními

a izoenzymatickými technikami byly získány výsledky které ukazují, že hybridi pravděpodobně obsahují kompletní genom obou rodičovských druhů.

Výskyt genetické výměny mezi těmito druhy byl překvapením, jelikož *L. infantum* se vyskytuje podél celé Středozevní pánve na vlhkých místech, zatímco *L. major* pouze v suchých oblastech (Ravel a kol. 2006). Experimentálními infekcemi flebotomů bylo prokázáno, že hybridi produkovali silné infekce ve *Phlebotomus papatasi*, který umožňuje vývoj jen *L. major*. Hybridy exprimovali lipofosfoglykan typu *L. major*, což jim umožnilo přichytit se na střevo *P. papatasi* a dobře se v něm vyvíjet. To dokazuje, že genetická výměna zvyšuje potenciál přenosu i fitness hybridu (Volf a kol. 2007).



Obr. 2. Mapování hybridů vyjadřuje geografickou distribuci mezidruhových a vnitrodruhových hybridů. Vložené obrázky: zelená fluorescence transgenních druhů *L. donovani* a vektor rodu *Leishmania*. Převzato z Miles a kol. (2009).

6. Sexuální rozmnožování u *Trypanosoma brucei* a dalších afrických trypanosom

Životní cyklus *Trypanosoma brucei* se odehrává v savčím hostiteli a krevsajícím hmyzím přenašeči, kterým je moucha tsetse. Tento vektor přijímá parazity spolu s potravou z krevního řečiště savce. Ve střevě mouchy se pak trypanosomy diferencují na procyklické trypomastigoty a epimastigoty, kteří poté putují až do slinných žláz, ve kterých se dále množí a transformují na metacyklické trypomastigoty infikující savce.

Dlouho se věřilo, že se trypanosomy rozmnožují pouze asexuálně a to binárním dělením (Tibayrenc a kol. 1990). Nepřímé důkazy o genetické výměně se objevily až v 80. letech. Analýzou izolátů z přírodních populací *T. brucei brucei* byl elektroforézou 19 enzymů získán silný důkaz o tom, že trypanosomy jsou diploidními organismy a podstupují náhodný sex a rekombinaci (Tait 1980). První přímý experimentální průkaz sexuální reprodukce u *T. brucei* pochází až z roku 1986. Jenni a kol. (1986) tehdy použili dva parentální klony, u nichž izoenzymatickou analýzou zjistili odlišnost v pěti enzimech: fosfoglucomutáse, isocitrát dehydrogenáse, alkalické fosfatáse, jablečném enzymu A a jablečném enzymu B. Tyto parentální klony byly navíc ve zmíněných enzimech homozygotní. Po smíšené infekci a po proběhnutí vývoje v mouše tsetse byly získány heterozygotní klony.

Analýza hybridních progenů odhalila tetraploidní obsah DNA, ačkoli rodiče byli diploidní. To vedlo k hypotéze, že genetická výměna zahrnuje jadernou fúzi a následně se vrací do diploidního stádia náhodnou eliminací DNA (Paindavoine a kol. 1986). Existuje však i jiná možnost a tou je individuální redukční dělení rodičovských jader, a následná fúze výsledných haploidních jader za vzniku zygoty, zatímco ostatní jádra jsou zničena. Chybný vznik haploidních jader může zapříčinit vznik nestabilních tetraploidů (Gibson 1989).

Hypotéza, že mechanismus genetické výměny zahrnuje meiósu a následkem je vznik diploidních progenů, byla podpořena následujícími třemi pokusy, u nichž došlo k segregaci a nové kombinaci genetických markerů. Tetraploidní potomstvo je v těchto případech považováno jen za neobvyklou menšinu (Gibson 1995).

V prvním pokusu byly *Trypanosoma brucei brucei* a *T. b. rhodesiense* společně přenesené mouchou tsetse. Výsledná populace nevykazovala na základě výsledků elektroforézy parentální karyotyp a deset izolovaných klonů z této populace mělo pět rozdílných rekombinantních genotypů, což dokazuje účast genetické výměny. Navíc většina klonů sdílela znaky obou rodičů a jejich genotypy se vzájemně shodovaly v segregaci

a vzniku nových kombinací rodičovských alel. Tito hybridy byli diploidní a zdělili parentální znaky na základě Mendelovského modelu (Gibson 1989). Ve druhém pokusu bylo analýzou na základě segregáčnických znaků v kDNA progenních klonů zjištěno, že potomci zdělily jeden nebo druhý rodičovský typ kDNA. To demonstruje výskyt segregace (Sternberg a kol. 1989). Jako třetí tuto hypotézu podporuje pokus, ve kterém byly izolované tři typy klonů z křížení *Trypanosoma brucei brucei* ze západní Afriky s *T. b. brucei* z východní Afriky. Dva z těchto izolovaných typů byly hybridy, kteří se od obou rodičů lišili molekulárním karyotypem. Oba molekulární karyotypy měly neparentální skupiny (Gibson a Garside 1991).

Hypotézu o účasti meiózy podporují i následující pozorování obsahu DNA hybridů. Analýza hybridů získaných experimentálním křížením *T. b. brucei* a *T. b. rhodesiense* ukázala 1,5 krát větší obsah DNA než obsah DNA rodičů, a isoenzymatická analýza a RFLP ukázaly tři alely několika lokusů pro housekeeping geny. To naznačilo, že jsou tyto hybridy triploidní a vědci tak předpokládají roli meiotického dělení (Gibson a kol. 1992). Větší počet těchto 3n hybridů byl získán po křížení rodičů rezistentních na rozdílné léky. Po přenosu rodičů vektorem byly hybridy selektovány dvojitou rezistencí vůči těmto lékům. Čtyři hybridní genotypy ukázaly vysokou frekvenci genetické rekombinace (zahrnující tubulinové lokusy), která je předpokládaným produktem meiotického dělení (Gibson a Bailey 1994). Důkazy byly poskytnuty i z pokusu zpětného křížení (sloužící k rozlišení homozygotních a heterozygotních jedinců) *Trypanosoma brucei*, ve kterém měly všechny hybridní klony obsah DNA 3n a ten byl stálý i v pozdějším růstu (Gibson a kol. 1995). Všechny klony analyzované doposud jednoznačně obsahují 2n nebo 3n obsah DNA. Přejídný obsah DNA, který by naznačoval náhodné ztráty chromosomů z tetraploidního předchůdce, nebyl zatím nalezen. Lze proto soudit vznik triploidních hybridů fúzí haploidního a diploidního jádra. A to by potvrdovalo nutné zahrnutí meiózy do mechanismu genetické výměny (Gibson a kol. 1997b).

Skutečností, že není možné epimastigoty a jiná stádia vyskytující se v přenašeči kultivovat in vitro a odolnost experimentálních vektorů vůči některým kmenům trypanosom byly velkou překážkou pro studování sexuálního rozmnožování. Lepší analýzu umožnil nový přístup za použití značení fluorescenčním proteinem (Green fluorescent Protein, GFP). Tento protein nevyžaduje žádný substrát pro aktivaci a může být vizualizován fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií. Bingle a kol. (2001) tento přístup postavili na základě systému indukujícím expresi tetracyklinu (Tet), přičemž transfekovali jeden rodičovský klon genem kodujícím GFP. Expresie tohoto proteinu byla pod kontrolou tetracyklinového (Tet) represoru. V případě, že by došlo k segregaci chromosomů nesoucích

GFP a represorové geny, měla by vymizet represe a hybrid by exprimoval GFP. Rodič transfekovaný GFP byl zároveň resistantní k hygromycinu. Po skřížení s druhým rodičovským klonem rezistentním ke geneticinu získali autoři ze slinných žláz fluorescentní hybridy s rezistencí k oběma látkám (Bingle a kol. 2001). Došlo tedy k segregaci a novému uspořádání alel a tento pokus je dalším důkazem o účasti meiózy. Při použití metody Bingle a kol. (2001) si však výzkumníci nemohou být jistí, že všechny fluorescentní trypanosomy jsou opravdu hybridy. Může totiž docházet ke spontánní fluorescenci, kvůli mutacím represoru.

Přes všechny důkazy o meióse nebylo haploidní stádium (případně sexuální stádium) životního cyklu trypanosom zatím demonstrováno. Výsledky mikrofluorometrického měření obsahu DNA sice ukázaly metacyklická stadia jako haploidní (Zampettibosseler a kol. 1986), avšak jiná měření toto vyvrátila. Cytofluorometrické měření buněk nebo jader metacyklických forem jednoznačně ukázalo, že metacyklické formy, nejsou produkty meiózy obsahující pouze poloviční množství DNA forem krevního řečiště v obratlovci. Naopak autoři došli k závěru, že jedná se o diploidní stadia. Zbývá proto určit, v jaké fázi životního cyklu parazita se vyskytují sexuální stadia (Kooy a kol. 1989).

Během genetické výměny stojí za pozornost dědičnost kinetoplastové DNA. Kinetoplast je tvořen množstvím kruhové DNA uvnitř jedné velké mitochondrie a je připojen k basálnímu tělu bičíku (Robinson a Gull 1991). Mitochondriální DNA tvoří maxikroužky (50-100 kusů) a velký počet minikroužků (několik tisíc kopií). Maxikroužky nesou běžné mitochondriální geny. Minikroužky kódují takzvanou „guide RNA“, která se účastí RNA editingu maxikroužků a řídí úpravu genů, které jsou kódovány maxikroužky (Shapiro a Englund 1995). Když byly tyto dva typy mitochondriální DNA studovány odděleně, došlo k následujícímu zjištění: maxikroužky DNA jsou děděné uniparentálně (od jednoho z rodičů) (Sternberg a kol. 1989). Síť minikroužků je u hybridů heterozygotní a dědí se tedy biparentálně. To naznačuje, že genetická výměna nezahrnuje pouze buněčnou fúzi ale i fúzi mitochondriální a kinetoplastovou (Gibson a Garside 1990). Vzhledem ke složitosti replikace navrhl Shapiro a kol. (1995) alternativu, a to výměnu minikroužků mezi dvěma rodiči během kontaktu při genetické výměně a ponechání si vlastních maxikroužků. Tato hypotéza byla vyvrácena v novém křížení *T. brucei brucei* a *T. b. rhodesiense* a to metodou hybridizace. Vědci touto metodou zaznamenali jednotlivé rodičovské minikroužky v kDNA hybridů. Analýzy tak ověřily původní zjištění, že síť minikroužků je hybridní, a i tato studie nasvědčuje tomu, že promíchávání rodičovských kDNA nastává ve velké míře. To může mít

vliv na efektivnější editing než mají jiné minikroužky, jelikož náhodné výměny minikroužků mezi sítěmi, mohou přinášet nové kombinace (Gibson a kol. 1997a).

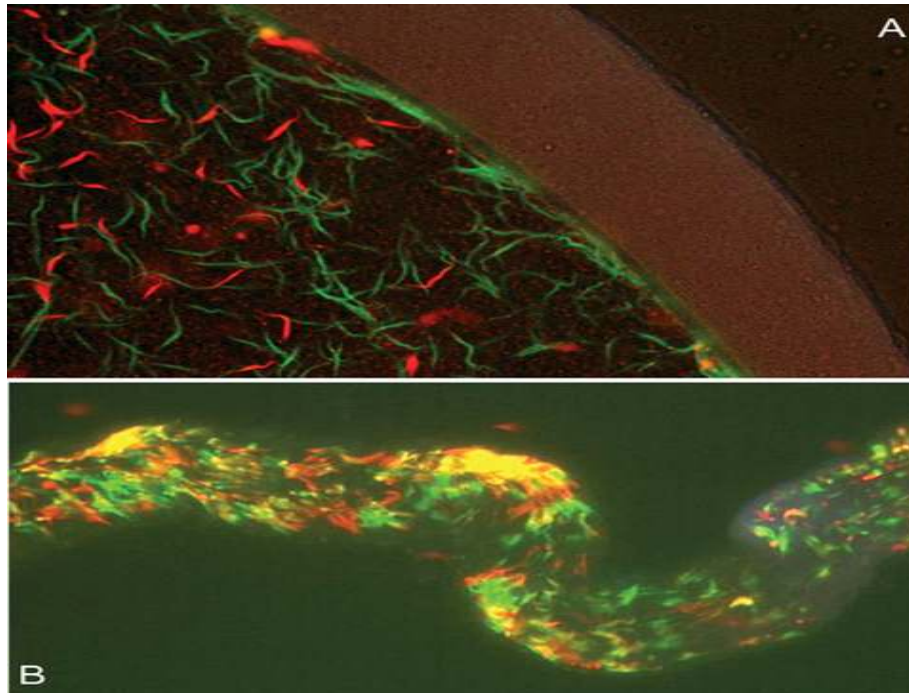
Přesný mechanismus sexuální reprodukce není však doposud znám. V podstatě byly navrženy dva modely. První model využil všech poznatků z experimentálních studií a navrhnul, že fúze rodičovských trypanosom je následovaná fúzí sítí kDNA. Tato událost může spustit meiotické dělení jádra, nebo naopak meióza může iniciovat fúzi trypanosom. Poté splynou dvě haploidní jádra (každé od jiného rodiče). Vzniklý heterokaryon se mitoticky dělí. Na konci vznikají hybridy, mající heterogenní jadernou DNA a heterogenní minikroužky kDNA, ale homogenní maxikroužky kDNA (Gibson 1995). Druhým návrhem je obecný model, při němž parentální buňky podstupují meiózu a produkují haploidní gamety, které následně splývají v diploidní rekombinantní progen.

V pozdějších letech se většina odborníků začala přiklánět spíše ke konvenčnímu modelu. MacLeod a kol. (2005) izolovali rozsáhlou sadu nezávislých progenních klonů ze dvou křížení: *T. b. brucei* x *T. b. brucei* a *T. b. brucei* x *T. b. gambiense* typu2. Následně vyhodnotili dědičnost mikrosatelitů a minisatelitů umístěných na rozdílných housekeeping chromozomech. Výsledky ukázaly nezávislou segregaci alel na rozdílných chromozomech a v závěru usoudili, že mechanismus páření by mohl s největší pravděpodobností zahrnovat produkci a fúzy haploidních buněk ve slinných žlázách. Výsledky poskytly tímto silný důkaz o genetickém systému jako o Mendelovském za účasti meiózy (MacLeod a kol. 2005).

Lepší pozorování umožnilo vyvinutí alternativní strategie, která spočívala v použití žlutě fluorescentních hybridů. Rodičovské klony transfekovali genem kódujícím GFP nebo RFP (Red Fluorescent Protein). Výsledkem ko-infekce těmito trypanosomami byla produkce žlutě fluorescentních hybridů (*Obr. 3*), kteří byli snadno viditelní ve slinných žlázách, kde se poprvé objevili 13. den po koinfekci. Byli nalezeni jen ve vektorech, mající červené i zelené trypanosomy zároveň, buď v jedné, nebo v obou slinných žlázách. Ve střevě tyto hybridy nalezeni nebyli, i přesto, že zde přenašeči měli smíšenou infekci. Jako hybridy byly žluté formy potvrzeny na základě molekulárního karyotypu a analýzou kinetoplastidové DNA. Nejpravděpodobnějšími kandidáty sexuálními stádii jsou krátká epimastigotní stádia a to brzy po vmigrování do slinných žláz. Přesto, že genetické markery se zdály být zděděné v souladu s Mendelovskými pravidly, našli se i polyploidní hybridy, kteří nejspíše vznikají z fúze neredukovaných gamet během meiózy (Gibson a kol. 2006, Gibson a kol. 2008).

Úspěšné páření trypanosom bude záviset na dynamice ko-infekce rozmanitými druhy a zejména na tom, zda bude docházet k mezidruhovým kompeticím. Tuto problematiku na dvou odlišných druzích trypanosom, mající buď červený fluorescenční protein (RFP) nebo

GFP, studoval Peacock a kol. (2007). Nepodařilo se jim však kompetici mezi druhy dokázat, místo toho zjistili hojnou koinfekci. Z pokusu tak usoudili, že nedostatek kompetice může mít výhodu, protože zvyšuje pravděpodobnost genetické výměny. Z těchto experimentů není ale jasné, zda mají druhy opravdu jinou strategii, nebo jsou schopni přisvojit si jinou strategii kvůli koinfekci. Dokonce výsledky experimentu naznačili spíše kooperaci místo kompetice (Peacock a kol. 2007).



Obr. 3. A) Červené a zelené trypanosomy ve střevě

B) Červené, zelené a žluté trypanosomy ve slinných žlázách dvacátý den infekce, Gibson a kol. (2006)

Na základě dosavadních křížení, ve kterých všechny poddruhy *T. brucei* vykazovaly kompatibilitu, se zdálo, že jedinou bariéru představuje intraklonální sexuální rozmnožování (mezi stejnými druhy klonů). Tento způsob páření nastával vzácně a byl zaznamenán pouze jako asociovaný s out-crossingem, to znamená, že k němu dochází pouze mezi směsí trypanosom, která prodělává interklonální páření. Výsledky vedly k hypotéze, že trypanosomy jsou schopné rozeznávat vlastní od nevlastních druhů a po setkání se s jiným druhem je meióza a/nebo fúze spuštěná uvolněním nějakého difúzního faktoru. Nicméně, i intraklonální sex byl během přenosu vektorem u *T. b. brucei* demonstrován (Gibson a kol. 1997b, Peacock a kol. 2009). Peacock a kol. (2009) použili metodu křížení červených a zelených

fluorescentních linií jednoho druhu, a rekombinanti, kteří nesli geny pro červenou i pro zelenou fluorescenci, svítili žlutě. Výsledky ukazují poměrně vysokou frekvenci produkce hybridních trypanosom po přenosu jednoho druhu trypanosomy přenašečem. Z 35 glossin, které infikovali slinné žlázy, neslo 9 z nich červené i zelené fluorescentní trypanosomy. U čtyř z nich byli nalezeni žlutě fluorescentní rekombinanti detekovali pak u čtyř vektorů, ze kterých nakonec dva nesly rekombinanty. Pozorování hojného počtu „žlutých trypanosom“ naznačilo, že produkce rekombinantů je vysoká i po přenosu jednoho druhu vektorem.

Navzdory jasně demonstrované existenci genetické výměny u *T. brucei*, zůstává přítomnost pohlavního rozmnožování u ostatních druhů afrických trypanosom sporná.

Trypanosoma congolense je obávaný parazit skotu přenášený mouchou tse-tse a způsobující zvířecí trypanosomózu Nagana. *T. congolense* neinfikuje slinné žlázy, čímž se významně biologicky liší od *T. brucei*, která se ve slinných žlázách pohlavně množí. Předpokládalo se tedy, že u *T. congolense* se nemnoží pohlavně.

Data získaná studiem isolátů *T. congolense* z geograficky odlišných oblastí pomocí druhově specifických polymorfních mikrosatelitů ukázala velký počet odlišných genotypů a nedostatek heterozygotů (Morrison a kol. 2009). Tyto výsledky nesouhlasí s dřívějšími studii využívajícími izoenzymatické markery a navrhuje klonální rozmnožování na základě fixované heterozygotnosti a přítomnosti identických genotypů (Tibayrenc a kol. 1990). Další analýzy pak identifikovaly čtyři geneticky odlišné subpopulace *T. congolense*. Vysoká diverzita pozorovaná v tomto pokusu je připisovaná mechanismu genetické výměny, který hojně nastává u jedné ze subpopulací vykazující vazebnou rovnováhu. Pro šíření rezistence na léky má tato skutečnost velký význam, jelikož rezistence *T. congolense* k lékům, jako je například Berenil, je v současnosti obrovským problémem (Delespau a kol. 2008, Morrisson a kol. 2009).

T. b. gambiense typ 1 je považována za hlavního původce chronické formy spavé nemoci v Západní a Centrální Africe. Pro studium byl tento parazit získán z pacientů v Demokratické republice Kongo. Studie nezaznamenaly u žádného lokusu vazebnou rovnováhu, což téměř zavrhuje možnost existence genetické výměny a potvrzuje tak *T. b. gambiense* typ 1 za klonální (Morrison a kol. 2008).

Trypanosoma vivax je dalším z druhů způsobujícím nemoc Nagana. Z hlediska rozmnožování se jí nevěnovalo příliš pozornosti. Struktura populace *T. vivax* získaná ze skotu v Gambii vykazovaly vazebnou nerovnováhu i nedostatek homozygotů, a analýzy tak svědčí pro klonální strukturu těchto populací (Duffy a kol. 2009).

Genetickou výměnu jsou schopné tedy podstoupit *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* typ 2 a *T. congolense*. Odlišné výsledky přinesla pozorování *T. b. gambiense* typ 1 a *T. vivax*.

7. Sexuální rozmnožování u *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi je původcem Chagasovy choroby způsobující vážné zdravotní problémy v Latinské Americe. Každý rok tato nemoc zapříčiní smrt 13 000 lidí (WHO, 2002). Jedná se o zoonózu přenášenou na člověka i ostatní savce infekčními výkaly krevsající ploštice rodu *Triatominae* (*Hemiptera: Reduviidae*). Infekce se může přenášet krevní transfúzí, transplacentárně z infekční matky, ale i kontaminovaným jídlem (de Freitas a kol. 2006).

Trypanosoma cruzi byla původně na základě výsledků populačně genetických analýz a pozorování vazebné nerovnováhy považována za organismus s klonální populační strukturou. Velká genetická variabilita *T. cruzi* byla připisovaná důsledku dlouhé oddělené evoluce klonů avšak to nevyklučovalo vzácnou rekombinaci (Tibayrenc a kol. 1986, Tibayrenc a Ayala 1988, Tibayrenc a kol. 1990).

Izoenzymatické studie potvrdily, že *T. cruzi* je diploidní organismus s mimořádně vysokou genetickou a fenotypickou heterogenitou, což naznačovaly i předchozí klinické studie prokazující odlišnosti v biologických vlastnostech trypanosom (Bogliolo a kol. 1986, Stothard a kol. 1999). Několik molekulárně fylogenetických analýz, odhalilo šest skupin kmenů nazývaných „discrete typing units“ (DTUs). DTUs byly rozdělené do dvou hlavních, vysoce heterogenních linií označených *T. cruzi* I a *T. cruzi* II (TcI a TcII). Tyto dvě linie jsou odlišné geograficky i ekologicky. V celém areálu rozšíření Chagasovy choroby kromě Paraguaje se vyskytovala linie TcI převažující v cyklech nákazy u divokých zvířat. Linie TcII převažuje v domestikovaných cyklech a byla dále rozdělena do pěti DTUs: TcIIa-e. Tyto „vedlejší linie“ jsou rozšířené různě: IIa se vyskytovala hlavně v USA, IIb-IIe nejvíce v jižní Americe (Tibayrenc 1993, Barnabe a kol. 2000, Brisse a kol. 2000).

Analýzou RFLP bylo porovnáváno 18 kmenů a klonů *T. cruzi* ze stejné oblasti a byly objeveny homozygotní (AA, BB) a odpovídající heterozygotní (AB) kmeny a klony. Tato první evidence hybridních genotypů ukázala, že na velké genetické diverzitě *T. cruzi* může mít podíl i vzácná genetická výměna (Bogliolo a kol. 1996).

Rekombinaci, jako důležitý důsledek pro evoluci populace *T. cruzi*, objasnili Machado a Ayala (2001), kteří fylogenetický testovali rozsáhlou nukleotidovou sekvenci z jaderných genů i část mitochondriálního genomu. Výsledkem byl nález hybridního jaderného genomu u dvou izoenzymů, demonstrace introgrese (vnesení genu jednoho druhu do genomu druhého druhu) mitochondriálního haploidního genotypu mezi vzdáleně si příbuznými liniemi *T. cruzi* a důkaz genetické výměny mezi blízkce si příbuznými liniemi *T. cruzi*. Podobné výsledky, které neodpovídaly představě pouze klonálního rozmnožování, získal Brisse a kol. (2003) analýzou šesti kmenů *T. cruzi*. U těchto kmenů srovnával fylogenezi genů. Získaná sekvenční data, konkrétně oblast promotoru jaderné ribozomální RNA a gen pro cytochrom *b* (CYb), potvrdila přirozenou existenci hybridních linií TcIIa a TcIIe, u nichž byl navržen vznik rekombinací mezi liniemi TcIIb a TcIIc na základě nesouhlasných výsledků z MLEE a RAPD. To potvrdil i RAPD profil linií TcIIa a TcIIe, který částečně odpovídal profilům linií TcIIb a TcIIc. Sekvence CYb linie TcIIe byly velmi podobné sekvencím linie TcIIc, ale sekvence promotoru rRNA byly zase podobné linii TcIIb. Kmen linie TcIIa měl heterozygotní sekvence promotoru rRNA získané od linie TcIIb i TcIIc (Brisse a kol. 2000a, Brisse a kol. 2003).

Brisse a kol. (2003) studiem chromozomů výše zmíněných linií zjistili, že délky chromozomů jsou distribuovány do jednotlivých velikostních skupin (discrete size modes). Mezi linií TcIIe a TcIIa bylo pozorováno několik homologních chromozomů odlišných velikostních skupin, které odpovídaly velikostním skupinám buď linie TcIIb nebo TcIIc. Tento pokus podporuje hypotézu hybridního původu linií TcIIa a TcIIe, a jejich domnělých rodičovských linií TcIIb a TcIIc.

Původ linií TcIIa a TcIIc je nejasný. Někteří autoři formulovali hypotézu, že genotypy TcI a TcIIb jsou původní a hybridizací mezi nimi vznikají linie TcIIa a TcIIc (Westenberger a kol. 2005, Subileau a kol. 2009). Tato hypotéza je však v rozporu se studií de Freitas a kol. (2006), kteří považují linii TcIIc za jednu ze tří hlavních fylogenetických oddělení vedle linií TcI a TcIIb, a proto podle těchto autorů TcIIc není hybridní.

Fakt, že *T. cruzi* je schopná genetické výměny byl prokázán i pomocí šesti dvojité rezistentních hybridů, kteří byli izolováni po infekci dvou mutantních klonů TcI kultuře v savčích buňkách. Jeden rodičovský klon obsahoval gen rezistence na hydromycin (P1-hyg) a druhý byl rezistentní na neomycin (P2-neo). Hybridi tedy obsahovali oba geny a sdíleli charakteristické znaky rodičů, což dokazuje fúzi rodičovských genotypů (Gaunt a kol. 2003). Autoři prokázali jak dědičnost maxikroužků kDNA pouze od jednoho z rodičů, tak i ztrátu alel (alela lokusu L660 homozygotního rodiče (P2neo) chyběla ve všech progenech chyběla

rodičovská alela lokusu L660 a alela tryparedoxinového lokusu). Proto se hybridi zdáli být aneuploidi (Gaunt a kol. 2003). Obsah DNA změřený těmito šesti experimentálně generovaným TcI hybridům ukázal, že to jsou tetraploidi. Vznikla tak hypotéza, že aneuploidi vznikli z tetraploidů, kteří podstoupili určitou ztrátu genomu (model fúze a redukce). Obsah DNA byl u hybridních tetraploidů 1,65-1,72 krát větší než jejich rodičů a tudíž množství, které aneuploidi ztratili z tetraploidních jader je 15,3% DNA (Lewis a kol. 2009).

Trypanosoma cruzi je dosti odlišná od *T. brucei*. Replikuje se například intracelulárně, zatímco *T. brucei* extracelulárně. Proto z faktu, že *T. brucei* je schopná podstoupit meiózu, nemůžeme předčasně usuzovat na možnost meiózy i u *T. cruzi*. Haploidní stádia *T. cruzi*, které by potvrdily klasickou meiózu, zatím pozorována nebyla. Navíc všechny doposud experimentálně získané genotypy hybridů *T. cruzi* se neslučovaly s klasickou meiózou. Po srovnání TcIIId/TcIIe s odpovídajícími rodiči TcIIb/TcIIc bylo zjištěno, že přírodní hybridy jsou diploidní (rozdíl od výsledků u experimentálních hybridů) (Lewis a kol. 2009). To jak se tyto diploidní stádia získají, není jasné. Možným mechanismem je buď klasická meióza, nebo diploidní fúze následovaná meiotickou, nebo jiný zatím nenavržený mechanismus. Zdali model fúze a redukce, pozorovaný v laboratoři, je tím mechanismem genetické výměny *T. cruzi*, zůstává stále nejasné (Lewis a kol. 2009).

8. Závěr

V této bakalářské práci jsou shrnuty dosavadní výsledky o sexuálním rozmnožování dvou z nejnebezpečnějších parazitických prvoků člověka. Práce obsahuje obecné pojednání o výhodách a nevýhodách sexu, a pokračuje konkrétními poznatky o genetické výměně u jednotlivých druhů leishmanií a trypanosom.

Poté, co vědci postupně přicházeli s několika důkazy genetických výměn, jak u trypanosom tak i později u leishmanií, se upustilo od původního názoru o pouze klonálním rozmnožování. Dnes můžeme s jistotou říci, že jsou oba tyto druhy schopné sexuálního rozmnožování. Otázkou zůstává jak, kde a v jaké fázi cyklu parazita k sexu dochází.

Genetická výměna není povinnou složkou životního cyklu těchto parazitů, přesto vybádat způsob, jakým tyto parazité dosahují genetické výměny, je významné pro porozumění těmto patogenům i pro studium evoluce eukaryot. Důkaz genetické rekombinace je významný převážně ale z hlediska medicíny a taxonomie. Přítomnost sexu má význam pro vývoj vakcín a použití druhově specifických diagnostických technik. Konkrétně přenos genů, které kódují resistenci k antibiotikům, může vyžadovat změny ve strategiích užívaných v chemoterapii.

Hybridizace umožňuje adaptaci na nové ekologické niky, vektory a hostitele, a účinně šíří nové vlastnosti. Hybridi *Leishmania major*/*Leishmania infantum* mohou cirkulovat ve *Phlebotomus papatasi* a kolonizovat tak nová ohniska díky jeho širokému rozšíření (Volf a kol. 2007). Sex by mohl také vytvářet nové virulentnější kmeny a vést k novým epidemiím. *Trypanosoma b. gambiense*, jako infekční patogen člověka avšak s nízkou virulencí a přenosností vektorem, může po sexu s *T. b. brucei* získat geny pro lepší přenosnost i virulenci (Gibson 1995).

Ve své diplomové práci bych ráda na toto téma navázala a zabývala se hybridizací leishmanií působících kožní leishmaniózy ve Starém světě. Budu pracovat s druhem *Leishmania major* a nepatogenní leishmanií *Leishmania turanica*. Tyto dvě leishmanie se vyskytují sympatricky v Centrální Asii. Mají stejný rezervoár, pískomily *Rhombomys opimus*, i stejné přenašeče, flebotoma *P. papatasi* (Strelkova 1996). Přirození hybridy těchto dvou druhů nebyli dosud prokázáni (ale ani hledáni). Mým úkolem bude pomocí kmenů značených GFP a RFP zjistit, jak se tyto leishmanie vyvíjejí při koinfekci v přenašeči a zejména zda jsou schopné hybridizace. Případné hybridy se zelenou i červenou fluorescencí budu detekovat metodami fluorescenční mikroskopie a FACS.

9. Citace

- Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley, and D. L. Sacks. 2009.** Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. *Science* 324: 265-268.
- Ayala, F. J. 1998.** Is sex better? Parasites say "no". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3346-3348.
- Barnabe, C., S. Brisse, and M. Tibayrenc. 2000.** Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 120: 513-526.
- Belli, A. A., M. A. Miles, and J. M. Kelly. 1994.** A putative *leishmania-panamensis* *leishmania-braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in nicaragua. *Parasitology* 109: 435-442.
- Bingle, L. E. H., J. L. Eastlake, M. Bailey, and W. C. Gibson. 2001.** A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology-Sgm* 147: 3231-3240.
- Bogliolo, A. R., E. Chiari, R. O. Silvapereira, and A. A. Silvapereira. 1986.** A comparative-study of *trypanosoma-cruzi* enzyme polymorphism in south-america. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 19: 673-683.
- Brisse, S., C. Barnabe, and M. Tibayrenc. 2000a.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30: 35-44.
- Brisse, S., J. Henriksson, C. Barnabé, E. J. P. Douzery, D. Berkvens, M. Serrano, M. R. C. De Carvalho, G. A. Buck, J.-C. Dujardin, and M. Tibayrenc. 2003.** Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 173-183.
- de Freitas, J. M., L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V. F. Goncalves, S. M. R. Teixeira, E. Chiari, A. C. V. Junqueira, O. Fernandes, A. M. Macedo, C. R. Machado, and S. D. J. Pena. 2006.** Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens* 2: 226-235.
- Delespaux, V., H. Dinka, J. Masumu, P. Van den Bossche, P. Geerts. 2008.** Five-fold increase in *Trypanosoma congolense* isolates resistant to diminazene aceturate over a seven-year period in Eastern Zambia. *Drug Resistance Updates* 11: 205-209.
- Delgado, O., E. Cupolillo, R. BonfanteGarrido, S. Silva, E. Belfort, G. Grimaldi, and H. Momen. 1997.** Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 581-582.

- Duffy, C. W., L. J. Morrison, A. Black, G. L. Pinchbeck, R. M. Christley, A. Schoenefeld, A. Tait, C. M. R. Turner, and A. MacLeod. 2009.** Trypanosoma vivax displays a clonal population structure. *International Journal for Parasitology* 39: 1475-1483.
- Dujardin, J. C., A. L. Banuls, A. Llanoscuentas, E. Alvarez, S. Dedoncker, D. Jacquet, D. Leray, J. Arevalo, and M. Tibayrenc. 1995.** Putative leishmania hybrids in the eastern andean valley of huanuco, peru. *Acta Tropica* 59: 293-307.
- Evans, D., W. Kennedy, S. Elbihari, C. Chapman, V. Smith, and W. Peters. 1987.** Hybrid formation within the genus Leishmania? *Parassitologia* 29: 165-73.
- Gaunt, M. W., M. Yeo, I. A. Frame, J. R. Stothard, H. J. Carrasco, M. C. Taylor, S. S. Mena, P. Veazey, G. A. J. Miles, N. Acosta, A. R. de Arias, and M. A. Miles. 2003.** Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936-939.
- Gibson, W., and L. Garside. 1990.** Kinetoplast dna minicircles are inherited from both parents in genetic hybrids of trypanosoma-brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology* 42: 45-53.
- Gibson, W., and L. Garside. 1991.** Genetic exchange in trypanosoma-brucei-brucei - variable chromosomal location of housekeeping genes in different trypanosome stocks. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45: 77-90.
- Gibson, W., and M. Bailey. 1994.** Genetic exchange in trypanosoma-brucei - evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64: 241-252.
- Gibson, W., L. Garside, and M. Bailey. 1992.** Trisomy and chromosome size changes in hybrid trypanosomes from a genetic cross between trypanosoma-brucei-rhodesiense and trypanosoma-brucei-brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology* 51: 189-199.
- Gibson, W., G. Kanmogne, and M. Bailey. 1995.** A successful backcross in trypanosoma-brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69: 101-110.
- Gibson, W., M. Crow, and J. Kearns. 1997a.** Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic crosses of Trypanosoma brucei. *Parasitology Research* 83: 483-488.
- Gibson, W., K. Winters, G. Mizen, J. Kearns, and M. Bailey. 1997b.** Intraclonal mating in Trypanosoma brucei is associated with out-crossing. *Microbiology-Uk* 143: 909-920.
- Gibson, W., L. Peacock, V. Ferris, K. Williams, and M. Bailey. 2006.** Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochemical Society Transactions* 34: 557-559.
- Gibson, W., L. Peacock, K. Williams, and M. Bailey. 2008.** The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in Trypanosoma brucei. *Parasites and Vectors* 1.
- Gibson, W. C. 1989.** Analysis of a genetic cross between trypanosoma-brucei-rhodesiense and trypanosoma-brucei-brucei. *Parasitology* 99: 391-402.

- Gibson, W. C. 1995.** The significance of genetic exchange in trypanosomes. *Parasitology Today* 11: 465-468.
- Goddard, M., H. Godfray, and A. Burt. 2005.** Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*: 636-640.
- Heitman, J. 2006.** Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Current Biology* 16: R711-R725.
- Jenni, L., S. Marti, J. Schweizer, B. Betschart, R. W. F. Lepage, J. M. Wells, A. Tait, P. Paindavoine, E. Pays, and M. Steinert. 1986.** Hybrid formation between african trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322: 173-175.
- Kelly, J. M., J. M. Law, C. J. Chapman, G. Vaneys, and D. A. Evans. 1991.** Evidence of genetic-recombination in leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46: 253-263.
- Kooy, R. F., H. Hirumi, S. K. Moloo, V. M. Nantulya, P. Dukes, P. M. Vanderlinden, W. A. L. Duijndam, C. J. Janse, and J. P. Overdulve. 1989.** Evidence for diploidy in metacyclic forms of african trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 5469-5472.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. W. Gaunt, M. Yeo, H. J. Carrasco, and M. A. Miles. 2009.** Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology* 39: 1305-1317.
- Lukes, J., I. L. Mauricio, G. Schonian, J. C. Dujardin, K. Soteriadou, J. P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Q. Tintaya, M. Jirku, E. Chocholova, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Obornik, A. Horak, F. J. Ayala, and M. A. Miles. 2007.** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9375-9380.
- Machado, C. A., and F. J. Ayala. 2001.** Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7396-7401.
- MacLeod, A., A. Tweedie, S. McLellan, M. Hope, S. Taylor, A. Cooper, L. Sweeney, C. M. R. Turner, and A. Tait. 2005.** Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: Proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis (vol 143, pg 12, 2005). *Molecular and Biochemical Parasitology* 144: 131-131.
- Miles, M. A., M. Yeo, and I. L. Mauricio. 2009.** *Leishmania* Exploit Sex. *Science* 324: 187-189.
- Morrison, L. J., A. Tait, G. McCormack, L. Sweeney, A. Black, P. Truc, A. C. L. Likeufack, C. M. Turner, and A. MacLeod. 2008.** *Trypanosoma brucei* gambiense Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infection Genetics and Evolution* 8: 847-854.

- Morrison, L. J., A. Tweedie, A. Black, G. L. Pinchbeck, R. M. Christley, A. Schoenefeld, C. Hertz-Fowler, A. MacLeod, C. M. R. Turner, and A. Tait. 2009.** Discovery of Mating in the Major African Livestock Pathogen *Trypanosoma congolense*. *Plos One* 4.
- Nolder, D., N. Roncal, C. R. Davies, A. Llanos-Cuentas, and M. A. Miles. 2007.** Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 573-578.
- Paindavoine, P., F. Zampettibosseler, E. Pays, J. Schweizer, M. Guyaux, L. Jenni, and M. Steinert. 1986.** Trypanosome hybrids generated in tsetse-flies by nuclear-fusion. *Embo Journal* 5: 3631-3636.
- Peacock, L., V. Ferris, M. Bailey, and W. Gibson. 2007.** Dynamics of infection and competition between two strains of *Trypanosoma brucei brucei* in the tsetse fly observed using fluorescent markers. *Kinetoplastid Biology and Disease* 6:4.
- Peacock, L., V. Ferris, M. Bailey, and W. Gibson. 2009.** Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. *Parasites & Vectors* 2.
- Pratlong, F., J. A. Rioux, J. Dereure, J. Mahjour, M. Gallego, E. Guilvard, G. Lanotte, J. Perieres, A. Martini, and A. Saddiki. 1991.** *Leishmania-tropica* in morocco .4. Enzymatic diversity within a focus. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee* 66: 100-104.
- Ravel, C., S. Cortes, F. Pratlong, F. Morio, J. P. Dedet, and L. Campino. 2006.** First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology* 36: 1383-1388.
- Robinson, D. R., and K. Gull. 1991.** Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell-cycle. *Nature* 352: 731-733.
- Schwenkenbecher, J. M., T. Wirth, L. F. Schnur, C. L. Jaffe, H. Schallig, A. Al-Jawabreh, O. Hamarsheh, K. Azmi, F. Pratlong, and G. Schonian. 2006.** Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology* 36: 237-246.
- Shapiro, T. A., and P. T. Englund. 1995.** The structure and replication of kinetoplast dna. *Annual Review of Microbiology* 49: 117-143.
- Sternberg, J., C. M. R. Turner, J. M. Wells, L. C. Ranfordcartwright, R. W. F. Lepage, and A. Tait. 1989.** Gene exchange in african trypanosomes - frequency and allelic segregation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 34: 269-280.
- Stothard, J. R., I. A. Frame, and M. A. Miles. 1999.** Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: Dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 189-193.
- Strelkova, M. V. 1996.** Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis: A review. *Folia Parasitologica* 43: 1-6.

- Subileau, M., C. Barnabe, E. J. P. Douzery, P. Diosque, and M. Tibayrenc. 2009.** Trypanosoma cruzi: New insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes. *Experimental Parasitology* 122: 328-337.
- Tait, A. 1980.** Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature* 287: 536-538.
- Tibayrenc, M., and F. J. Ayala. 1988.** Isozyme variability in trypanosoma-cruzi, the agent of chagas-disease - genetic, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg, and F. Ayala. 1990.** A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas, and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2414-8.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg, and F. J. Ayala. 1991.** The clonal theory of parasitic protozoa - a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *Bioscience* 41: 767-774.
- Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya, and F. J. Ayala. 1986.** Natural-populations of trypanosoma-cruzi, the agent of chagas-disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 115-119.
- Tibayrenc, M., S. Ben Abderrazak, F. Guerrini, and A. Bañuls. 1993.** Leishmania and the clonal theory of parasitic protozoa. *Arch Inst Pasteur Tunis* 70: 375-82.
- Victoir, K., and J. C. Dujardin. 2002.** How to succeed in parasitic life without sex? Asking Leishmania. *Trends in Parasitology* 18, 81-85.
- Volf, P., I. Benkova, J. Myskova, J. Sadlova, L. Campino, and C. Ravel. 2007.** Increased transmission potential of Leishmania major/Leishmania infantum hybrids. *International Journal for Parasitology* 37: 589-593.
- Westenberger, S. J., C. Barnabe, D. A. Campbell, and N. R. Sturm. 2005.** Two hybridization events define the population structure of Trypanosoma cruzi. *Genetics* 171: 527-543.
- Zampettibosseler, F., J. Schweizer, E. Pays, L. Jenni, and M. Steinert. 1986.** Evidence for haploidy in metacyclic forms of trypanosoma-brucei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6063-6064.