

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Eliška Čermáková

Genetické modifikace komárů zaměřené na eliminaci malárie
Transgenic mosquitos as a tool for lower incidence of malaria

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 8.5.2018

Podpis

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivost, pečlivost a ochotu, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady.

Abstrakt

Malárie je infekční onemocnění, v jehož důsledku dosud umírají statisíce lidí ročně zejména v oblasti tropické a subtropické Afriky. Původcem onemocnění je *Plasmodium*, šíření nemoci zajišťují samičky komárů, především z rodu *Anopheles*. Genetické manipulace komárů jsou perspektivní možností, jak zredukovat výskyt malárie. Byly navrženy dvě základní strategie, redukční a substituční. Při redukční strategii mají transgenní samečci přispět k dlouhodobému snížení početnosti přírodní komáří populace. Cílem substituční strategie je vytvořit komáry, kteří mají silně zredukovanou schopnost zajistit vývoj parazita, a těmito transgenními komáry nahradit původní komáří populaci. Obě strategie jsou dosud ve fázi návrhů a ověřování v laboratorních podmínkách.

Klíčová slova: Transgenní komáři, vektor, Plasmodium, malárie

Abstract

Malaria is an infectious disease causing high lethality, mainly in tropic and subtropic Africa. The disease is caused by unicellular *Plasmodium* and transmitted by infected *Anopheles* mosquito females. Genetic manipulations in mosquitos are promising approach in malaria vector control. There are two important ways of genetic manipulations in mosquitos: reduction and substitution strategies. In the former one, transgenic male mosquitos are used to achieve long term mosquito population size reduction. The aim of different substitution strategies is the production of transgenic mosquitos refractory to Plasmodium infection, unable to ensure Plasmodium development. These transgenic insects should replace the original mosquito population. Both strategies are under proposals and testing in laboratory conditions.

Key words: Transgenic mosquitos, vector, Plasmodium, malaria

Obsah

1. Úvod	2
2. Malárie, její původci a přenašeči.....	2
2.1 Přenašeči malárie – rozdělení a výskyt	3
3. Redukční strategie.....	4
3.1 Metoda sterilního hmyzu (SIT) a transgenní varianta RIDL	5
3.2 Příklady redukčních strategií.....	6
4. Substituční strategie	11
5. Závěr	20
6. Seznam použité literatury	21

Seznam použitých zkratek

zkratka	původní název	překlad
SIT	steril insect technique	metoda sterilního hmyzu
RIDL	release of insects carrying a dominant lethal	metoda vypouštění hmyzu s dominantní letální alelou
EBS	early acting bisex	letální účinek u obou pohlaví v raném stádiu
EFK	early acting female-killing	letální účinek samic v raném stádiu
LBS	late acting bisex	letální účinek u obou pohlaví v postlarválním stádiu
LFK	late acting female-killing	letální účinek u samic v postlarválním stádiu
CP	carboxypeptidase	karboxypeptidáza
PM	peritrophic matrix	peritrofická matrix
SM1 peptid	salivary gland and midgut peptide	peptid slinných žláz a středního střeva
PRR	pattern recognition receptors	receptory rozpoznávající vzory
IMD pathway	immune deficiency pathway	signální dráha pro aktivaci imunitní odpovědi
PGRP-LC	long peptidoglycan recognition protein C	protein rozpoznávající vysokomolekulární peptidoglykany, typ C

1. Úvod

Malárie je jedno z nejzávažnějších infekčních onemocnění, způsobené parazity rodu *Plasmodium*, kterými člověk může být infikován při bodnutí samičkami rodu *Anopheles*. Mezi nejvíce postižené oblasti patří tropická a subtropická Afrika, Střední a Jižní Amerika, Indie a Tichomoří.

Úmrtnost v důsledku nákazy malárií se během posledních dvaceti let výrazně snížila (WHO, 2016). Ke snížení přispěl komplexní soubor opatření, především však zvýšení dostupnosti účinných terapeutických lékových kombinací a insekticidní ošetřování lůžek a vnitřních prostor lidských obydlí (Bhatt a kol., 2015). Nicméně na malárii stále umírá více než 400 000 lidí ročně (WHO, 2016).

Na podkladě mnoha biologických studií a experimentů byla navržena řada nových přístupů omezujících přenos parazitů, kteří jsou původci onemocnění. Jednou z možných strategií jsou genetické manipulace komárů. (Barreaux a kol., 2017).

K potlačení výskytu malárie prostřednictvím geneticky modifikovaných komárů jsou testovány dvě základní strategie: redukční a substituční. První je zaměřena na snížení početnosti populace komárů pod prahovou hodnotu, potřebnou pro stabilní přenos parazitů. Druhá strategie se soustředí na nahrazení původní populace populací transgenních nepermissivních komárů, již neschopných onemocnění přenášet (Adelman a kol., 2015).

Cílem bakalářské práce je charakterizovat různé varianty genetických manipulací u komárů, které byly navrženy s cílem snížit výskyt malárie.

2. Malárie, její původci a přenašeči

Malárie je onemocnění vyznačující se horečnatými stavy opakujícími se v cyklech, zimnicí, bolestí kloubů a pocením. Horečnaté záchvaty jsou úzce spjaty s fází životního cyklu parazita vyskytujícího se v krevním řečišti postiženého člověka (krevní stádium). Inkubační doba malárie je 1 až 4 týdny (Sinden a kol., 1983).

Z celkového počtu přibližně 150 druhů rodu *Plasmodium* (Apicomplexa) u člověka parazitují čtyři druhy způsobující malárii (*Plasmodium falciparum* (nejrozšířenější a nejnebezpečnější), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*).

Část životního cyklu parazita v těle člověka zahrnuje složité interakce mezi parazitem a hostitelem, což komplikuje terapii. Předpokládá se, že prevence onemocnění, zaměřená na manipulace komářích populací, je schůdnější cestou (Carballar-Lejarazú a kol., 2017).

Při bodnutí komárem dochází k injikaci sporozoitů ze slin komára do krevního řečiště. Do hodiny se přesouvají do jaterních buněk, kde dochází k exoerytrocytární merogonii a sporozoit se mění v meront. Přibližně po týdnu, kdy dochází k rychlému dělení jader a teprve následnému rozdělení cytoplazmy, vzniká velké množství merozoitů. První merozoiti mohou migrovat do erytrocytů nebo zůstávají v játrech. Dělení v játrech i erytrocytech se může opakovat. Merozoiti, kteří pronikli do erytrocytu, se mění na meronty. Rozpad napadených erytrocytů a uvolnění merontů je vysoce synchronizovaný proces, který spouští horečnatý malarický záchvat. V tuto chvíli se parazit nachází opět v krvi postiženého člověka a tato infikovaná krev může být nasáta komárem. (Baker, 2010; Volf a kol., 2007).

Podrobná znalost životního cyklu parazita, respektive jeho části probíhající v komárovi, je pak velmi důležitá při vytváření studií zaměřených na substituční strategie, kterým se věnuji v kapitole 4.

2.1 Přenašeči malárie – rozdělení a výskyt

Komár je definitivním hostitelem *Plasmodia*, to znamená, že v něm dochází k pohlavnímu rozmnožování parazitů. Komáři jsou tzv. mikroparazitě (krátká doba sání na jednom hostiteli). U krevsajících druhů parazitují pouze samičky. Samičky využívají nasátou krev zejména jako zdroj bílkovin pro tvorbu svých vajíček, která pak kladou na vlhká místa nebo přímo do vody. Larvy a pohyblivé kukly žijí ve stojatých, většinou sladkých vodách (Minakawa a kol., 1999). Znalost životního cyklu komárů, především procesu reprodukce včetně determinace pohlaví, je důležitá u redukčních strategií, kterým je věnována kapitola 3.

Komáři patří do řádu Diptera a podřádu Nematocera, ve kterém se nachází 4 významní zástupci hematofágních (krevsajících) skupin, tj. čeledi Culicidae, Ceratoponidae, Simuliidae a Phlebotomidae.

Čeleď Culicidae(komárovití)

Tato čeleď má celosvětové rozšíření a zahrnuje více než 3 200 druhů komárů rozdělených do čtyřiceti rodů. Zdravotně významní zástupci, jimž se věnuje tato práce, spadají do podčeledi Anophelinae.

Komáři *Anopheles* z podčeledi Anophelinae jsou hlavními přenašeči malárie. Mezi nejvýznamnější přenašeče patří a v tropické Africe *Anopheles gambiae* a v tropické Asii *Anopheles stephensi* (Minakawa a kol., 1999; Volf a kol., 2007).

3. Redukční strategie

Základem pro použití redukčních strategií je dobrá znalost životního cyklu komára.

Od objevu Ronalda Rosseho roku 1897, že komáři jsou vektory parazita způsobujícího malárii, se kontrola početnosti komářích populace stala důležitou součástí boje proti šíření tohoto onemocnění. Jako první byly navrženy a zavedeny strategie ke snížení populace komárů, tzv. redukční strategie (Ramirez a kol., 2009).

Redukční strategie můžeme pro potřeby této práce rozdělit na genetické a negenetické. Mezi negenetické redukční strategie patří chemické postřiky (insekticidy), likvidace potencionálních lůhnišť (od vody zadržené v pneumatikách až po vysoušení mokřadů) a biologický boj (nasazování ryb živících se primárně larvami komárů) (Ault, 1994; Howard a kol., 2007). Velkým problémem je vznikající rezistence komárů vůči insekticidům, a proto je nezbytné kombinovat nejen různé klasické metody, ale využít i genetické manipulace. (Shiff a kol., 2002)

Dále se v této kapitole budu podrobněji zabývat již jen genetickými redukčními strategiemi.

Redukční strategie založené na genetických modifikacích se používají nejen u různých druhů komárů, ale obecně u veškerého hmyzu, jehož populaci je potřeba snížit (škůdci). Klasickým příkladem je metoda sterilního hmyzu (SIT – steril insect technique).

3.1 Metoda sterilního hmyzu (SIT) a transgenní varianta RIDL

SIT je druhově specifická metoda kontroly hmyzu, která je založena na uvolňování velkého množství sterilních sameček (Knipling a kol., 1955; Krafur a kol., 1998; Klassen a Curtis, 2005). Páření uvolněných sterilních sameček s volně žijícími samičkami vede ke snížení reprodukčního potenciálu samic a nakonec, pokud jsou samičky uvolňovány v dostatečném množství po dostatečně dlouhou dobu, k lokální eliminaci nebo redukci populace (Alphey a kol., 2010).

Nevýhodou klasických postupů sterilizace sameček (ozáření, vystavení chemickým látkám) je výrazné snížení konkurenceschopnosti vypuštěných sameček. Tím se zvyšují náklady této klasické metody, neboť k úspěšnému potlačení je nutné vypustit obrovské množství sameček a to opakovaně (Alphey a kol., 2007; Andreasen a kol., 2005).

Transgenní varianta SIT je označována jako RIDL (release of insects carrying a dominant lethal). Díky transgenním technikám pro indukci letálního účinku v potomstvu lze vytvářet transgenní komáry bez výrazného snížení fitness. To bylo prokázáno v laboratorních podmínkách u *Anopheles stephensi*, *Anopheles arabiensis* a *Aedes aegypti* (Catteruccia a kol., 2005; Howell a kol., 2009; Lee a kol., 2013).

Transgenní samečci při páření s původními samičkami produkují buď jen životaschopné samečky, přenašeče transgenu, nebo jsou zcela sterilní. Skupina amerických a britských vědců navrhla klasifikaci metody SIT a RIDL postupů, z nichž jen některé byly experimentálně otestovány (příklady uvedu v následující kapitole) (Gentile a kol., 2015).

1. Letální účinek u obou pohlaví v raném stádiu (EBS - Early acting bisex)

Tato kategorie se nejvíce podobá klasické SIT. Samečci nesou letální gen a po páření s původními samičkami potomstvo umírá v předlarválním stádiu.

2. Letální účinek samic v raném stádiu (EFK - Early acting female-killing)

V této kategorii vzniká po spojení původních samic s transgenními samečkami pouze samčí potomstvo. Vzniklé samčí potomstvo zajistí šíření transgenu.

3. Letální účinek u obou pohlaví v postlarválním stádiu (LBS - Late acting bisex)

Původní samičky s transgenními samečkami vytváří potomky, kteří přežívají pouze ve vodním stádiu. Transgenní larvy umírají před nebo těsně po dosažení dospělosti a konkurují tak larvám divokého typu a částečně tedy redukuje jejich přežití.

4. Letální účinek u samiček v postlarválním stádiu (LFK - Late acting female-killing)

Původní samičky a transgenní samečci produkují potomstvo, kdy se pouze samečci dožijí dospělosti, jsou plně životaschopní a mohou tak transgen šířit do dalších generací. Samičky umírají ve stádiu larvy a opět zajišťují konkurenční boj s larvami divokého typu.

RIDL strategie byla úspěšně otestována v terénu u původce horečky dengue *Aedes aegypti*. (Subbaraman a kol., 2011).

3.2 Příklady redukčních strategií

Příkladem použití RIDL, spadajícím do kategorie LFK, je tzv. flightless fenotyp u samiček, kdy dospělé samičky téměř okamžitě zemřou kvůli ztrátě schopnosti létat vyvolanou transgenem Nipp1Dm. Samečci jsou plně životaschopní a přenášejí transgen do dalších generací (Fu a kol., 2010).

Flightless samičky

Strategie *flightless* samiček (neschopných letu) byla původně navržena pro kontrolu početnosti komárů *Aedes aegypti*, původců horečky dengue (Fu a kol., 2010).

Princip této strategie je založen na genech Act4, tTA a Nipp1Dm .

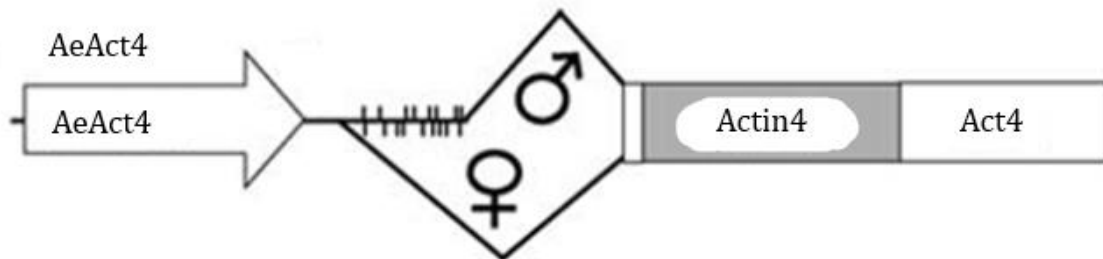
Gen Act4 je exprimován v nepřímých letových svalech v závěrečné fázi larválního vývoje a u kukel, s výrazně vyšší intenzitou u samiček než u samečků. Příčinou rozdílu je alternativní sestřih primárního transkriptu, závislý na pohlaví, který dále ovlivňuje i účinnost translace (Muñoz a kol., 2004).

Gen tTA (tetracycline-repressible transactivator, „driver gene“) je transkripční faktor, který se váže na tetO sekvence, které jsou součástí tRE (tetracyclin responsive)

promotorů. V nepřítomnosti tetracyklinu aktivuje expresi závislých genů. V přítomnosti tetracyklinu je protein inhibován. Gen tTA obsahuje doménu VP16, která má při zvýšené expresi toxické účinky, negativní efekt má především na transkripční aparát a degradaci proteinů závislou na ubiquitinu (Gossen a Bujard, 1992; Phuc a kol., 2007).

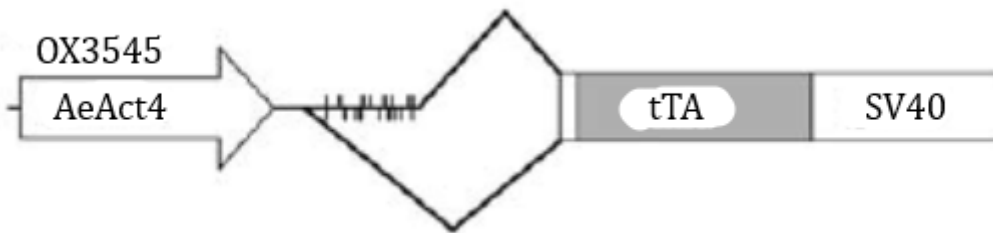
Nipp1Dm je letální efektorový gen. Je inhibátorem proteinfosfatázy PP1. Jeho nadměrná exprese je pro buňky letální (Parker a kol., 2002).

Obr. 1



Gen Act4 z *Aedes aegypti*: u primárního transkriptu probíhá alternativní sestřih v závislosti na pohlaví. U sameček sestřih způsobí posunové mutace, vznikají zkrácené formy proteinu (svislé čáry naznačují stopkodony). Šedě je znázorněna kódující sekvence genu, bezbarvé bloky představují regulační sekvence.

Obr. 2



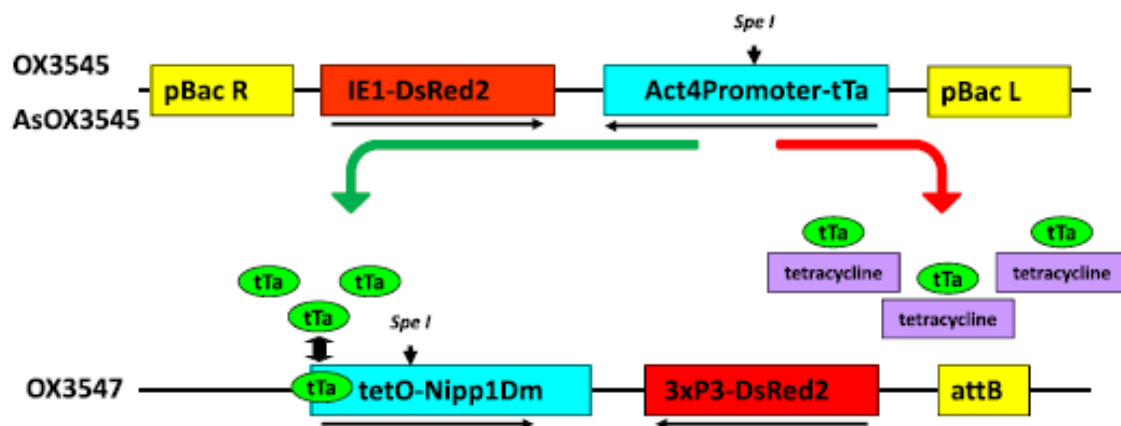
Základ konstrukt vloženého do kmene OX3545: promotor z genu Act4 (včetně 1. exonu a 1. intronu) řídí expresi tTA. Zdrojem terminační sekvence je SV40.

Promotor genu Act4, spolu s 1. exonem a 1. intronem byl předřazen kódující sekvenci genu tTA. U komářího transgenního kmene OX3545 se gen tTA exprimuje jen v křídlech u sameček (obr. 2). Letální efekt způsobený proteinem tTA lze zajistit u kmenů, které nesou nejen konstrukt přítomný u OX3545, ale i letální efektorový gen (např. Nipp1Dm). Regulovaný promotorem s vazebnou sekvencí pro tTA. V nepřítomnosti vysoké

koncentrace tetracyklinu tTA indukuje expresi letálního genu a vznikají *flightless* kukly – samičky, které nejsou schopné opustit vodní prostředí a umírají (Fu et al., 2010).

Marinotti a kol. (2013) navázali na experimenty provedené Fu a kol. (2010) a otestovali *flightless* systém u *Anopheles stephensi*. Použitý vektor obsahoval kromě konstruktů přítomného u kmene OX3545 i reportérový gen dsRED, regulovaný promotorem Hr5-IE1. DsRed usnadnil selekci transgenních potomků (obr. 3). U vektoru navrženého Fu a kol. (2010) byl promotor genu Act4 nahrazen promotorem druhu *Anopheles stephensi* (AsOX3545) (obr. 3). U kmene OX3547 je v genomu letální gen Nipp1Dm. Exprese Nipp1Dm je závislá na produkci tTA a přítomnosti tetracyklinu. V nepřítomnosti tetracyklinu (přírodní prostředí) vede k absenci křídel u transgenních samiček.

Obr.3



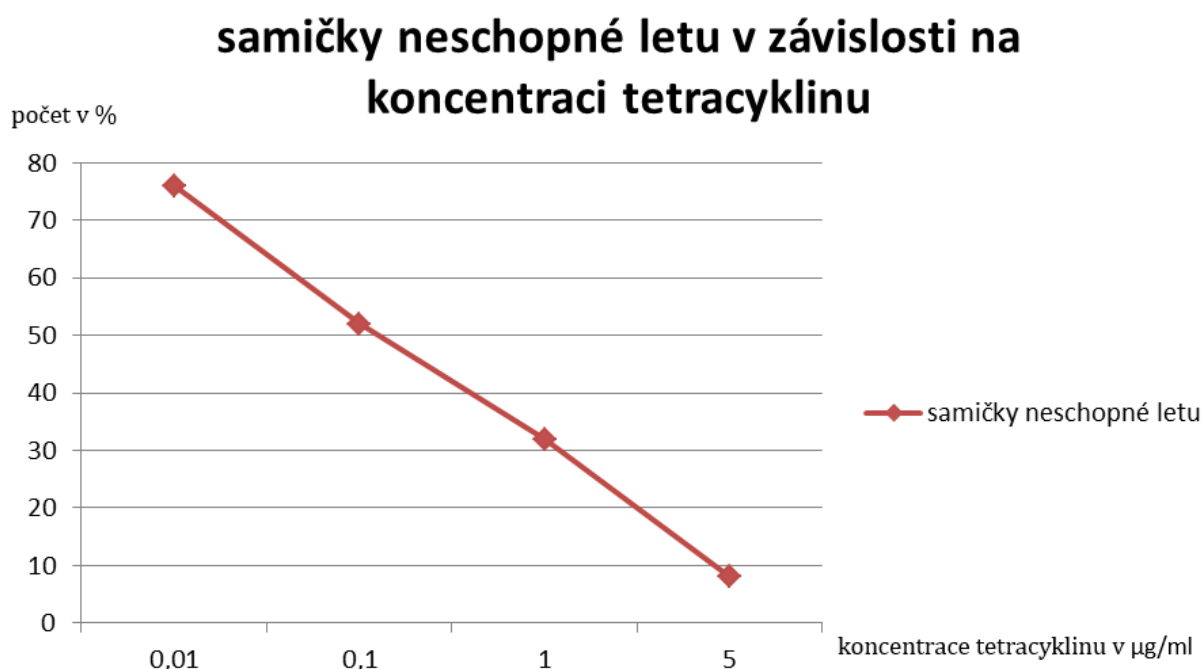
Kmeny OX3545 a AsOX3545 produkují DsRed a v nepřítomnosti tetracyklinu i funkční regulační protein tTA. U kmene OX3547 je v genomu letální gen Nipp1Dm, který se v nepřítomnosti tetracyklinu exprimuje a jeho produkt vede k absenci křídel u transgenních samiček (Marinotti a kol., 2013).

Jak vyplývá z tabulky 1 a grafu na obr. 4, je frekvence nelétajících samiček nepřímo úměrná koncentraci tetracyklinu. Pokud by byli do přírody vypuštěni transgenní samečci, koncentrace tetracyklinu ve volné přírodě neumožní inhibici proteinu tTA a vývoj samiček s křídly.

Tabulka 1 – Vliv tetracyklinu na létavý/nelétavý fenotyp u samiček

Koncentrace tetracyklinu	Transgenní dospělci				Celkový počet samiček	Celkový počet dospělců
	Samičky schopné letu	Samičky neschopné letu	Samečci schopní letu			
5 µg/ml	37	3	91	40	131	
1 µg/ml	21	10	69	31	100	
0,1 µg/ml	15	16	61	31	92	
0,01 µg/ml	9	28	38	27	75	

Obr. 4



Přítomnost dostatečně vysoké tetracyklinu v laboratorních podmínkách zajistí, že dospělci obou pohlaví jsou schopni létat. Všichni dospělí samečci mohou létat nezávisle na přítomnosti tetracyklinu. Naproti tomu 98% samiček chovaných bez tetracyklinu nebylo schopno letu. Většina $\geq 67\%$ samiček léčených tetracyklinem v koncentraci $\geq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ byla schopna létat, zatímco při koncentraci tetracyklinu 0,1 a 0,01 $\mu\text{g} / \text{ml}$ byla letu schopna pouze malá část (48 a 24%) (tab. 1) (graf na obrázku 4 vytvořen podle údajů Marinotti a kol., 2013).

Otázkou bylo, zda kontaminace prostředí tetracyklinem není natolik vysoká, aby způsobila to, že by se *flightless* fenotyp u samic neprojevil. Na toto téma existuje několik studií, které se zabývají měřením koncentrace antibiotik (používaných při zemědělské a živočišné produkci), včetně tetracyklinu, v přírodě. Tyto látky se mohou vyskytovat zejména v odpadních vodách, živočišných zbytcích a v zemědělské půdě. Ve studovaných lokalitách bylo zjištěno, že koncentrace tetracyklinu, analogů tetracyklinu nebo produktů degradace tetracyklinu jsou rozhodně nižší než 1 µg/ml. Jedna z nejvyšších naměřených hodnot byla 0,698 ng/ml tetracyklinu v zemědělské půdě ošetřené hnojivem (Beausse, 2004). Jiné lokality, jako jsou čistírny odpadních vod, kde tetracyklin mohl pocházet z různých zdrojů (města, venkovské oblasti), měly maximální koncentraci tetracyklinů 0,004 µg/ml (Karthikeyan a Bleam, 2003). Řeky a potoky obsahovaly minimální množství tetracyklinu s koncentracemi pod hranicí detekce ($\leq 0,5$ ng/ml) (Campagnolo a kol., 2002). Údaje z měření probíhajících v USA a Asii naznačují, že koncentrace tetracyklinu v prostředí a lokalitách, ve kterých se larvy *Anopheles stephensi* nacházejí, nestačí k zablokování *flightless* fenotypu u samic (Marinotti a kol., 2013).

Letalita vyvolaná genem Guy1

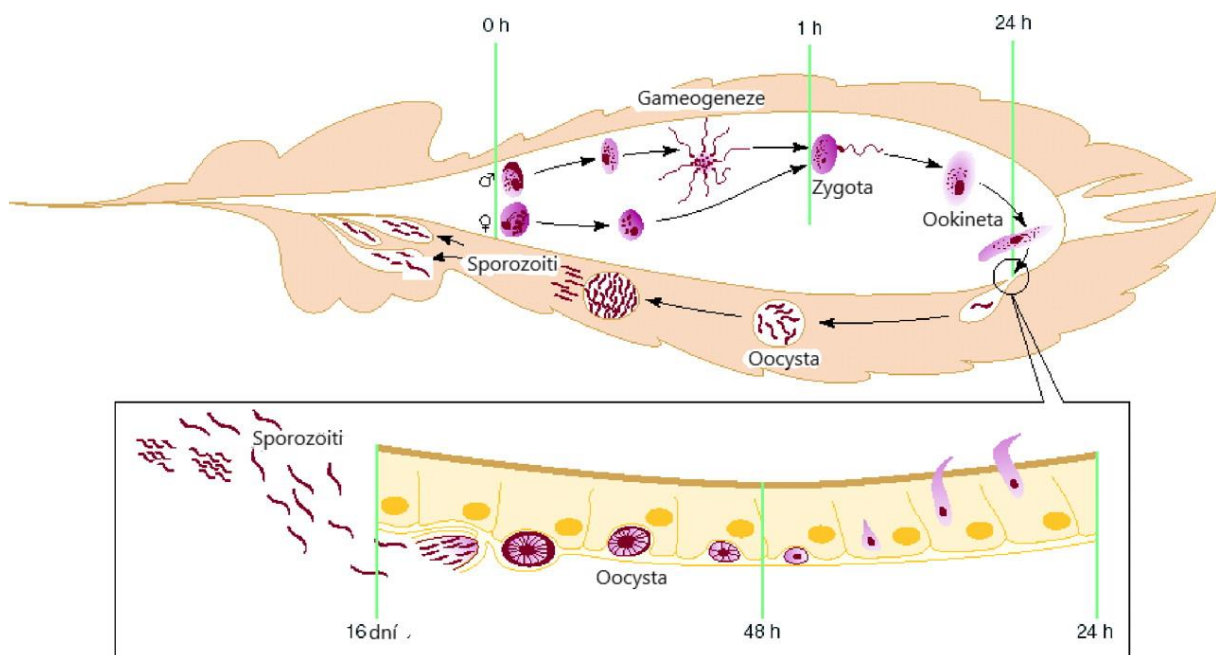
Velmi zajímavý pokus o indukci letálního fenotypu pouze u samic u *Anopheles stephensi* navrhli Criscione a kol. (2016). Letální fenotyp je vyvolán ektopickou expresí genu Guy1. Guy1 byl identifikován jako časný transkript z pohlavního chromozomu Y, zodpovědný za vznik samčího fenotypu. (Criscione a kol. 2013). Gen je exprimován pouze u samečků ve velmi rané fázi embryogeneze, při iniciaci exprese zygotických genů. U transgenních samic, u nichž byl pomocí genetické manipulace gen Guy1 přenesen na některý autozom (nebo vznikly po křížení s transgenním samečkem), je exprese genu letální v časně embryogenezi. Jedná se tedy o EFK postup. Pravděpodobnou příčinou letálního účinku je zvýšená exprese genů na X chromozomu ve srovnání s netransgenními samicami. Autoři prokázali, že alela Guy1 na autozomu měla 100 % letální účinek na samičky při křížení transgenních samečků se dvěma alelami Guy1 (na autozomu a v původním lokusu na Y chromozomu) s netransgenními samicami i po 15 generacích křížení. Navržený přístup zajišťuje spolehlivou selekci transgenních samečků k vypuštění do volné přírody. (Criscione a kol., 2016).

4. Substituční strategie

Životní cyklus rodu *Plasmodium* v komárech je složitý proces, který zahrnuje několik stádií ve středním střevě komára (gametogeneze, fertilizace, tvorba zygot, ookinety, oocysty, sporozoiti) a poté přechod mezi dvěma typy tkání (střední střevo a slinné žlázy) (obr. 5a).

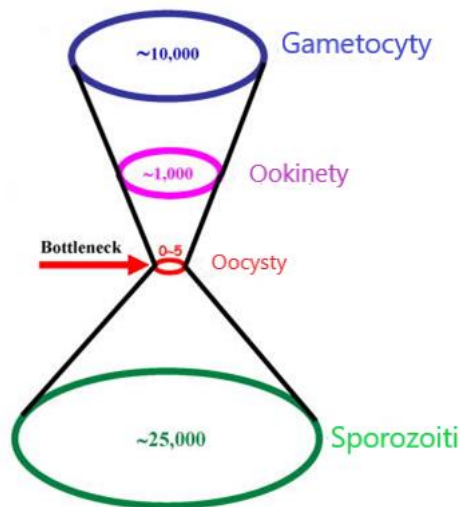
Při nasátí infikované krve se do těla komára dostanou tisíce gametocytů, z nich se pouze 10% úspěšně vyvine v ookinety a 5% ookinet uspěje a přichytí se na vnitřní stěnu středního střeva komára, kde se přemění na oocysty (Tayler a kol., 1999). Z každé oocysty se do dutiny středního střeva komára (hemocoelu) uvolní tisíce sporozoitů, kteří migrují do slinných žláz, aby se společně se slinami komára při jeho příštím sání dostali do dalšího hostitele (obr. 5b) (Witten a kol., 2006).

Obr. 5a



- (a) Životní cyklus *Plasmodium berghei* v komárovi, který je chován při 20 ° C. Přenos začíná, když komár nasaje infikovanou krev (0 h). Během několika minut se gametocyty vyvíjejí na samčí a samičí gamety, které fúzí za vzniku zygoty. Zygota se dále mění na pohyblivou ookinetu. Po 24 hodinách ookinety napadají vnitřní stěnu středního střeva a přeměňují se na oocysty. Asi o dva týdny později se oocysty rozpadnou a uvolní tisíce sporozoitů (hemocoel). Sporozoiti migrují do slinných žláz. Cyklus je dokončen uvolněním sporozoitů ze slinných žláz při sání komára na dalším hostiteli (není zobrazeno) (Ghosh a kol., 2003).

Obr. 5b



(b) Počet jedinců jednotlivých stádií parazita v průběhu životního cyklu v komárovi (Witten a kol., 2006).

Tento složitý cyklus probíhá převážně ve středním střevě komára, a proto je střední střevo hlavním cílovým orgánem pro expresi anti-malarických genů (Abraham a kol., 2004; Drexler a kol., 2008).

Identifikace účinných anti-malarických genů je nezbytným předpokladem pro vytvoření nepermissivních transgenních komárů. V ideálním případě by exprese transgenu neměla negativně ovlivnit jejich fitness. Kromě selekce efektorových, antimalarických genů je třeba zajistit jejich rychlé rozšíření v původní populaci komára.

Hlavním cílem při vytváření transgenních komárů je narušit vývoj a přenos parazita.

K dosažení uvedeného cíle je nutné:

- optimalizovat metody přenosu vybraných genů do zárodečné linie komárů,
- nalézt vhodný promotor pro řízení exprese cizorodých genů a
- vybrat efektorové geny s antiparazitickými účinky.

Při hledání promotoru je důležité zaměřit se na tkáňově specifickou expresi transgenu, čímž lze snížit případný negativní efekt na fitness transgenních komárů.

Dalšími důležitými parametry při výběru promotoru jsou intenzita exprese a načasování exprese ve vztahu k ontogenezi parazita. V zásadě jsou preferovány silnější promotory, protože se předpokládá, že účinnost transgenů pozitivně koreluje s koncentrací antiparazitických proteinů (Jacobs a kol., 2003).

V souladu s uvedenými požadavky byl pro produkci inhibičního peptidu v buňkách komára vybrán promotor genu pro karboxypeptidázu (CP - carboxypeptidase) (Ito a kol., 2002). Tento promotor zajišťuje silnou expresi genu v buňkách vnitřního povrchu středního střeva. Exprese genu je zahájena krátce před vstupem parazita do středního střeva, což je optimální (Jacobs a kol., 2003).

Podle cíle působení lze substituční strategie rozdělit na:

1. Produkce killer peptidů

Peptidy této třídy lyzují parazity, ale neovlivňují hostitelský hmyz. Podle původu se jedná o

- a) peptidy pocházející z vrozeného imunitního systému hmyzu, např. defenziny (Kokoza a kol., 2010), gambicin (Vizioli a kol., 2001) a cecropiny (Kim a kol., 2004) a
- b) peptidy z jiných zdrojů, např. scorpion, který je hybridem lytických peptidů cecropin a defensin (Conde a kol., 2000; Wang a kol., 2012), hemolytický lektin typu C CEL-III (Yoshida a kol., 2007), angiotensin II (Maciel a kol., 2008), magaininy (Gwadz a kol., 1989), syntetické antiparazitické lytické peptidy Shiva-1 a Shiva-3 (Passani a kol., 1998) a gomesin (Moreira a kol., 2007).

Podrobnější charakterizace peptidů je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2

Název bílkoviny	Původ /vlastnosti	Cílový organismus (druh Plasmodia) a jeho stádium/stádia	Zdroj
Cecropin A	Komáří – <i>An. gambiae</i>	<i>P. berghei</i> - ookinety	(Kim a kol., 2004)
Cecropin B		<i>P. falciparum</i> - oocysty	(Gwadz a kol., 1989)
Defenzin	Komáří – <i>An. gambiae</i>	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety	(Kokoza a kol., 2010)
Gambicin	Komáří – <i>An. gambiae</i>	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety	(Vizioli a kol., 2001)
Scorpin	Peptid izolovaný ze štířho jedu - <i>Pandinus imperator</i>	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> – od gametocytů po ookinety	(Conde a kol., 2000)
CEL-III	Hemolytický C-typ lecitinu	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> – ookinety, oocysty	(Yoshida a kol., 2007)
Magaininy	Peptidy získané z pokožky žáby - <i>Xenopus laevis</i>	<i>P. falciparum</i> <i>P. knowlesi</i> <i>P. cynomolgi</i> – všechna stádia v komárech	(Gwadz a kol., 1989)
Gomesin	Antimikrobiální peptid pavouků	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> – všechna stádia v komárech	(Moreira a kol., 2007)
Angiotensin II		<i>P. gallinaceum</i> - sporozoiti	(Maciel a kol., 2008)
Shiva 1	Syntetický peptid podobný cecropinu	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> – od gametocytů po ookinety	(Jaynes a kol., 1988)
Shiva 3			(Passani a kol., 1998)

2. Oslabení interakce středního střeva nebo slinných žláz s parazitem

Příkladem této třídy je SM1 peptid (salivary gland and midgut 1 peptid), který se váže na předpokládané receptory na vnitřní straně povrchu komářího středního střeva a slinné žlázy, blokuje přichycení ookinet a invazi sporozoitů (Ghosh a kol., 2001) (tento příklad podrobněji popsán níže v kapitole). Dalšími kandidáty jsou mPLA2 a chitinázový propeptid. Mutantní fosfolipáza A2, mPLA2, modifikuje vlastnosti povrchové membrány středního střeva a inhibuje tím invazi ookinet, (Moriera a kol., 2002; Wang a kol., 2012; Zieler a kol., 2001). Zvýšená produkce chitinázového propeptidu inhibuje tento enzym a tím brání průchodu ookinet peritrofickou maticí (PM - peritrophic matrix) komárů (Bhatnagar a kol., 2003). PM je extracelulární struktura založená na chitinu, která obklopuje nasátou krev a kterou musí ookinety projít při invazi do středního střeva komára (Shao a kol., 2004).

Stručný přehled efektorů následuje v tabulce 3

Tabulka 3

Název efektoru	Původ/vlastnosti	Cílový organismus (druh Plasmodia) a jeho stádium/stádia	Pozitivní efekt při zvýšené produkci Funkce/mechanismus	Zdroje
SM1	peptid slinných žláz a středního střeva	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> – ookinety, sporozoidi	blokuje invazi ookinet do epitelu středního střeva nebo invazi sporozoitů do epitelu slinné žlázy	(Ghosh a kol., 2001)
mPLA2	včelí fosfolipáza	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety	zabraňuje invazi ookinet do středního střeva komára, pravděpodobně změnou vlastností jeho epiteliální membrány	(Moriera a kol., 2002)
chitinázový propeptid	chrání PM	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety	inhibuje chitinázu a blokuje průchod ookinet peritroficou maticí komárů	(Bhatnagar a kol., 2003)

Substituční strategie byla poprvé testována u *Anopheles stephensi*: transgenní komáři produkovali ve středním střevě peptid SM1 (Ito a kol., 2002). Peptid SM1 se váže k předpokládanému receptoru pro ookinety na vnitřní stěně středního střeva. Pokud jsou tyto receptory obsazeny peptidem SM1, inhibuje to uchycení ookinet a jejich přeměnu na oocysty (Ghosh a kol., 2001). Laboratoř Univerzity CaseWestern Reserve v Ohio v USA ve spolupráci s laboratoří Univerzity Bayreuth v Německu již v roce 2002 vytvořila syntetický gen (nazvaný AgCP [SM1]₄) složený z promotoru CP a sekvence kódující čtyři jednotky SM1 připojené k signální sekvenci CP. Tento gen byl vložen do vektoru piggyBac a transformován do zárodečné linie komárů *Anopheles stephensi*. Northern blot analýza ukázala, že exprese transgenů AgCP [SM1]₄ je rychle a silně indukována nasátou krví ve středním střevě transgenních komárů a to s maximem v rozmezí 3-6 hodin po nasátí (Ito a kol., 2002). Tento výsledek je v souladu s dřívějšími pozorováními pro geny řízené promotorem CP u *Anopheles gambiae* (Edwards a kol., 1997).

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie vědci sledovali produkci proteinu AgCP[SM1]₄ v epitelu středního střeva. Rekombinantní protein byl detekován po 6 i po 24 hodinách

od nasátí krve, ale po 36 hodinách jeho produkce vymizela. Vzhledem k tomu, že ookinety napadají epitel středního střeva přibližně po 24 hodinách od nasátí, je důležité, aby syntéza a sekrece rekombinantního peptidu byla indukována před touto invazí.

Autoři prokázali, že exprese SM1 snížila schopnost komára přenášet parazity (Ito a kol., 2002). Pro měření vlivu exprese transgenu AgCP[SM1]₄ na vývoj parazitů měli kontrolní i transgenní komáři možnost sát krev pouze ze stejné infikované myši. Po nasátí byl sledován počet vytvořených oocyst. V devíti experimentech byla produkce oocyst u transgenních komárů snížena o 68,7 až 94,9% (Ito a kol., 2002).

V oblasti, kde většina komárů nese méně než pět oocyst, může být inhibice přenosu velmi účinná. Protože experimenty byly prováděny s heterozygotními komáry, kteří měli jednu kopii transgenu, očekává se, že inhibice bude ještě účinnější u homozygotních komárů se dvěma kopiemi transgenu (Ito a kol., 2002).

Vzhledem k tomu, že vývoj parazitů u transgenních komárů není zcela zablokovan, existuje možnost, že budou vyselektovány "rezistentní" varianty. Vzniku rezistence lze zabránit, pokud bude u komárů modifikováno současně několik genů, z nichž každý zabraňuje vývoji parazitů jiným mechanismem (Ito a kol., 2002).

Yamamoto a kol. (2016) se zaměřili na inaktivaci slinných žláz komárů pomocí genu Bax myšního původu. Gen Bax (kódující „Bcl-2-associated X protein“) patří mezi proapoptotické geny, protein Bax narušuje vnější membránu mitochondrií a indukuje tím uvolnění cytochromu C. Exprese Bax ve slinných žlázách samiček komára snížila produkci slin i hladinu proteinů sekretovaných slinnými žlázami. Transgenní samičky nebyly permissivní vůči *Plazmodiu*, což bylo v korelaci s abnormální morfologií slinných žláz. Po nasátí krve z infikované myši měly výrazně nižší počet oocyst ve středním střevě než kontrolní samičky bez genu Bax.

3. Zvýšení aktivity vrozené imunitní odpovědi komára vůči napadení *Plasmodiem*

Několik laboratoří prokázalo, že změna exprese genů spojených s imunitním systémem komárů může vést ke snížení schopnosti komára přenášet původce onemocnění (shrnutí v Saraiva a kol. 2016)

Není překvapením, že invaze parazita do epitelu středního střeva komára je hlavní překážkou pro vývoj parazita (obr. 5b). Z tisíce ookinet se v oocysty úspěšně přemění pouze zlomek (Alavi a kol., 2003; Jacobs-Lorena a kol., 2013). Toto drastické snížení je považováno za výsledek přítomnosti fyzických bariér a aktivní imunitní odpovědi komárů. Posílení imunitní obrany komárů je proto jedním z významných cílů substitučních strategií. Detailní studie imunitní obrany u permisivních a především nepermisivních druhů komárů přispívají k identifikaci cílových genů, které by měly být cíleně manipulovány.

Výše zmíněná PM je v přímém kontaktu s různými látkami a stimuly, od bakteriálních komezálů, patogenů, produktů trávení až po toxiny. Aby byla zachována homeostáze, vytváří PM selektivní bariéru, propustnou pro živiny, ale zároveň tvořící první obrannou linii proti škodlivým patogenům jako je *Plasmodium* (Moreno-García a kol., 2014, Shao a kol., 2001). Aktivace imunitní obrany při vstupu ookinet do středního střeva a následné invazi je shrnuta na obr. 6.

K úspěšnému překročení PM parazit vylučuje chitinázy, které degradují tuto strukturu, což umožňuje jeho invazi. Genetické nebo chemické poškození těchto chitináz ovlivňuje schopnost ookinet napadnout tkáň komárů (Bhatnagar a kol., 2003; , 2001).

Komáři produkují chitinázu, o níž se předpokládá, že se podílí na regulaci sekrece PM a může tak nepřímo zasahovat i do invaze parazitů (Shen a Jacobs-Lorena, 1997; Zhang a kol., 2011).

Zdá se, že ookinety při průchodu epitelem středního střeva využívají intracelulární, nikoli intercelulární cestu (Baton a Ranford-Cartwright, 2005; Moreno-García a kol., 2014). Několik studií prokázalo, že ookinety obvykle před dosažením bazální membrány napadají více buněk středního střeva, které na invazi reagují produkcí oxidu dusnatého a následně vstupují do apoptózy (obr. 6) (Baton a Ranford-Cartwright, 2005; Han a kol., 2000; Zieler a Dvořák, 2000).

Při průchodu epitelu středního střeva ookinety narazí na receptory rozpoznávající vzory (PRR - pattern recognition receptors), které detekují patogeny (viry, bakterie a Plasmodium) a spouští signální dráhu aktivující imunitní odpověď nebo přímo indukují endocytické procesy. Mezi PRRs navázanými na membránu je jedním z nejdůležitějších pro anti-Plasmodiovou obranu protein rozpoznávající dlouhé peptidoglykany (PGRP-LC), receptor pro signální dráhu IMD. Bylo prokázáno, že přítomnost bakterií ve

středním střevě posiluje imunitní odpověď proti parazitům. (Clayton et al., 2013, Garver et al., 2009, Meister a kol., 2009)

IMD dráha je nejefektivnější proti *P. falciparum*, což je původce malárie u člověka. Proti původci malárie u hlodavců, *P. berghei*, je velmi účinná signální dráha Toll (Clayton a kol., 2014). Na aktivaci imunitní odpovědi se podílí i inzulínová signální dráha.

Ve studii Dong a kol. (2011), bylo zjištěno, že aktivace dráhy IMD (IMD - immune deficiency) prokazatelně omezuje počet ookinet před invazí epitelu středního střeva. Efektorové molekuly IMD dráhy mají zřejmě i antiparazitickou funkci, kterou vykonávají již v prostoru středního střeva (Dong a kol., 2011).

Na aktivaci imunitní odpovědi proti parazitům se podílí i inzulínová signální dráha. Výsledky práce Corby- Harris a kol. ukazují, že zvýšení exprese signálního proteinu Akt ve středním střevě komára pozitivně ovlivňuje vrozenou imunitu komára (Corby- Harris a kol., 2010).

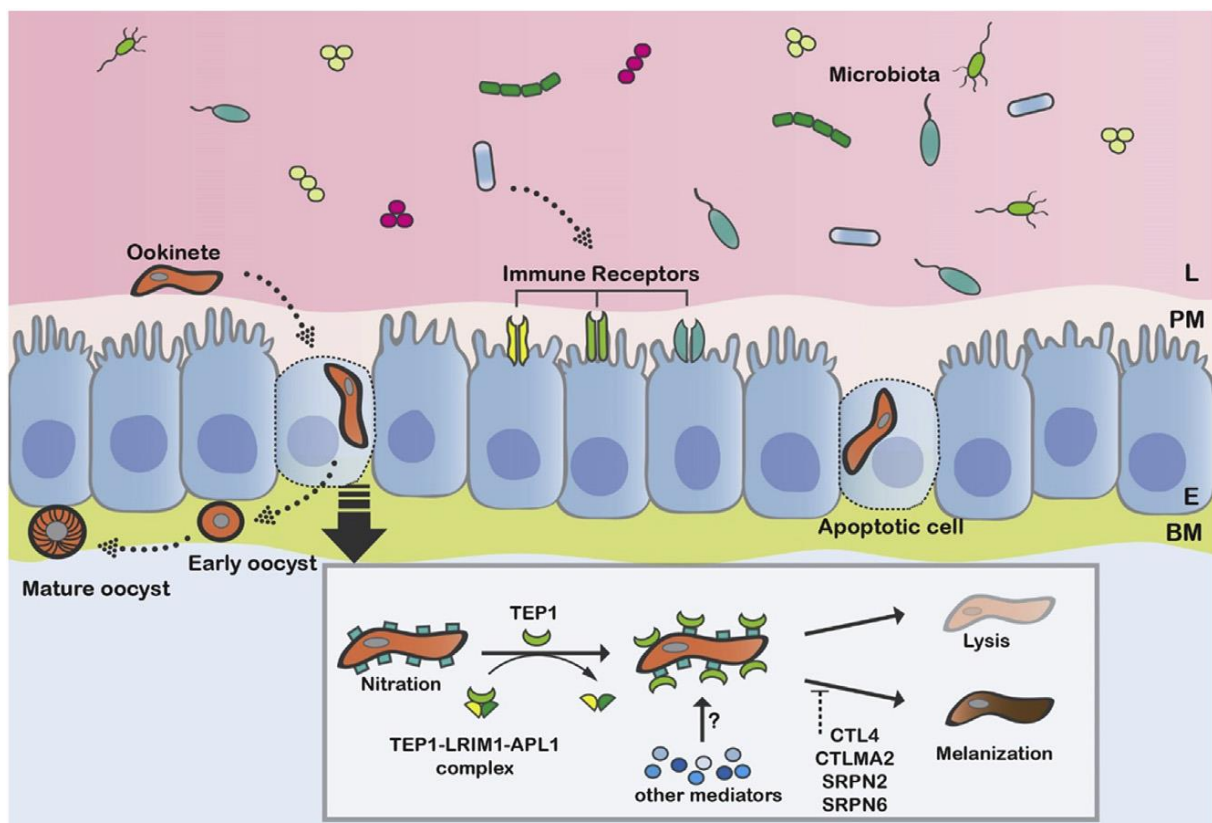
Ačkoliv byly experimenty s modifikací imunitního systému komárů úspěšné (viz tabulka 4), je třeba je před jejich plošnou aplikací důkladně ověřit i z pohledu značné mezidruhové i vnitrodruhové variability (shrnutí v Saraiva a kol. 2016).

Tabulka 4

Modifikovaný protein	Původ/ Vlastnosti Funkce proteinu	Cíl imunitní odpovědi	Pozitivní efekt při zvýšené produkci	Zdroje
Cp-Akt*	Protein kináza, součást dráhy IIS	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety	Pokles oocyst o 95% oproti kontrole	(Corby- Harris a kol., 2010)
Cp-Rel 2*	Rel2-transkripční faktor imunitní dráhy IMD v komárech <i>Anopheles</i>	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> - ookinety, sporozoidi	Pokles oocyst o 80% oproti kontrole	(Dong a kol., 2011)

*Promotor pro karboxypeptidázu reguluje aktivaci imunitního systému ve středním střevě synchronizovaně s nasátím krve

Obr. 6



Interakce ookinet se středním střevem komárů. Ookinety dozrávají uvnitř středního střeva (L-lumen) a zahajují invazi epitelem středního střeva komárů. Nejprve musí překročit peritrofickou matici (PM) a poté střevní epitel (E). Napadené buňky středního střeva rychle zahajují apoptózu a nutí parazita pronikat několika buňkami, než doputuje k bazální membráně (BM), kde začíná přeměna ookinet na oocysty. Během průniku epitelem je parazit vystaven nitraci, což usnadňuje jeho rozpoznání komplementem, jakmile opustí bazální stranu. Komplex efektorových proteinů TEP1, LRIM1 a APL1, aktivovaných drahou IMD, se váže na parazita a označuje ho pro lýzu nebo melanizaci. Vývoj parazita blokují i další proteiny, např. LRRD7, TEP3, TEP4, TEP9 a SPCLIP1, které jsou zřejmě součástí tohoto komplementárního systému. Naproti tomu CTL4, CTLMA2, SRPN2 a SRPN6 byly identifikovány jako agonisté, protože brání melanizaci. Rozpoznání přítomnosti parazitů epitelem středního střeva vyvolá imunitní reakci komára (Saraiva a kol., 2016).

5. Závěr

Využití genetických manipulací u komárů může být podle výsledků nedávných studií úspěšnou metodou, jak efektivně potlačit přenos a výskyt malárie. Genetické manipulace jsou využívány ve dvou strategiích: redukční a substituční.

U redukční strategie se při genetické manipulaci vnáší do genomu komára letální alela (metoda RIDL). Výhodou genetické strategie oproti starším metodám (např. ozařování samečků) je fitness transgenních samečků srovnatelná s původními netransgenními samečky.

Substituční strategie jsou navrženy sofistikovaněji, jejich cílem je vytvořit transgenní komáry neschopné přenášet *Plasmodium*. Genetické manipulace jsou tedy zaměřeny na narušení vývoje různých stádiích parazita (ookinety, oocysty, sporozoiti). Kromě použití vhodných peptidů a efektorů (SM1) lze pro zablokování vývoje použít i geneticky podmíněné zesílení přirozené imunitní odpovědi komárů při napadení patogenem (Akt, Rel2).

6. Seznam použité literatury

- Abraham, E. G., & Jacobs-Lorena, M. (2004). Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 667-671.
- Abraham, E. G., Donnelly-Doman, M., Fujioka, H., Ghosh, A., Moreira, L., & Jacobs-Lorena, M. (2005). Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. *Insect Molecular Biology*, 14(3), 271-279.
- Adelman, Z. N. (2015). *Genetic Control of Malaria and Dengue*. Academic Press.
- Alavi, Y., Arai, M., Mendoza, J., Tufet-Bayona, M., Sinha, R., Fowler, K., ... & Sinden, R. E. (2003). The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *International journal for parasitology*, 33(9), 933-943.
- Alphey, N., Coleman, P. G., Donnelly, C. A., & Alphey, L. (2007). Managing insecticide resistance by mass release of engineered insects. *Journal of economic entomology*, 100(5), 1642-1649.
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. G., Dame, D. A., Service, M. W., & Dobson, S. L. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 295-311.
- Andreasen, M. H., & Curtis, C. F. (2005). Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Medical and veterinary entomology*, 19(3), 238-244.
- Ault, S. K. (1994). Environmental management: a re-emerging vector control strategy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50(6_Suppl), 35-49.
- Baker, D. A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*, 172(2), 57-65.
- Barreaux, P., Barreaux, A. M., Sternberg, E. D., Suh, E., Waite, J. L., Whitehead, S. A., & Thomas, M. B. (2017). Priorities for Broadening the Malaria Vector Control Tool Kit. *Trends in parasitology*, 33(10), 763-774.
- Baton, L. A., & Ranford-Cartwright, L. C. (2005). How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall?. *Trends in parasitology*, 21(1), 22-28.
- Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 753-761.

- Bhatnagar, R. K., Arora, N., Sachidanand, S., Shahabuddin, M., Keister, D., & Chauhan, V. S. (2003). Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(4), 783-787.
- Bhatt, S., Weiss, D. J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., ... & Wenger, E. A. (2015). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526(7572), 207.
- Campagnolo, E. R., Johnson, K. R., Karpati, A., Rubin, C. S., Kolpin, D. W., Meyer, M. T., ... & McGeehin, M. (2002). Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment*, 299(1-3), 89-95.
- Carballar-Lejarazú, R., & James, A. A. (2017). Population modification of Anopheline species to control malaria transmission. *Pathogens and global health*, 111(8), 424-435.
- Carvalho, D. O., Costa-da-Silva, A. L., Lees, R. S., & Capurro, M. L. (2014). Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. *Acta tropica*, 132, S170-S177.
- Catteruccia, F., Benton, J. P., & Crisanti, A. (2005). An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. *Nature biotechnology*, 23(11), 1414.
- Clayton, A. M., Cirimotich, C. M., Dong, Y., & Dimopoulos, G. (2013). Caudal is a negative regulator of the *Anopheles* IMD pathway that controls resistance to *Plasmodium falciparum* infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(4), 323-332.
- Cohuet, A., Osta, M. A., Morlais, I., Awono-Ambene, P. H., Michel, K., Simard, F., ... & Kafatos, F. C. (2006). *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO reports*, 7(12), 1285-1289.
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters*, 471(2-3), 165-168.
- Corby-Harris, V., Drexler, A., De Jong, L. W., Antonova, Y., Pakpour, N., Ziegler, R., ... & Riehle, M. A. (2010). Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS pathogens*, 6(7), e1001003.
- Criscione, F., Qi, Y., & Tu, Z. (2016). GUY1 confers complete female lethality and is a strong candidate for a male-determining factor in *Anopheles stephensi*. *eLife*, 5.

- Criscione, F., Qi, Y., Saunders, R., Hall, B., & Tu, Z. (2013). A unique Y gene in the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi* encodes a small lysine-rich protein and is transcribed at the onset of embryonic development. *Insect molecular biology*, 22(4), 433-441.
- de Lara Capurro, M., Coleman, J. U. D. I. T. H., Beerntsen, B. T., Myles, K. M., Olson, K. E., Rocha, E., ... & James, A. A. (2000). Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 62(4), 427-433.
- Dong, Y., Das, S., Cirimotich, C., Souza-Neto, J. A., McLean, K. J., & Dimopoulos, G. (2011). Engineered *Anopheles* immunity to *Plasmodium* infection. *PLoS pathogens*, 7(12), e1002458.
- Drexler, A. L., Vodovotz, Y., & Luckhart, S. (2008). *Plasmodium* development in the mosquito: biology bottlenecks and opportunities for mathematical modeling. *Trends in parasitology*, 24(8), 333-336.
- Edwards, M. J., Lemos, F. J., Donnelly-Doman, M., & Jacobs-Lorena, M. (1997). Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(12), 1063-1072.
- Fu, G., Lees, R. S., Nimmo, D., Aw, D., Jin, L., Gray, P., ... & Marinotti, O. (2010). Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4550-4554.
- Garver, L. S., Dong, Y., & Dimopoulos, G. (2009). Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000335.
- Gentile, J. E., Rund, S. S., & Madey, G. R. (2015). Modelling sterile insect technique to control the population of *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*, 14(1), 92.
- Ghosh, A., Srinivasan, P., Abraham, E. G., Fujioka, H., & Jacobs-Lorena, M. (2003). Molecular strategies to study *Plasmodium*-mosquito interactions. *TRENDS in Parasitology*, 19(2), 94-101.
- Ghosh, A. K., Ribolla, P. E., & Jacobs-Lorena, M. (2001). Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13278-13281.
- Ghosh, A. K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M., & Jacobs-Lorena, M. (2011). *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17153-17158.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547-5551.

- Gwadz, R. W., Kaslow, D., Lee, J. Y., Maloy, W. L., Zasloff, M., & Miller, L. H. (1989). Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity*, 57(9), 2628-2633.
- Han, Y. S., Thompson, J., Kafatos, F. C., & Barillas-Mury, C. (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *The EMBO journal*, 19(22), 6030-6040.
- Howard, A. F., Zhou, G., & Omlin, F. X. (2007). Malaria mosquito control using edible fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. *BMC public health*, 7(1), 199.
- Howell, P. I., & Benedict, M. Q. (2009). Mating competitiveness of *Anopheles arabiensis* males as a function of transgenic state and genetic similarity to females. *Journal of insect behavior*, 22(6), 477-491.
- Isaacs, A. T., Li, F., Jasinskiene, N., Chen, X., Nirmala, X., Marinotti, O., ... & James, A. A. (2011). Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS pathogens*, 7(4), e1002017.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., & Jacobs-Lorena, M. (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417(6887), 452.
- Jacobs-Lorena, M. (2003). Interrupting malaria transmission by genetic manipulation of anopheline mosquitoes. *Journal of vector borne diseases*, 40(3/4), 73.
- Jaramillo-Gutierrez, G., Rodrigues, J., Ndikuyeze, G., Povelones, M., Molina-Cruz, A., & Barillas-Mury, C. (2009). Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC microbiology*, 9(1), 154.
- Jaynes, J. M., Burton, C. A., Barr, S. B., Jeffers, G. W., Julian, G. R., White, K. L., ... & Laine, R. A. (1988). In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *The FASEB Journal*, 2(13), 2878-2883.
- Karthikeyan, K. G., & Bleam, W. F. (2003). Occurrence of antibiotics in wastewater effluents and their mobility in soils: a case study for Wisconsin [<http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/EcoNatRes.KarthikeyanOccurr>]
- Kim, W., Koo, H., Richman, A. M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A. D., & O'brochta, D. A. (2004). Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *Journal of medical entomology*, 41(3), 447-455.
- Klassen, W., & Curtis, C. F. (2005). History of the sterile insect technique. In *Sterile insect technique* (pp. 3-36). Springer Netherlands.

- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Shin, S. W., Okafor, N., Zou, Z., & Raikhel, A. S. (2010). Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8111-8116.
- Krafsur, E. S. (1998). Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: 55 years and counting. *Journal of Agricultural Entomology*, 15(4), 303.
- Lee, H. L., Vasan, S., Ahmad, N. W., Idris, I., Hanum, N., Selvi, S., ... & Murad, S. (2013). Mating compatibility and competitiveness of transgenic and wild type *Aedes aegypti* (L.) under contained semi-field conditions. *Transgenic research*, 22(1), 47-57.
- Maciel, C., de Oliveira Junior, V. X., Fazio, M. A., Nacif-Pimenta, R., Miranda, A., Pimenta, P. F., & Capurro, M. L. (2008). Anti-plasmodium activity of angiotensin II and related synthetic peptides. *PloS one*, 3(9), e3296.
- Marinotti, O., Jasinskiene, N., Fazekas, A., Scaife, S., Fu, G., Mattingly, S. T., ... & James, A. A. (2013). Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Malaria journal*, 12(1), 142.
- Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F. C., & Christophides, G. K. (2009). *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS pathogens*, 5(8), e1000542.
- Mendes, A.M., Schlegelmilch, T., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., De Iorio, M., Fontenille, D., Morlais, I., Christophides, G.K., Kafatos, F.C., Vlachou, D., (2008). Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathogens*. 4, e1000069.
- Minakawa, N., Mutero, C. M., Githure, J. I., Beier, J. C., & Yan, G. (1999). Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in western Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(6), 1010-1016.
- Moreira, C. K., Rodrigues, F. G., Ghosh, A., Varotti, F. D. P., Miranda, A., Daffre, S., ... & Moreira, L. A. (2007). Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium spp.* *Experimental parasitology*, 116(4), 346-353.
- Moreira, L. A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E. G., ... & Jacobs-Lorena, M. (2002). Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40839-40843.
- Moreno-García, M., Recio-Tótoro, B., Claudio-Piedras, F., & Lanz-Mendoza, H. (2014). Injury and immune response: applying the danger theory to mosquitoes. *Frontiers in plant science*, 5, 451.

- Muñoz, D., Jimenez, A., Marinotti, O., & James, A. A. (2004). The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 13(5), 563-568.
- Parker, L., Gross, S., Beullens, M., Bollen, M., Bennett, D., & Alphey, L. (2002). Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochemical Journal*, 368(Pt 3), 789.
- Phuc HK, et al. (2007) Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol* 5:11 Available at <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1741-7007-5-11.pdf>.
- Possani, L. D., Zurita, M., Delepierre, M., Hernández, F. H., & Rodríguez, M. H. (1998). From noxiustoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Toxicon*, 36(11), 1683-1692.
- Ramirez, J. L., Garver, L. S., & Dimopoulos, G. (2009). Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Current molecular medicine*, 9(2), 116-130.
- Saraiva, R. G., Kang, S., Simões, M. L., Angleró-Rodríguez, Y. I., & Dimopoulos, G. (2016). Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 53-64.
- Shao, L., Devenport, M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 47(2), 119-125.
- Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. (1997). Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28895-28900.
- Shiff, C. (2002). Integrated approach to malaria control. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 278-293.
- Sinden, R. E. (1983). Sexual development of malarial parasites. In *Advances in parasitology* (Vol. 22, pp. 153-216). Academic Press.
- Subbaraman, N. (2011). Science Snipes at Oxitec Transgenic-mosquito Trial.: 9-11.
- Taylor, L. H. (1999). Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles mosquitoes* in Tanzania. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 93(6), 659-662.
- Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A.K., Kanzok, S.M., Dinglasan, R.R., Wang, S., Bongio, N.J., Kalume, D.E., Miura, K., Long, C.A., Pandey, A., Jacobs-Lorena, M., (2014). Multiple

pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E492eE500.

Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Müller, H. M., & Dimopoulos, G. (2001). Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12630-12635.

Volf P., Horák P. a kol.: Paraziti a jejich biologie 1. vydání, str. 90 – 115, 253, Triton, Praha 2007

Volohonsky, G., Terenzi, O., Soichot, J., Naujoks, D. A., Nolan, T., Windbichler, N. & Steinert, S. (2015). Tools for *Anopheles gambiae* transgenesis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(6), 1151-1163.

Volohonsky, G., Hopp, A. K., Saenger, M., Soichot, J., Scholze, H., Boch, J., ... & Marois, E. (2017). Transgenic expression of the anti-parasitic factor TEP1 in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006113

Wang, S., Ghosh, A. K., Bongio, N., Stebbings, K. A., Lampe, D. J., & Jacobs-Lorena, M. (2012). Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12734-12739.

Whitten, M. M. A., Shiao, S. H., & Levashina, E. A. (2006). Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite immunology*, 28(4), 121-130.

WHO. World Malaria Report, 2015. World Health Organization; 2016. ISBN: 978 92 4 1511711.

World Health Organization. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*. World Health Organization.

Yamamoto, D. S., Sumitani, M., Kasashima, K., Sezutsu, H., & Matsuoka, H. (2016). Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005872.

Yoshida, S., Ioka, D., Matsuoka, H., Endo, H., & Ishii, A. (2001). Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Molecular and biochemical parasitology*, 113(1), 89-96.

Yoshida, S., Shimada, Y., Kondoh, D., Kouzuma, Y., Ghosh, A. K., Jacobs-Lorena, M., & Sinden, R. E. (2007). Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS pathogens*, 3(12), e192.

Zhang, J., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Ma, E., & Zhu, K. Y. (2011). Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PloS one*, 6(5), e19899.

Zieler, H., Keister, D. B., Dvorak, J. A., & Ribeiro, J. M. (2001). A snake venom phospholipase A2 blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *Journal of Experimental Biology*, 204(23), 4157-4167.

Zieler, H., & Dvorak, J. A. (2000). Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11516-11521.