

ABSTRAKT

Tato doktorská práce se zabývá enzymy a dalšími molekulami ovlivňující vývoj leishmanií v jejich přenašečích. Shrnuje výsledky tří publikovaných prací a jedné práce připravované.

První část práce je zaměřena na inhibitory cysteinových proteáz leishmanií (ICP), jelikož existuje hypotéza, že ICP *Leishmania mexicana* chrání parazity před proteolytickými enzymy přenašeče a tím zajišťuje jejich přežití ve vektorovi. K potvrzení této domněnky byl studován vývoj ICP defektních mutantů *L. mexicana* ve flebotomovi druhu *Lutzomyia longipalpis*. Výsledky experimentů prokázaly, že ICP *L. mexicana* nehraje roli při přežívání leishmanií ve hmyzím přenašeči a navíc jsme zjistili, že rekombinantní ICP neinhibuje *in vitro* proteázovou aktivitu střevního lyzátu *L. longipalpis*.

Dalším cílem bylo studium mechanismu přichycení leishmanií na střevní epitel jejich přenašečů. Laboratorní experimenty ukazují, že flebotomy lze podle náchylnosti vůči leishmaniím rozdělit do dvou skupin na tak zvané specifické a permisivní vektory. U specifických vektorů se na přichycení leishmanií podílí povrchový lipofosfoglykan (LPG) leishmanií. U permisivních vektorů existuje hypotéza, že LPG k přichycení nutný není. Naše experimenty tuto hypotézu potvrdily a prokázaly, že LPG *L. major* není potřebný pro přežití parazitů v permisivních vektorech *Phlebotomus perniciosus* a *P. argatipes*, ale hraje důležitou roli ve specifickém vektorovi *P. duboscqi*.

Pomocí nové *in vitro* metody, která využívá kompetitivní vazbu fluorescenčně značených leishmanií na mezenteron flebotomů, jsme sledovali jaká morfologická stádia a druhy leishmanií se na střevní epitel flebotomů vážou. Výsledky prokázaly, že vazba leishmanií na střeva se u jednotlivých stádií výrazně liší. Nektomonády a leptomonády se vážaly na střeva ve vysokých počtech, zatímco procykličtí promastigoti a metacyklická stádia vůbec nebo jen ve velmi nízkých počtech. Porovnáním vazeb několika druhů leishmanií jsme prokázali, že parazit přenášený v přírodě daným vektorem nemusí být nutně tím, který se *in vitro* váže na jeho střeva nejlépe. Je proto zřejmé, že samotná schopnost *in vitro* vazby leishmanií na střeva nedokáže vysvětlit specifitu či permisivitu flebotomů k přenášeným leishmaniím.

Výše zmíněné poznatky jsme dále rozšířili pomocí studie, ve které jsme porovnávali výsledky experimentálních infekcí flebotomů a *in vitro* vazebných pokusů se značenými leishmaniemi. Ke studiu jsme použili mutantní linie leishmanií, které byly defektní v povrchových GPI-vázaných molekulách, konkrétně LPG a gp63. Naše výsledky prokázaly důležitost GPI-kotvených proteinů (gp63) při vazbě leishmanií na střeva flebotoma a potvrdily LPG nezávislou teorii přichycení *L. major* na střeva permisivního vektora *P. perniciosus*. Naopak jsme ukázali zásadní roli LPG při přichycení *L. major* na střeva specifického vektora *P. papatasi*. Role LPG *L. infantum* při přichycení na střeva *P. perniciosus* zůstává sporná, neboť LPG mutant *L. infantum* se v tomto vektorovi nevyvíjel.