

AFRICKÉ TRYPANOSOMY



Molekulární a buněčné interakce parazita a hostitele, PřF MU 2016

AFRICKÉ TRYPANOSOMY

- DVOUHOSTITELSKÁ KINETOPLASTIDA
- EXTRACELULÁRNÍ PARAZITI V KRVÍ

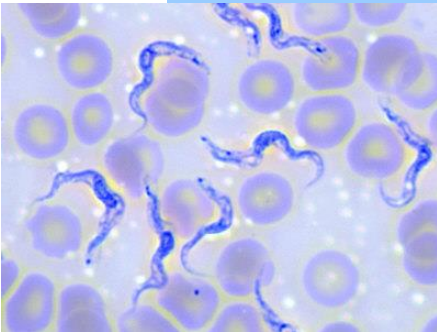
Trypanosoma rhodesiense

akutní – zoonotická

Trypanosoma gambiense

chronická – antroponotická

Smrtelné onemocnění člověka



Trypanosoma brucei

Onemocnění dobytka – nagana



LIDSKÉ AFRICKÉ TRYPANOSOMY

Trypanosoma gambiense

Antroponotická

Chronický průběh

Klasická spavá nemoc

Pomalý vývoj nemoci
s poškozením CNS
v konečné fázi.
Končí smrtelně
po 6 - 8 letech

Vektor:

Říční glossiny
skupina

Glossina palpalis

Rozšíření:

Západní a Střední
Afrika

Trypanosoma rhodesiense

Zoonotická – antilopy, dobytek

Akutní onemocnění

Rychlý zhoubný průběh

Trypanosomová
sepe s fatálním
koncem během
2 - 4 měsíců

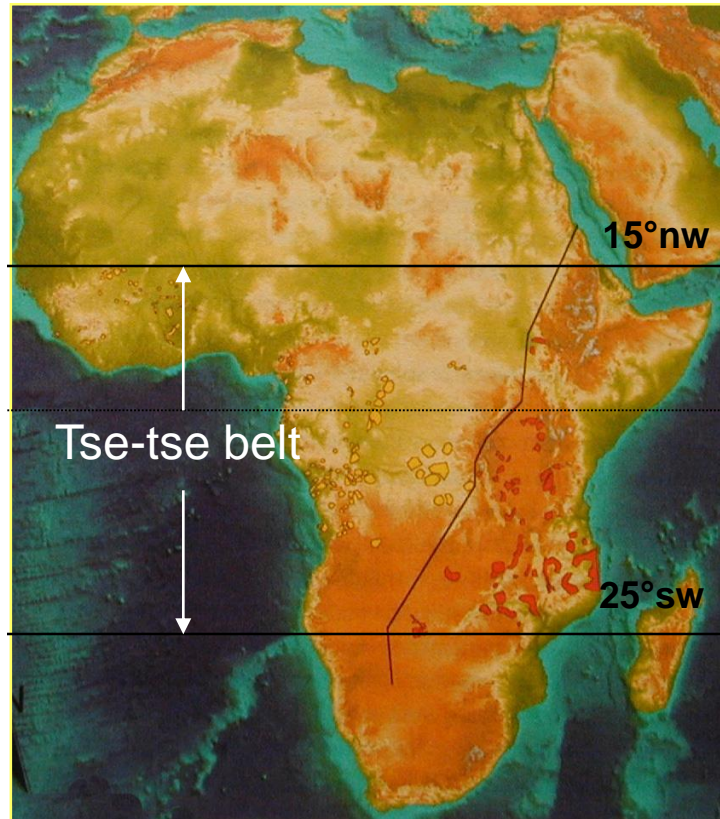
Vektor:

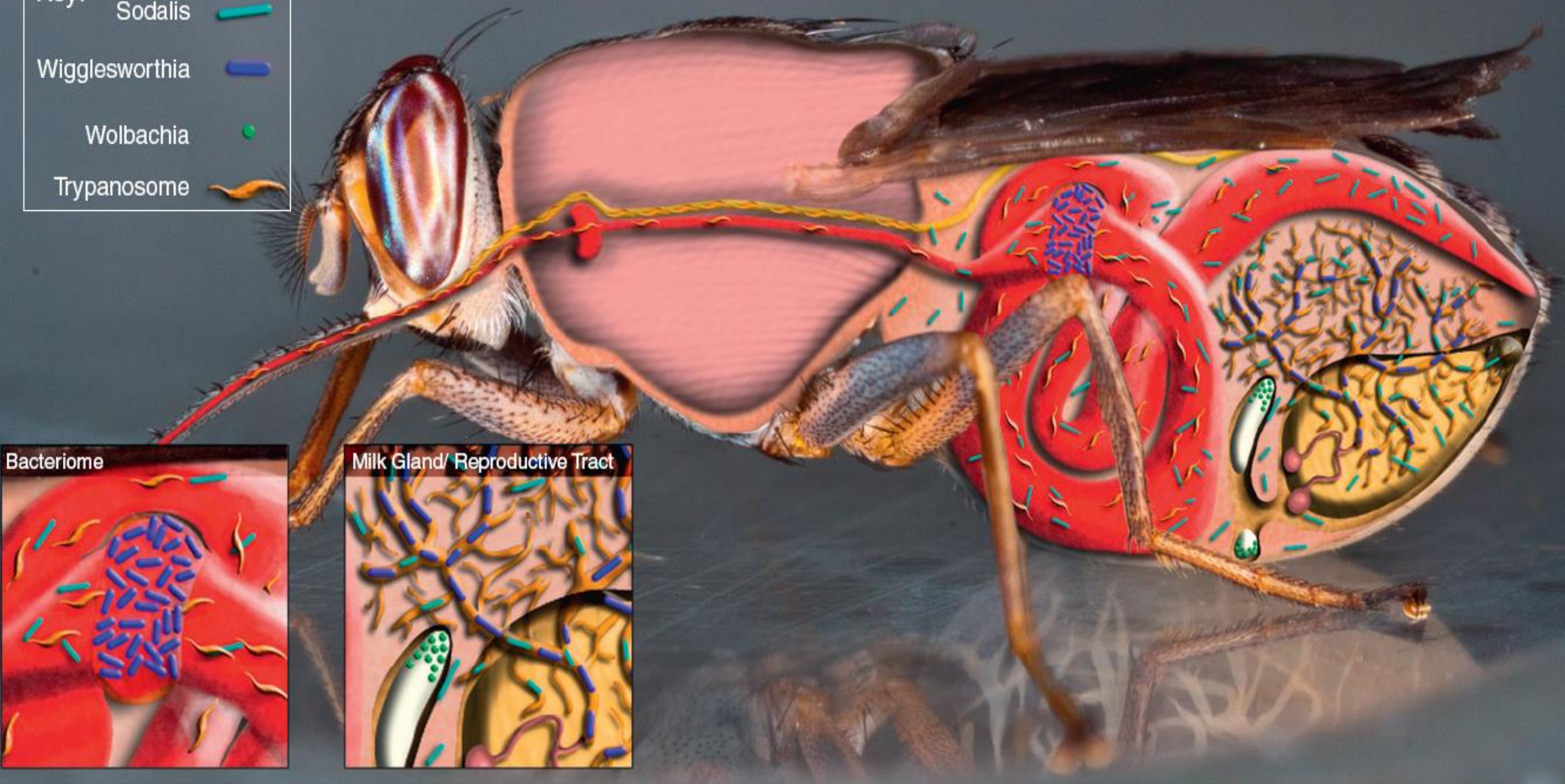
Savanové glossiny
skupina

Glossina morsitans

Rozšíření:

Východní a Střední
Afrika

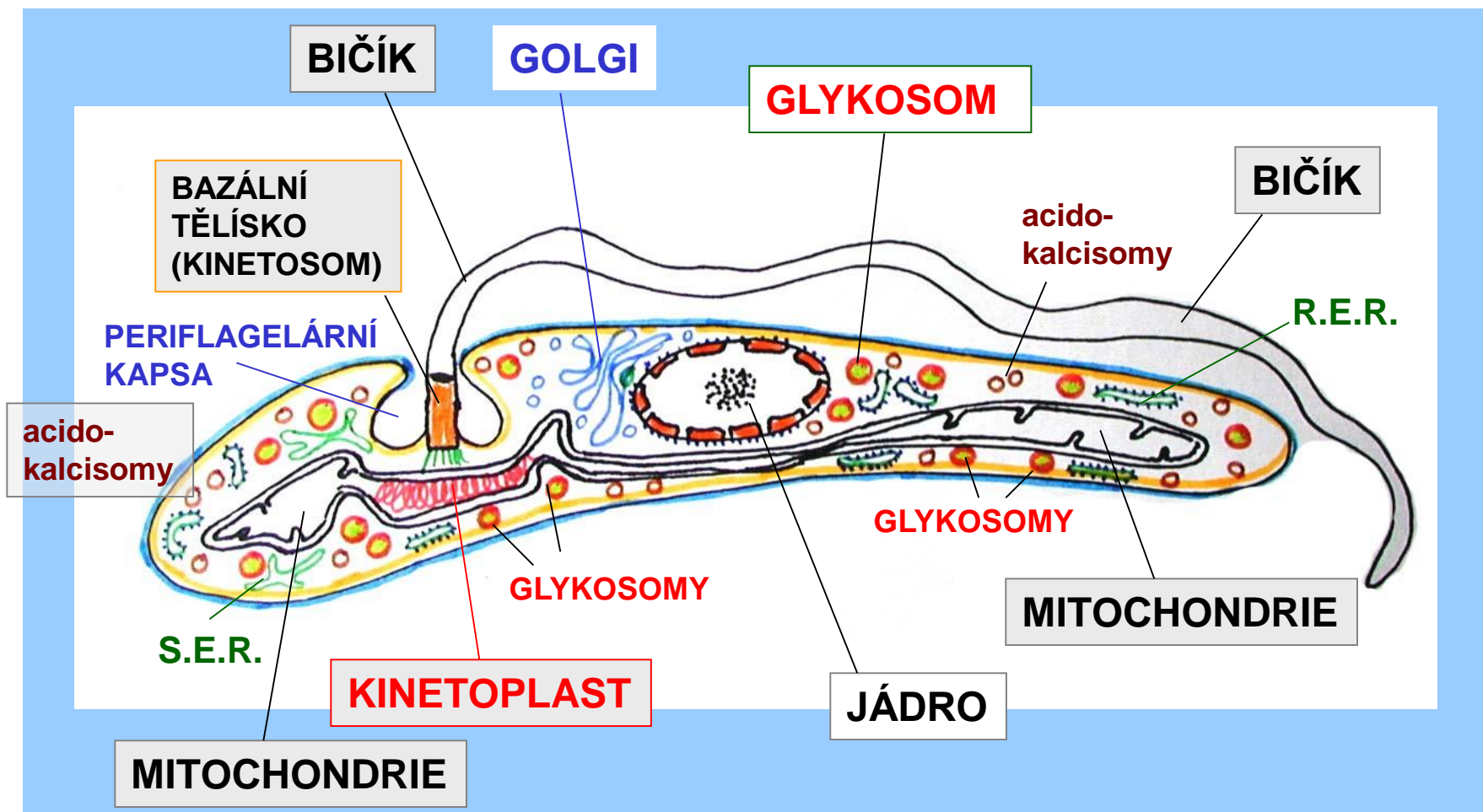


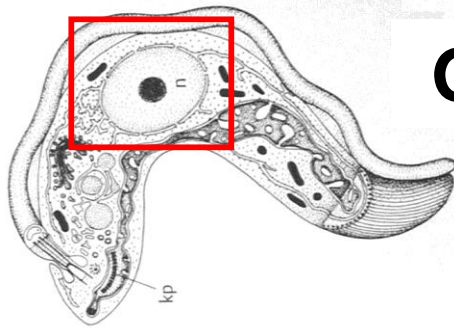


Ambivalentní efekt bakteriálních endosymbiontů glosin:

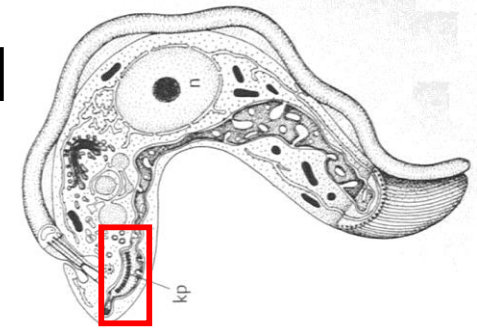
Sodalis inhibuje střevní lektin glosiny

Wigglesworthia vyživuje kromě glosiny také *trypanosomy*





GENOM TRYPANOSOM



**JADERNÝ
INFORMAČNÍ OBSAH
HAPLOIDNÍHO GENOMU:**
~ 25 Mb
**+ NEPŘEPISOVANÉ
REPETITIVNÍ SEKVENCE**
ROZDÍLY MEZI IZOLÁTY < 25%

**MITOCHONDRIÁLNÍ
= KINETOPLASTOVÁ DNA
EXPESE GENŮ
NEZBYTNÁ PRO VÝVOJ
VE VEKTORECH**

RNA - EDITING

JÁDRO

- DIPLOIDNÍ
- SEXUÁLNÍ REKOMBINACE VE VEKTORECH
JEN OBČAS → KLONÁLNÍ STRUKTURA POPULACÍ TRYPANOSOM
- 3 TYPY CHROMOSOMŮ

CHROMOSOMY TRYPANOSOM – 3 velikostní třídy

1. MINICHROMOSOMY

~ 100: 50 – 150 kb, LINEÁRNÍ PALINDROM

V TELOMERICKÉ OBLASTI

GENY PRO VARIABILNÍ POVRCHOVÉ GLYKOPROTEINY (VSG)

SUBTELOMERICKÁ OBLAST NÁCHYLNÁ K REKOMBINACÍM

TRANSLOKACE VSG KOPIÍ ALE ŽÁDNÁ EXPRESNÍ MÍSTA

TĚLO CHROMOSOMU: DLOUHÁ REPETITIVNÍ SEKVENCE 177bp VE DVOU
INVERZNÍCH ŘADÁCH PALINDROMU



2. INTERMEDIÁLNÍ CHROMOSOMY

200 – 900 kb

POČET A VELIKOST ROZDÍLNÁ U RŮZNÝCH KMENŮ

EXPRESNÍ MÍSTA PRO VSG

3. VELKÉ (MEGABÁZOVÉ) CHROMOSOMY

1 Mb - > 6Mb

11 PÁRŮ CHROMOSOMŮ

„HOUSE KEEPING“ – GENY

V SUBTELOMERICKÉ OBLASTI:

GENY V PRO VSG V ŘADÁCH PO 3 – 250 KOPIÍCH
VĚTŠÍNOU PSEUDOGENY NEBO FRAGMENTY GENŮ

JEN ~7% FUNKČNÍCH VSG GENŮ

ALE I PSEUDOGENY VYUŽITELNÉ V REKOMBINANTNÍCH PROCESECH
ZVÝŠUJÍCÍCH VARIABILNÍ POTENCIÁL VSG GENŮ

V TELOMERICKÉ OBLASTI

EXPRESNÍ MÍSTA PRO METACYKICKÉ I KREVNÍ VSG GENY

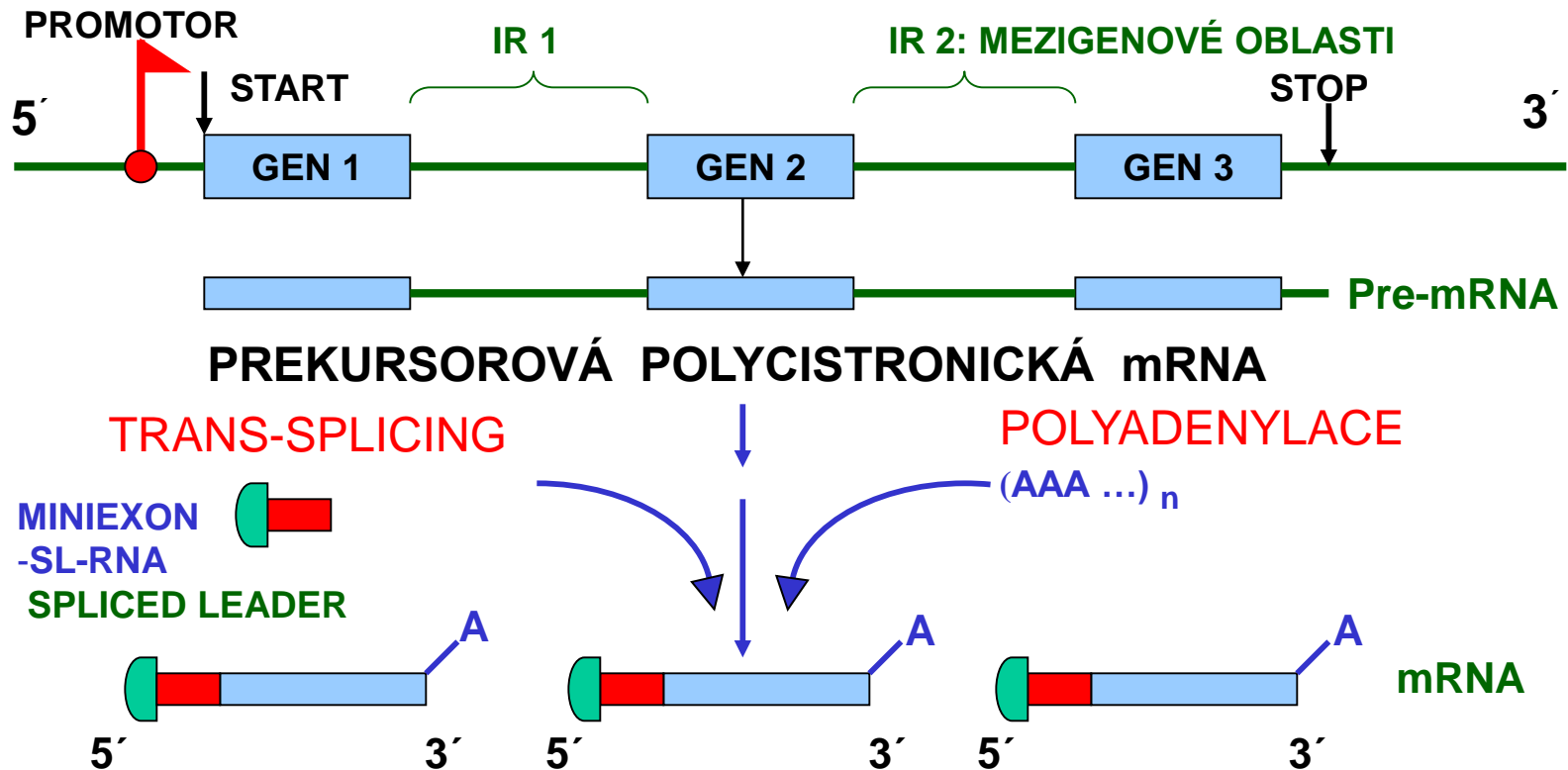
VELIKOSTNÍ POLYMORFISMUS HOMOLOGNÍCH CHROMOSOMŮ

10 – 300% MEZI RŮZNÝMI KMENY (REPETITIVNÍ ELEMENTY)

POLYCISTRONICKÁ TRANSKRIPCE

- GENY TRYPANOSOM ZPRAVIDLA NEMAJÍ INTRONY
- NA CHROMOSOMECH USPOŘÁDÁNY VE SKUPINÁCH, KTERÉ JSOU SPOLEČNĚ PŘEPISOVÁNY DO RNA

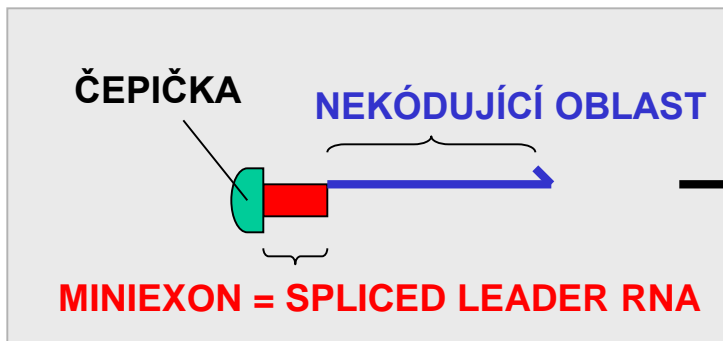
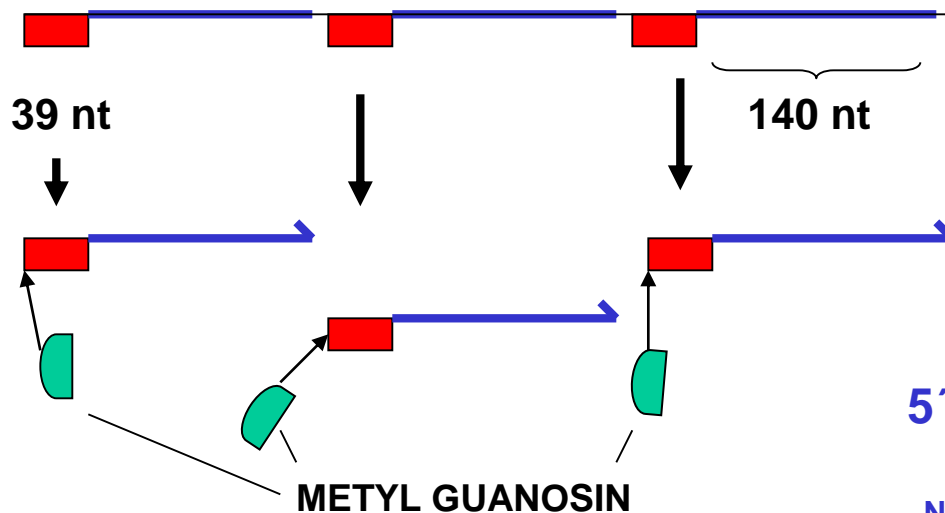
POLYCISTRONICKÁ JEDNOTKA



TRANS-SPLICING A POLYADENYLACE KOORDINOVÁNY

TRANS SPLICING

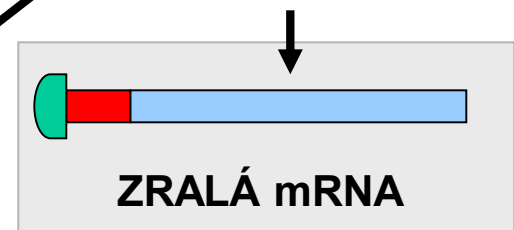
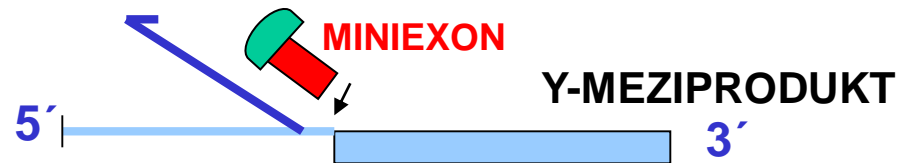
PRIMÁRNÍ PŘEPIS REPETITIVNÍ SEKVENCE



PRIMÁRNÍ PŘEPIS POLYCISTRONICKÉ JEDNOTKY

VYSTŘIŽENÍ

VAZBA MINIEXONU NA AKCEPTOROVOU RNA (aRNA)



TRANS SPLICING

DISKONTINUÁLNÍ TRANSKRIPCE

SPOJENÍ EXONŮ KÓDOVANÝCH NA RŮZNÝCH MÍSTECH GENOMU
PROBÍHÁ U PŘEPISŮ VĚTŠINY GENŮ TRYPANOSOM

Komplexní spliceosom – podobné složení jako u cis-splicingu, jiné kombinace podjednotek, jiný typ přemostění exonů

VÝZNAM:

- STABILIZACE PŘEPISŮ GENŮ VYSTŘIŽENÝCH Z PRIMÁRNÍHO PŘEPISU POLYCISTRONICKÉ JEDNOTKY NAVÁZÁNÍM SEKVENCE (MINIEXONU) S METYLGUANOSINOVOU ČEPIČKOU
- VYTVOŘENÍ FUNKČNÍHO 5' KONCE S ROZPOZNÁVACÍM SIGNÁLEM PRO RIBOSOM

VÝVOJOVÝ CYKLUS

Člověk

MNOŽENÍ

TRYPOMASTIGOT
ŠTÍHLÝ
(SLENDER)
PATOGENNÍ

DIFERENCIACE

TRYPOMASTIGOT
ŠIROKÝ
(STUMPY)
PŘENOS
NA GLOSSINU

DIFERENCIACE

TRYPOMASTIGOT
METACYKICKÝ
PŘENOS NA ČLOVĚKA

MNOŽENÍ

TRYPOMASTIGOT
PROCYKICKÝ
MESENTERON

DIFERENCIACE

TRYPOMASTIGOT
MESOCYKICKÝ
(PROVENTRIKULÁRNÍ)

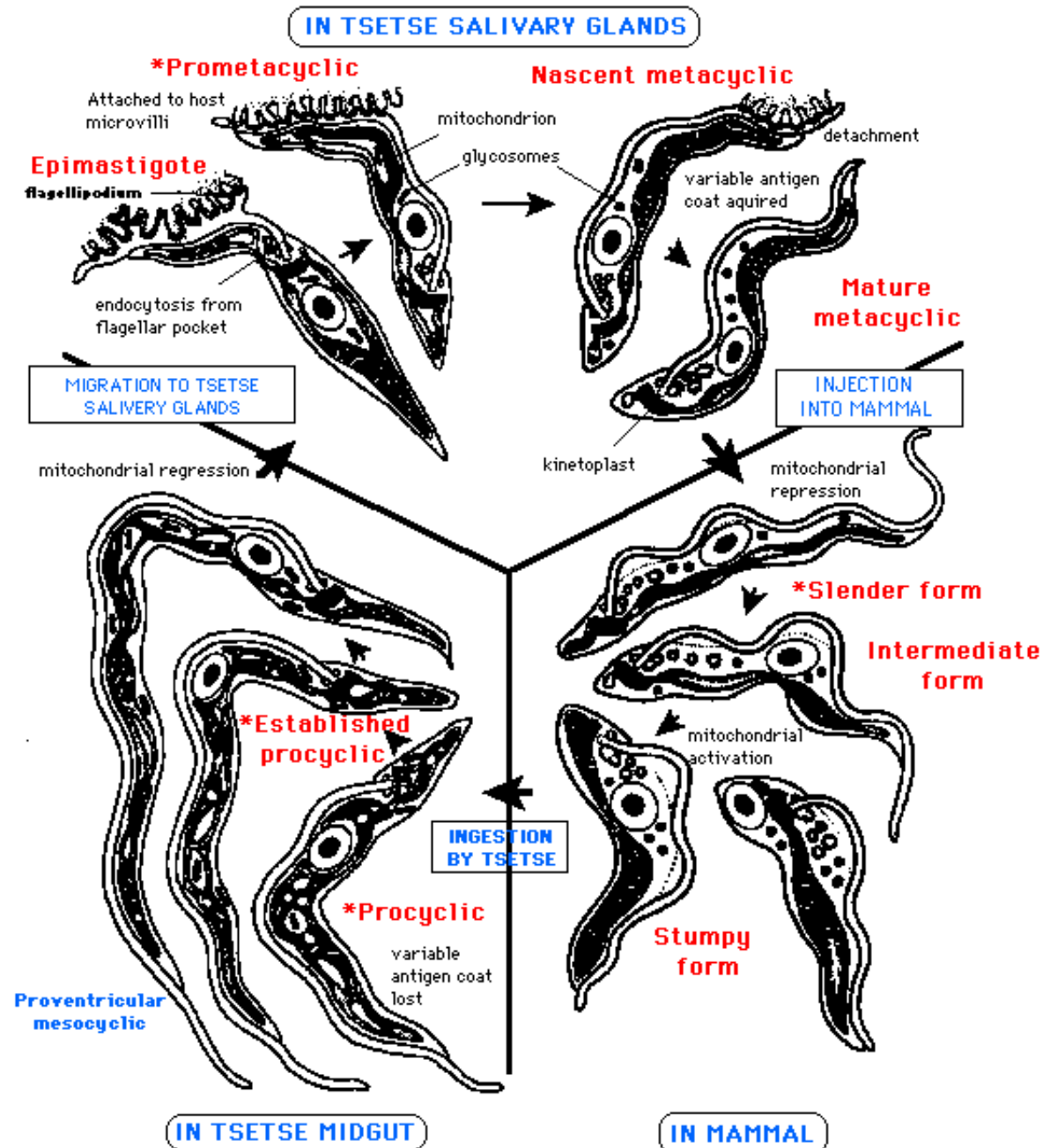
MNOŽENÍ

EPIMASTIGOT
SALIVÁRNÍ
PŘÍSEDLÝ
SLINNÉ ŽLÁZY

MIGRACE
DIFERENCIACE

Glossina

Trypanosoma brucei schematic representation of developmental cycle in a mammal and in the tsetse fly vector. (After Vickerman, 1985)



ZMĚNY ENERGETICKÉHO METABOLISMU

KREVNÍ STÁDIA

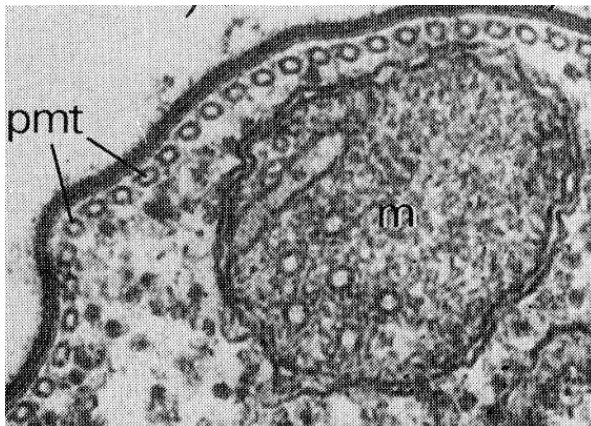
GLYKOSOMÁLNÍ METABOLISMUS
GLYKOLÝZA

GLUKÓZA → PYRUVÁT

2 ATP

MORFOLOGICKÁ
REGRESE MITOCHONDRIE

- JEDNODUCHÁ TRUBICE
- TUBULÁRNÍ KRISTY (málo)
- GLYKOSOMY KULOVITÉ



VEKTOROVÁ STÁDIA

MITOCHONDRIÁLNÍ METABOLISMUS

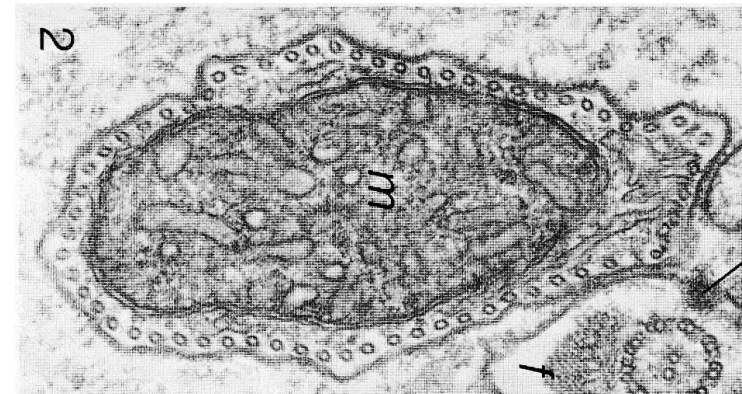
PROLIN → α -KETOGLUTARÁT
→ KREBSŮV CYKLUS

→ OXIDATIVNÍ FOSFORYLACE

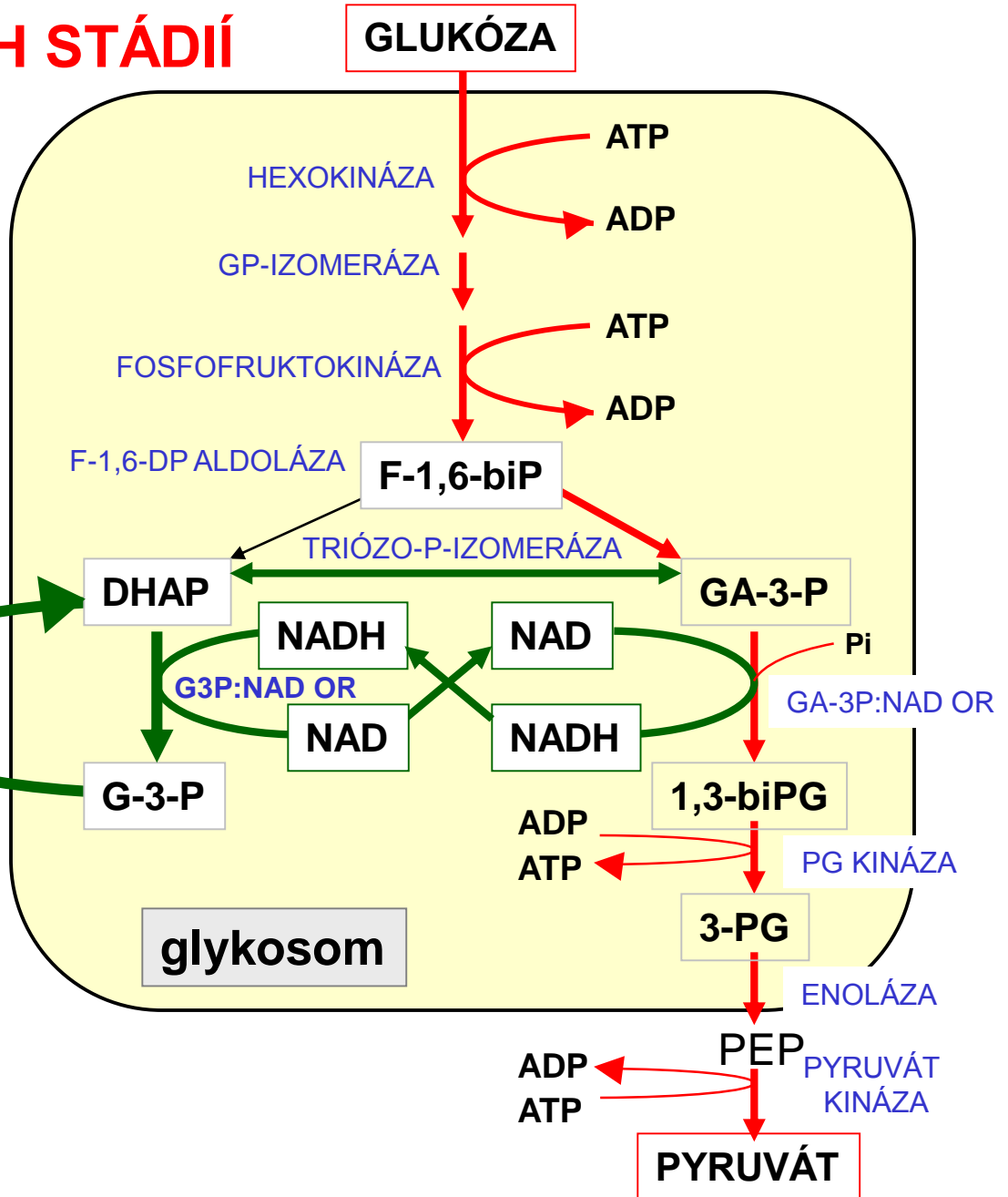
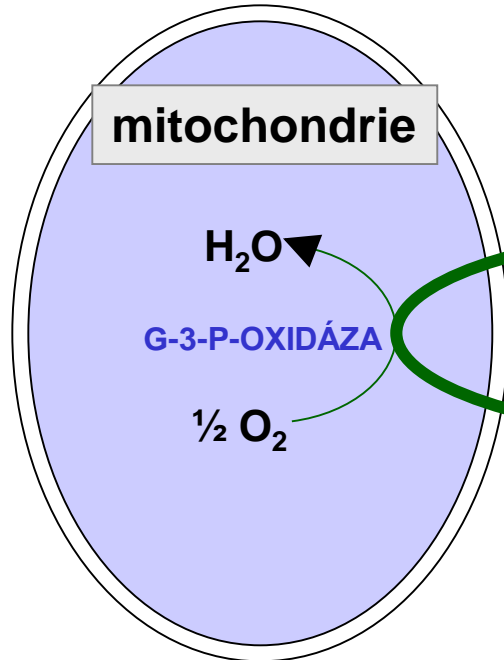
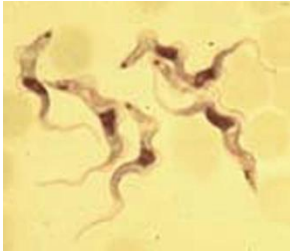
22 ATP

MORFOLOGICKÁ
EXPANZE MITOCHONDRIE

- ROZVĚTVENÁ TRUBICE
- PLÁTKOVITÉ KRISTY (hodně)
- GLYKOSOMY TYČINKOVITÉ

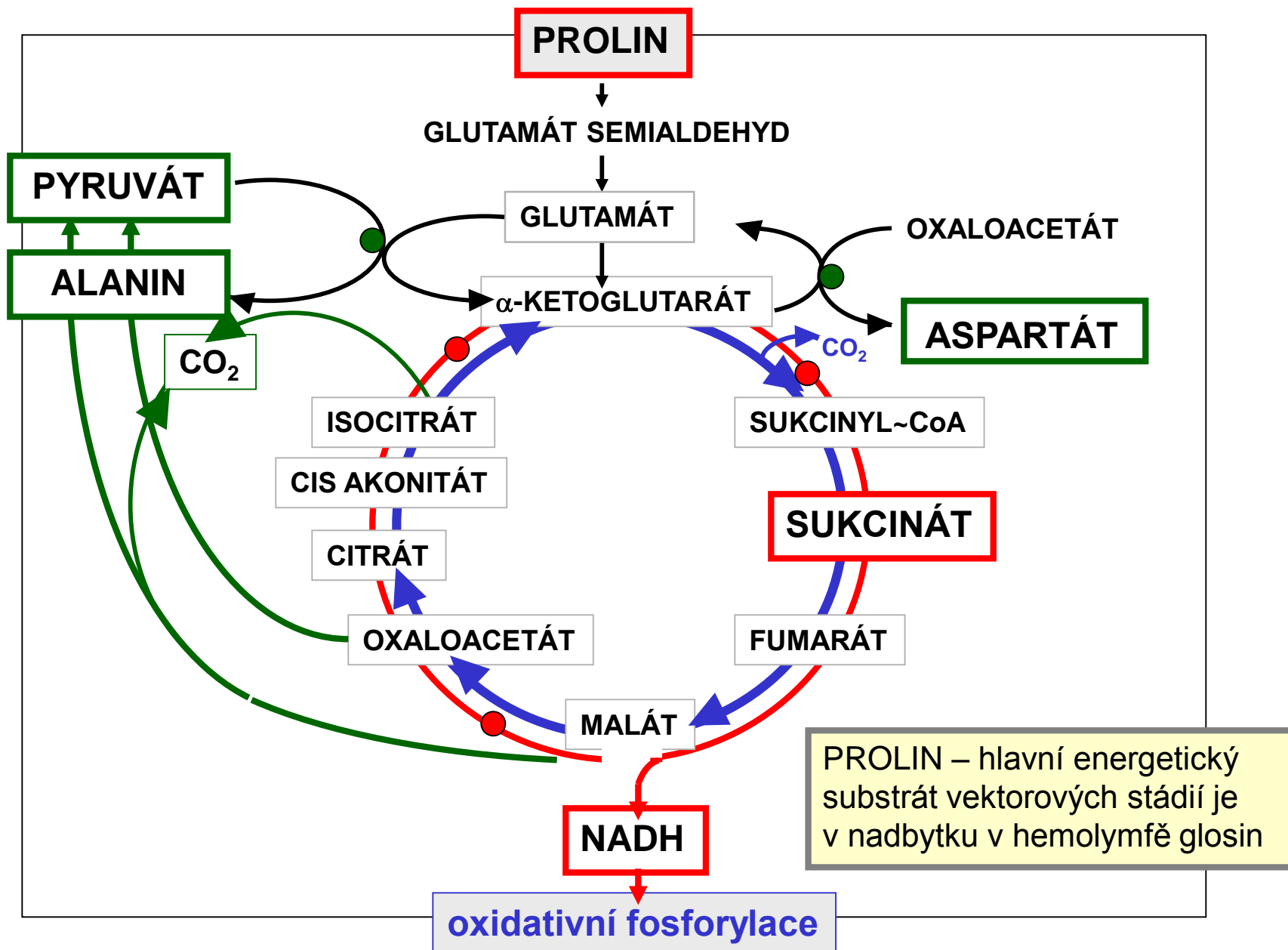


GLYKOLÝZA ŠTÍHLÝCH KREVNÍCH STÁDIÍ



GLUKÓZA – hlavní energetický substrát krevních stádií je v nadbytku v krvi člověka

METABOLISMUS PROLINU U PROCYKLICKÝCH STÁDIÍ



ZMĚNY POVRCHOVÉHO PLÁŠTĚ

KREVNÍ: VARIABILNÍ GLYKOPROTEINY **VSG**
POVRCHOVÝ PLÁŠŤ
U VŠECH KREVNÍCH FOREM A METACYKLŮ

VEKTOROVÉ: PROCYKLINY (PARP) **EP, GPEET**
KYSELÉ REPETITIVNÍ PROTEINY
POVRCH PROCYKLŮ → MESOCYKLŮ A
EPIMASTIGOTŮ SLINNÝCH ŽLAZ



POVRCH

TERMINÁLNÍ
POLYPEPTID

VSG

PROTEIN

GLYKOSYLOVANÉ
MÍSTO

GPI

**KREVŇÍ A
METACYKLICKÉ
TRYPOMASTIGOTY**

PROCYKLINY

EP

EP1,EP2

NH₂

GLYKOSYLOVANÉ
MÍSTO: EP1+, EP2-

REPETITIVNÍ
DIPEPTID:
K.GLUTAMOVÁ
PROLIN
< 25x

KYSELINA
SIALOVÁ

GPI

TRANSIALIDÁZA

**VEKTOROVÉ
PROCYKLICKÉ, MESOCYKLICKÉ
TRYPOMASTIGOTY, SALIVÁRNÍ EPIMASTIGOTY**

GPEET

TERMINÁLNÍ
POLYPEPTID

EP-DIPEPTID
3x

REPETITIVNÍ
PENTAPEPTID:
6x
GLYCIN
PROLIN
K.GLUTAMOVÁ 2x
TREONIN

GPI

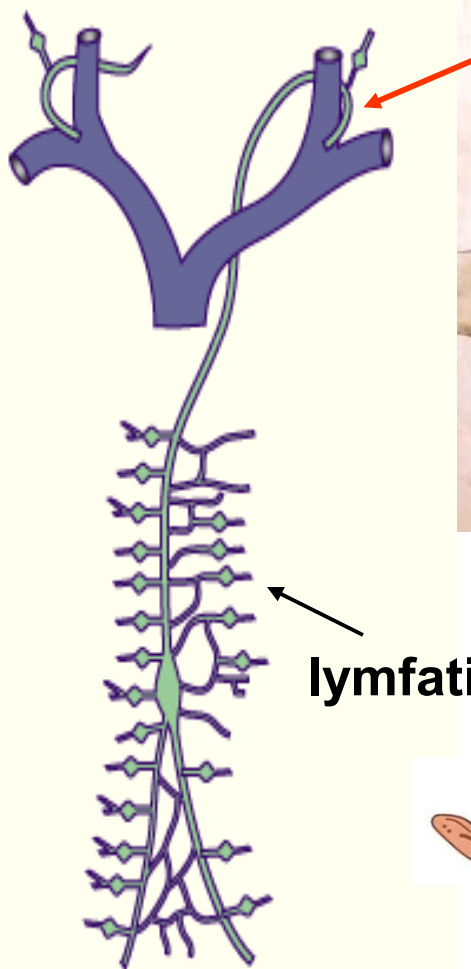
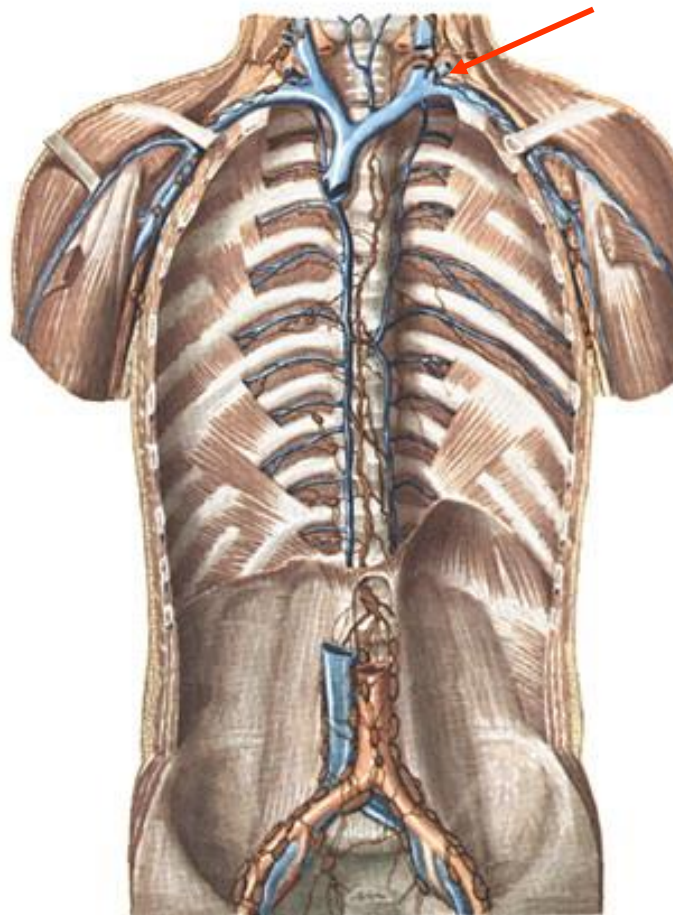
POSTUP INFEKCE A PATOGENEZE

LOKÁLNÍ ZÁNĚT ➡ GENERALIZOVANÝ ZÁNĚT ➡ INFEKCE CNS

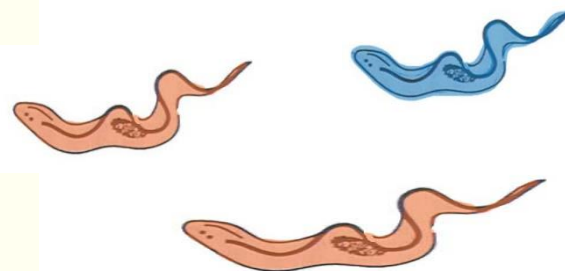
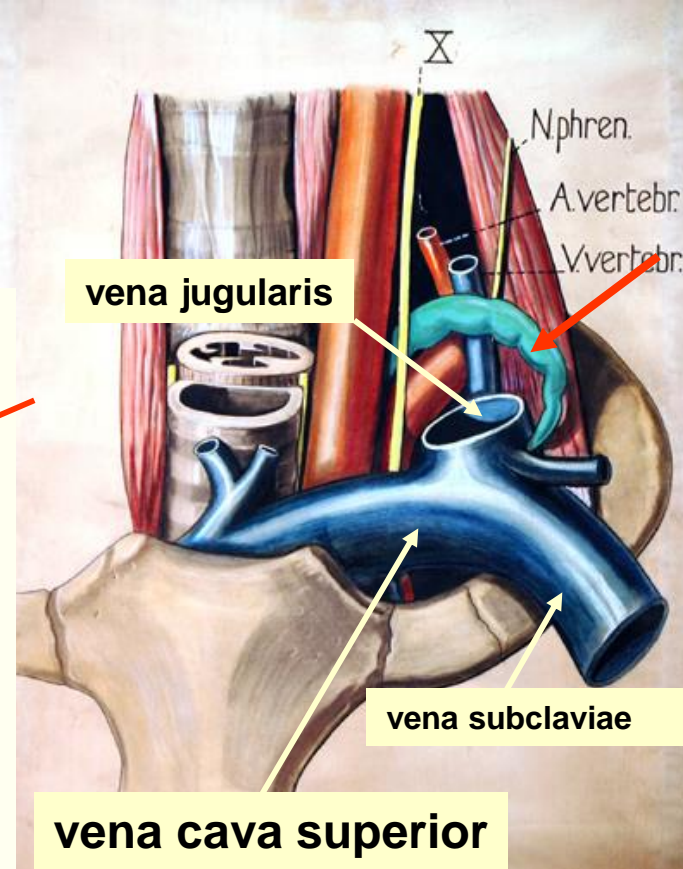


DUCTUS THORACICUS

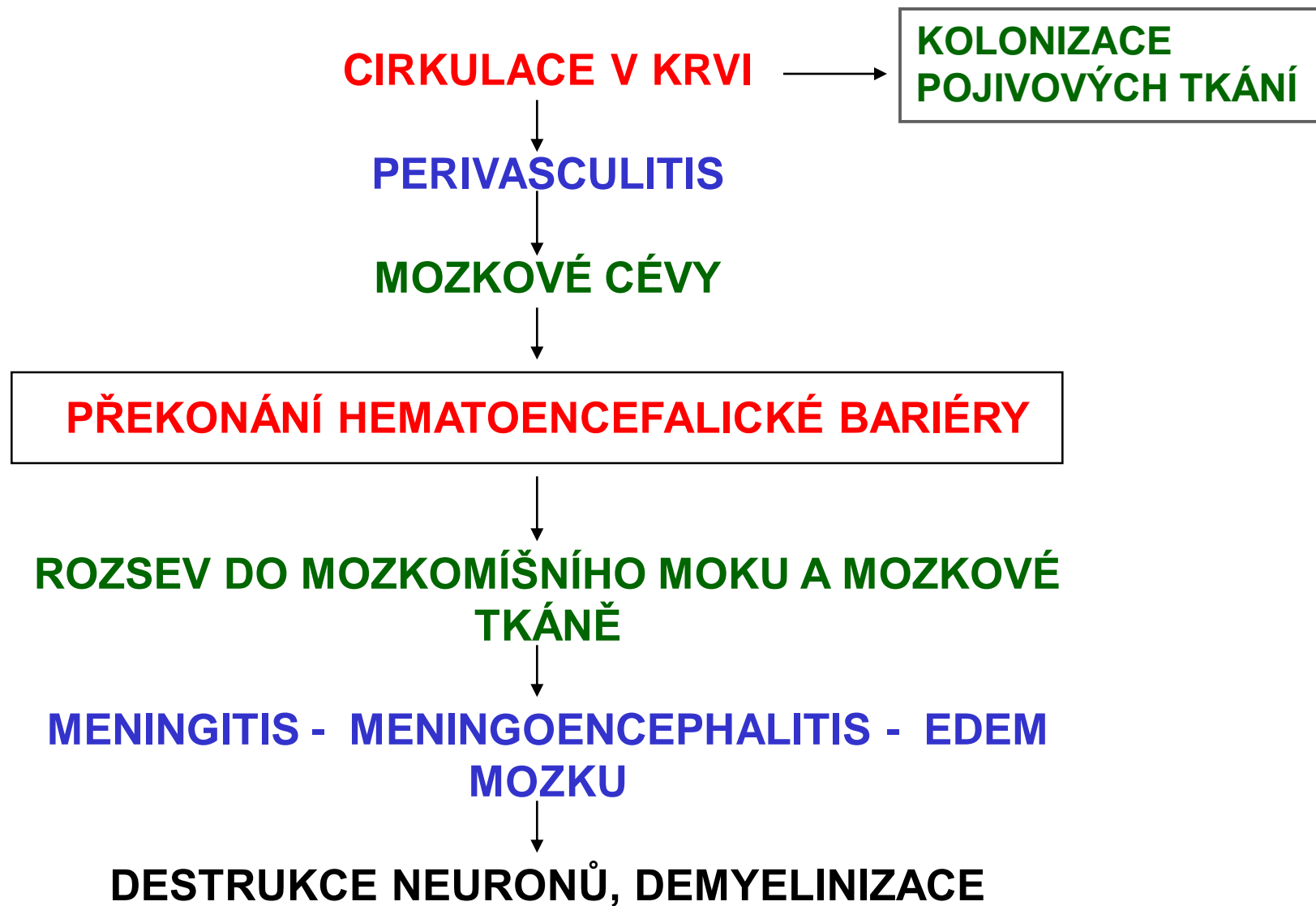
MÍSTO PŘESTUPU TRYPANOSOM
Z LYMFY DO KRVE



lymfatické dráhy



POSTUP INFEKCE A PATOGENEZE



SPAVÁ NEMOC

INKUBAČNÍ DOBA: 6 – 14 DNÍ

1. LOKÁLNÍ ZÁNĚT

GRAFŮV ŠANKR

PRIMÁRNÍ REAKCE V MÍSTĚ INFEKCE



SPAVÁ NEMOC

2. HEMO-LYMFATICKÉ STÁDIUM

~ 2 ROKY

LYMFADENITIS

↓
CERVIKÁLNÍ UZLINY

↓
GENERALIZACE

- NEPRAVIDELNÉ HOREČKY
- ANEMIE
- BOLESTI HLAVY A KLOUBŮ
- ÚNAVA → KACHEXIE
- SPLENOMEGALIE



SPAVÁ NEMOC

3. MENINGO-ENCEFALITICKÉ STÁDIUM

~ 4- 8 LET

- RŮZNÉ NEUROLOGICKÉ PŘÍZNAKY
- ZMĚNY PSYCHIKY
- PORUCHY SPÁNKOVÉHO RYTMU
- BOLESTI HLAVY (PŘETRVÁVAJÍCÍ)
- ANOREXIE
- APATIE – SPAVOST
- PSYCHICKÝ A FYZICKÝ ÚPADEK

KOMA



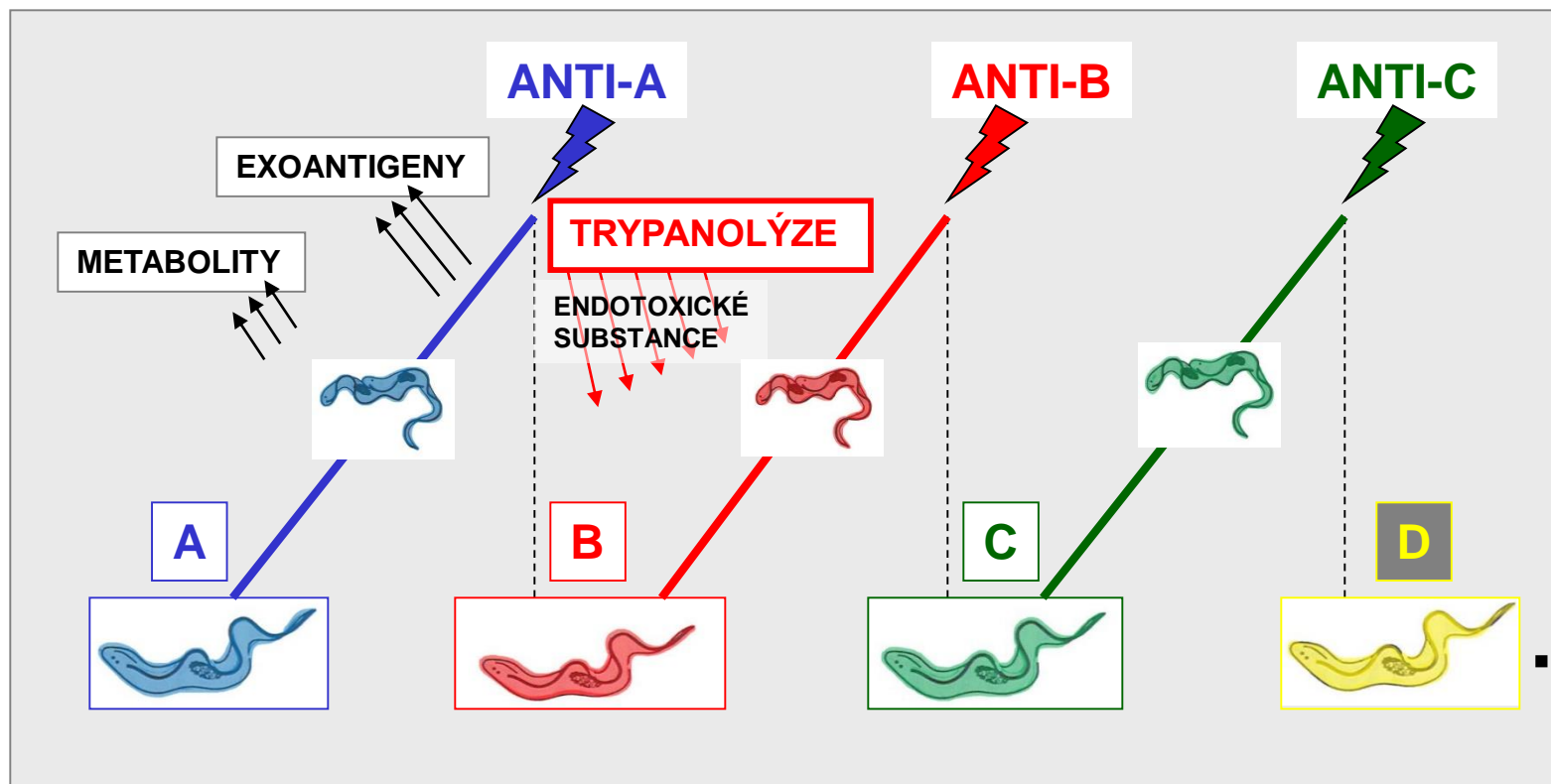
SMRT



ČASTO PŘEDČASNÁ SMRT NA PŘIDRUŽENÉ INFEKCE - IMUNOSUPRESE

ANTIGENNÍ PROMĚNLIVOST

OPAKOVANÉ NAMNOŽOVÁNÍ A ZÁNİK POPULACÍ TRYPANOSOM

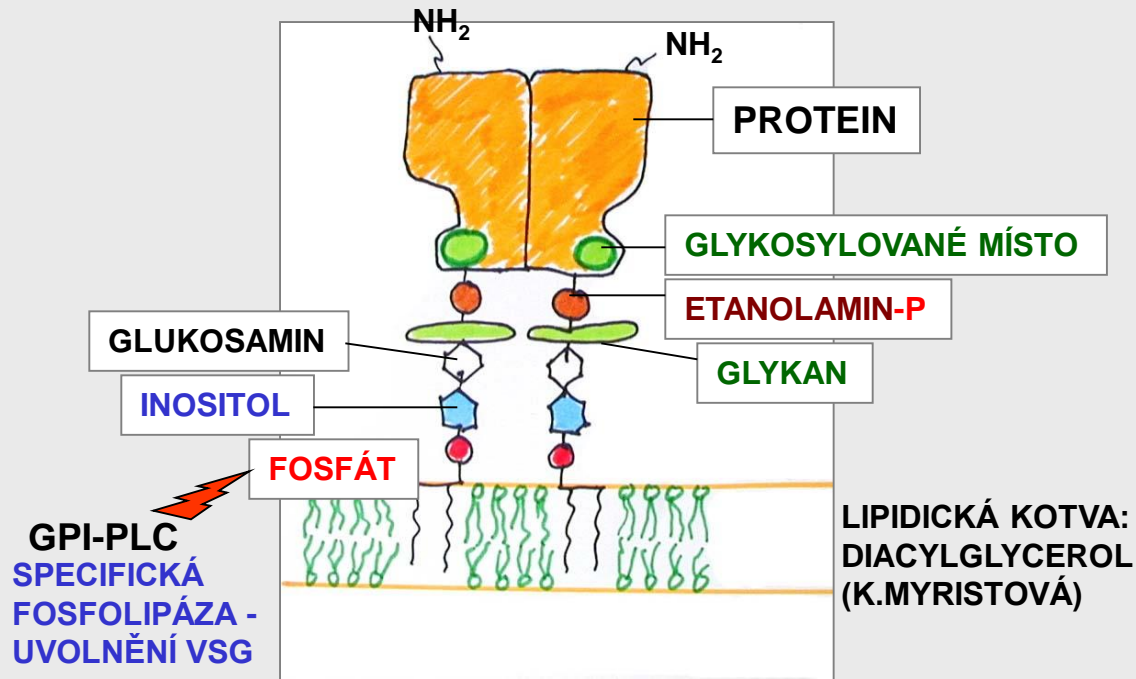


VSG (VARIANT SURFACE GLYCOPROTEIN) – POVRCHOVÝ GLYKOPROTEIN
CHARAKTERISTICKÝ PRO DANOU ANTIGENNÍ VARIANTU

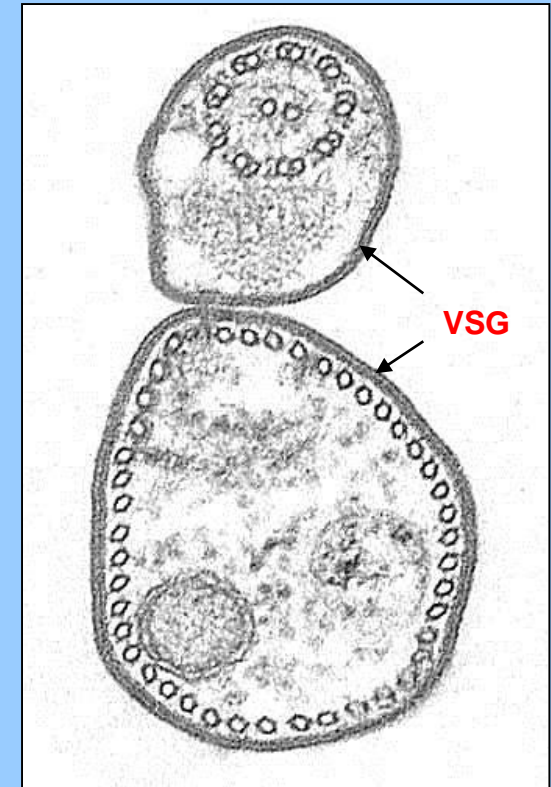
VAT (VARIANT ANTIGENIC TYPE) – POPULACE EXPRIMUJÍCÍ STEJNÝ VAT

VSG

50 – 65 kDa GLYKOPROTEINY
NA MEMBRÁNĚ DIMERY S GLYKOSYLFOSFATIDYL
INOSITOLOVOU KOTVOU (GPI)

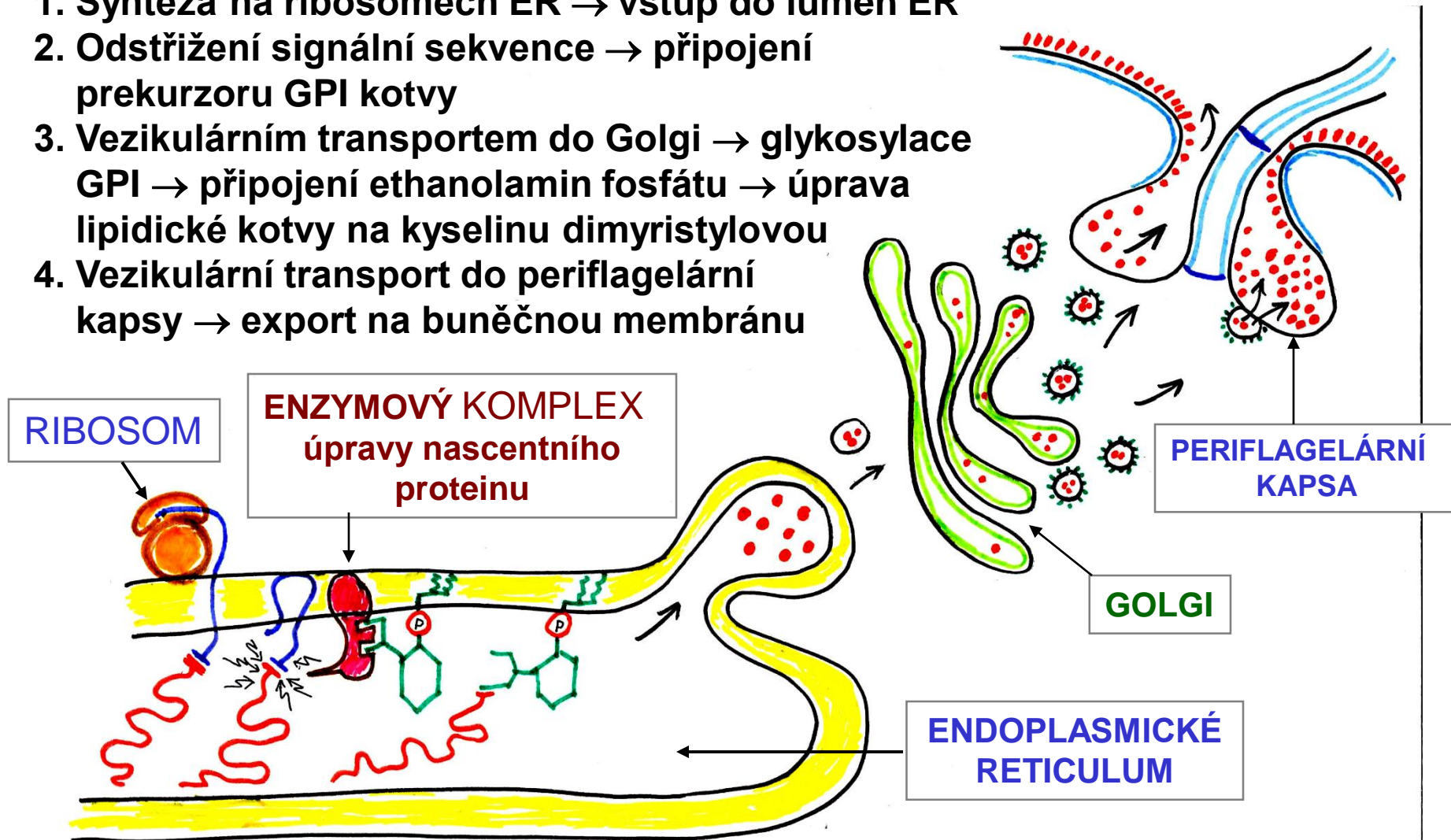


KOMPLETNÍ POVRCHOVÝ PLÁŠŤ 12-15 nm
VŽDY Z JEDINÉHO VSG
KONSTANTNÍ OBLAST
VARIABILNÍ OBLAST ~ 30 TERMINÁLNÍCH AMINOKYSELIN
ŽÁDNÝ ZKŘÍŽENÝ PROTEKTIVNÍ ÚČINEK



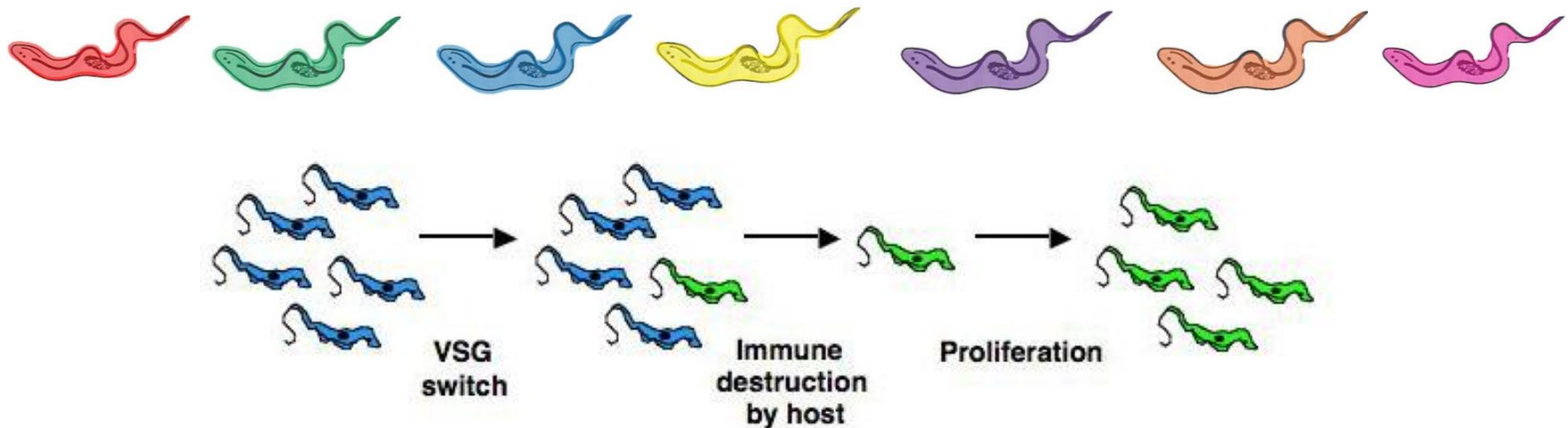
SYNTÉZA, ÚPRAVY A EXPORT VSG

1. Syntéza na ribosomech ER → vstup do lumen ER
2. Odstřížení signální sekvence → připojení prekurzoru GPI kotvy
3. Vezikulárním transportem do Golgi → glykosylace GPI → připojení ethanolamin fosfátu → úprava lipidické kotvy na kyselinu dimyristylovou
4. Vezikulární transport do periflagelární kapsy → export na buněčnou membránu



Rychlý proces: Připojení prekurzoru GPI kotvy – sekundy. Transport na buněčnou membránu ~ 15 minut.

PRŮBĚH ANTIGENNÍ PROMĚNLIVOSTI



- **EXPRIMOVÁN VŽDY JEN 1 VSG**
- NÁSTUP VARIANT V PŘEDVÍDATELNÉM SLEDU
- NEJDE O SELEKCI PREEXISTUJÍCÍCH VARIANT ZE SMÍŠENÉ POPULACE (**I KLON JE VARIABILNÍ**)
- NEJDE O MUTACE DE NOVO VZNIKLÉ V PRŮBĚHU INFEKCE

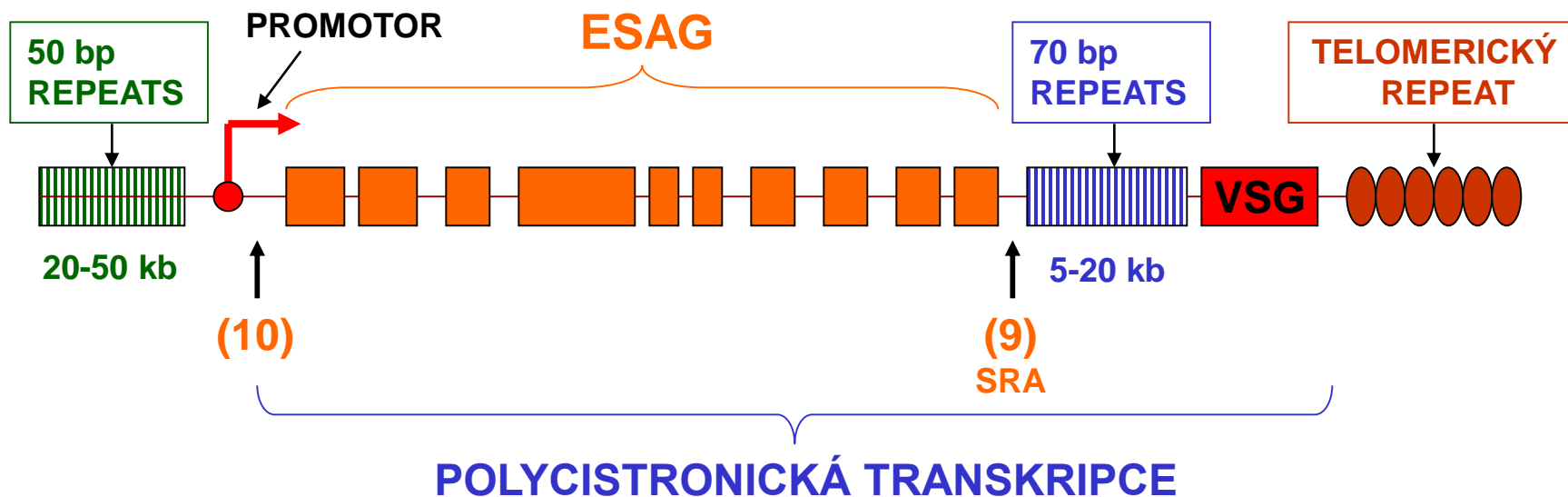
KAŽDÝ VSG KÓDOVÁN VLASTNÍM GENEM

V JADERNÉ DNA *T.brucei* 1250 – 1500 VSG GENŮ

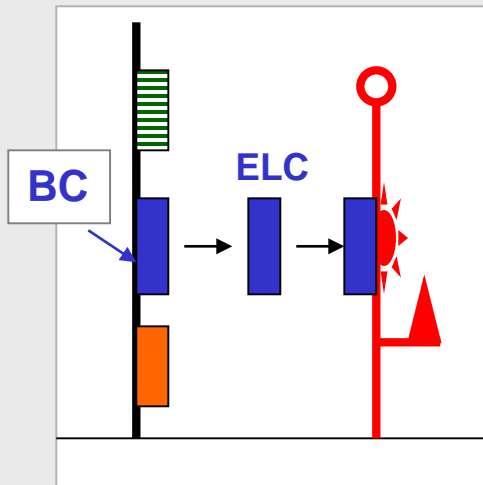
TRANSKRIPCE VSG GENŮ

MOŽNÁ POUZE Z TELOMERICKÉHO MÍSTA EXPRESE
V GENOMU ~ 15 EXPRESNÍCH MÍST
NA INTERMEDIÁRNÍCH A VELKÝCH CHROMOSOMECH

MÍSTO EXPRESE PRO VSG GENY ŠTÍHLÝCH KREVNÍCH FOREM



HLAVNÍ ZPŮSOBY EXPRESE VSG

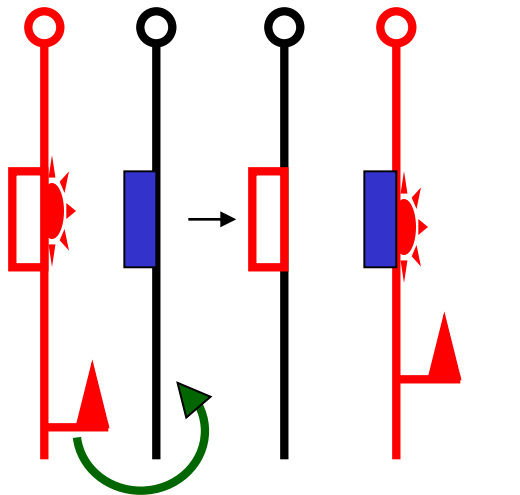


NEJČASTĚJI:

GENOVÁ KONVERZE
DUPLIKATIVNÍ TRANSPOZICI

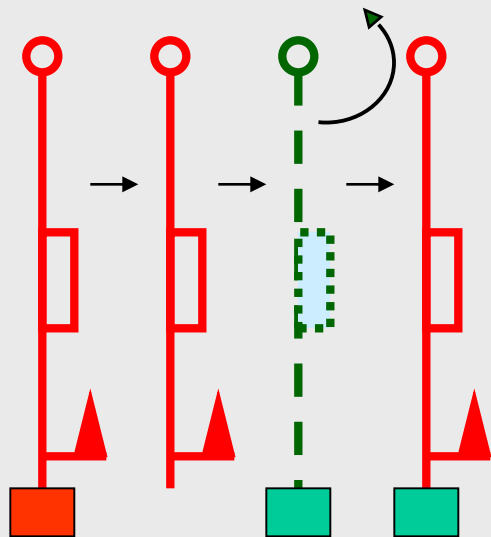
BC – BAZÁLNÍ KOPIE

ELC – „EXPRESSION LINKED COPY“

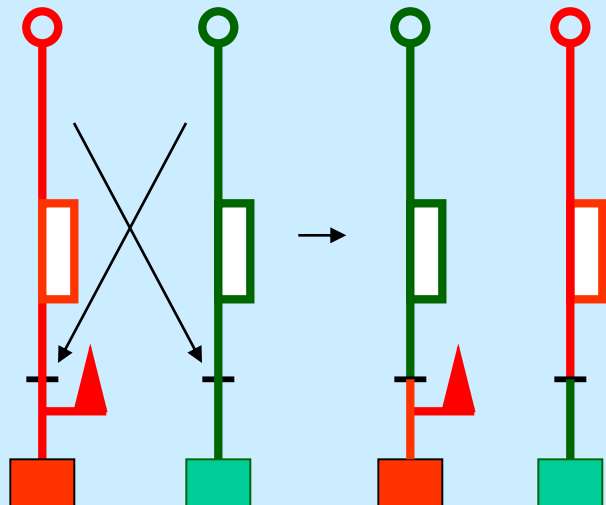


AKTIVACE IN SITU

= AKTIVACE EXPRESNÍHO MÍSTA



KONVERZE TELOMÉR
 DUPLIKATIVNÍ TRANSPOZICE
 CELÉ AKTIVNÍ TELOMÉRY



VÝMĚNA TELOMÉR
 CROSSOVER
 KONCŮ CHROMOSOMŮ

PATOLOGICKÉ DŮSLEDKY ANTIGENNÍ PROMĚNLIVOSTI

- PERMANENTNÍ EXPOZICE HOSTITELE ANTIGENŮM TRYPANOSOM
- OPAKOVANÉ REAKCE ANTIGEN \longleftrightarrow PROTILÁTKA
BEZ PROTEKTIVNÍHO ÚČINKU
- OPAKOVANÉ ZAPLAVOVÁNÍ CIRKULAČNÍHO SYSTÉMU HOSTITELE
TOXICKÝMI A BIOLOGICKY AKTIVNÍMI PRODUKTY DESTRUKCE
TRYPANOSOM

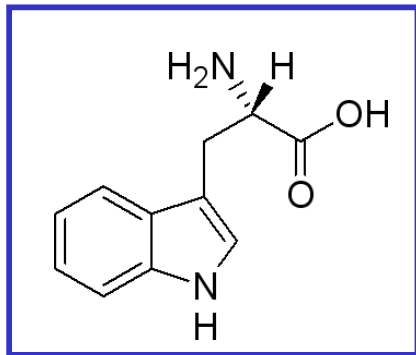


DŮSLEDKY:

- **IMUNOPATOLOGICKÉ PROCESY**
PROVOKACE ZÁNĚTU
TVORBA IMUNNÍCH KOMPLEXŮ
- **ROZLADĚNÍ FYZIOLOGICKÝCH REGULACÍ**
- **IMUNOSUPRESE**

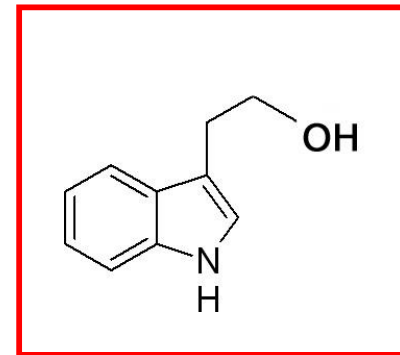
TOXICKÉ METABOLITY TRYPANOSOM

TRYPTOPHAN

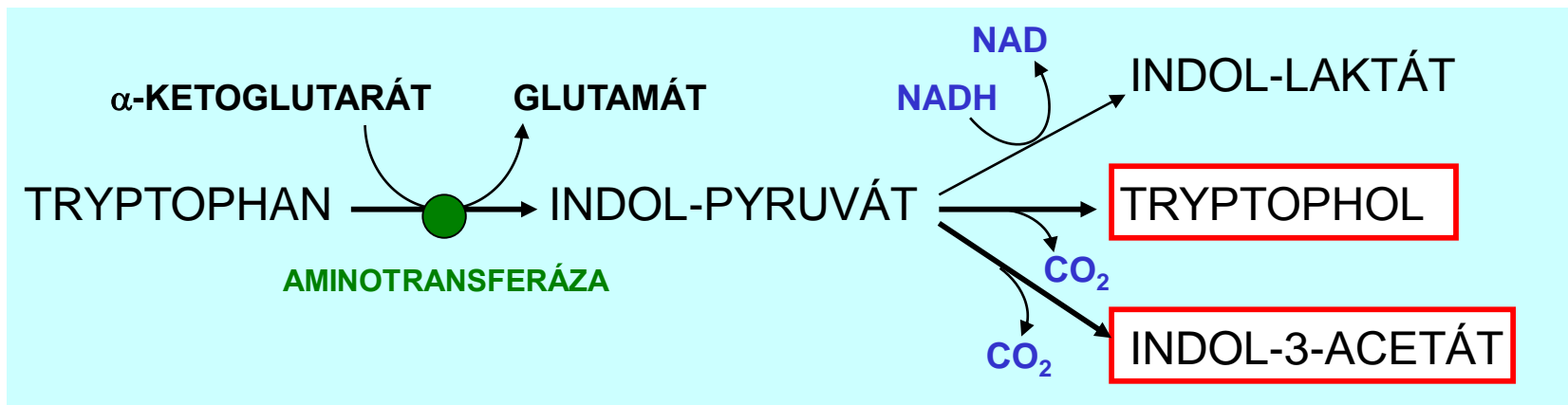


PRODUKTY METABOLISMU TRYPTOPHANU

TRYPTOPHOL



= INDOL-3-ETANOL

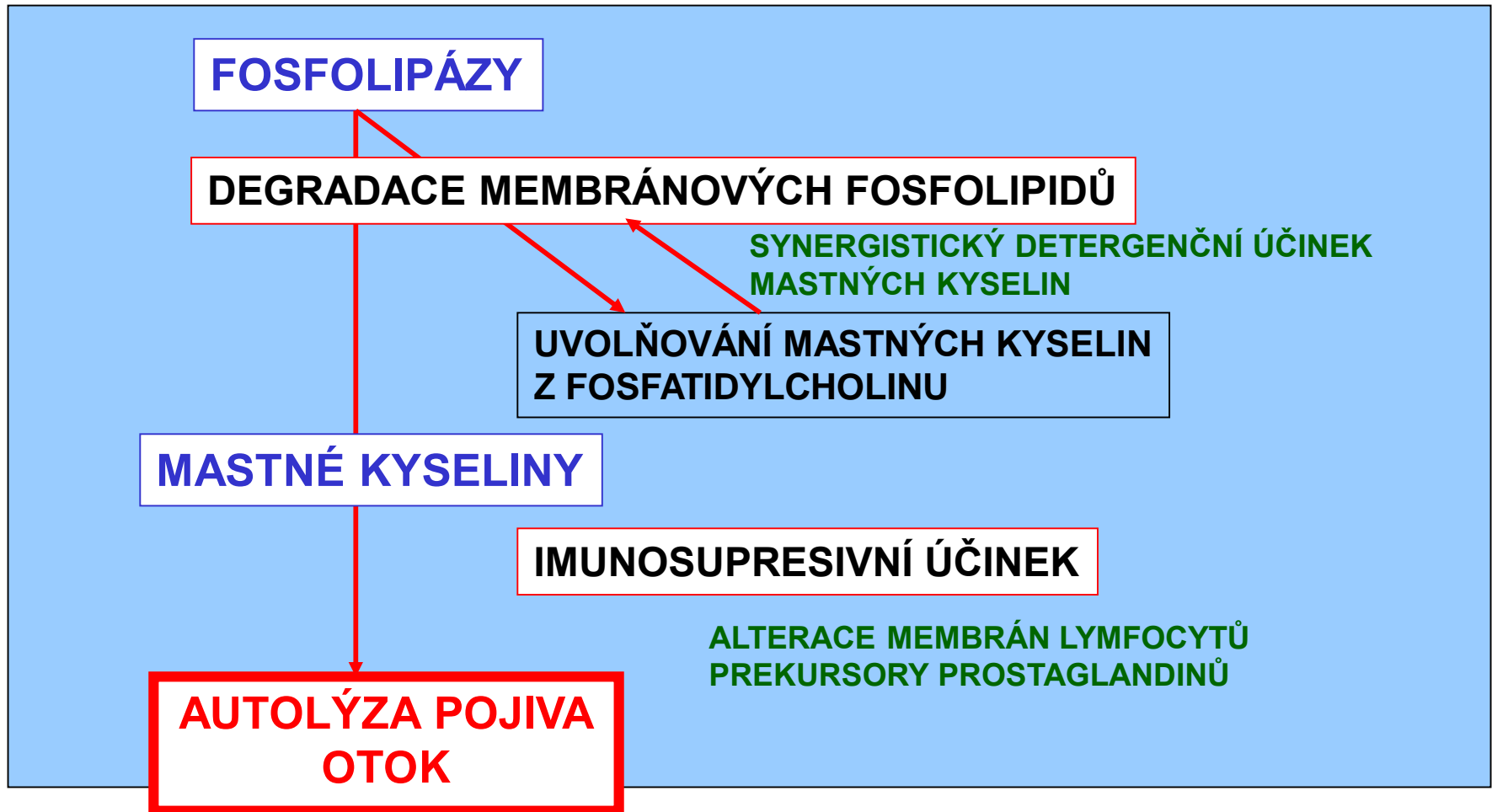


TRYPTOPHOL A INDOL-3-ACETÁT JSOU NARKOTIKA

ALTERACE PERMEABILITY SYNAPTICKÝCH MEMBRÁN ODPOVÍDÁ SYMPTOMŮM
2. – 3. STÁDIA SPAVÉ NEMOCI

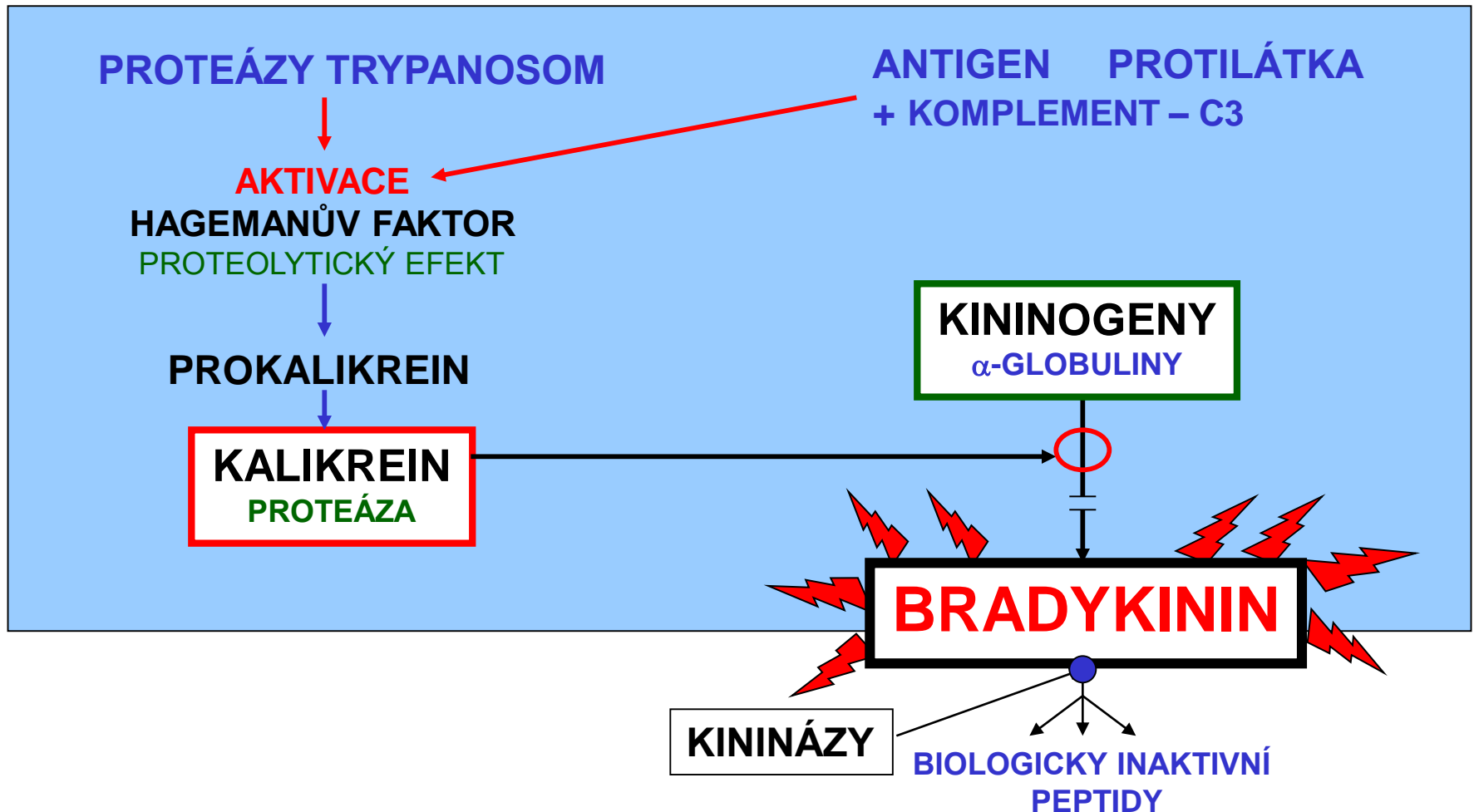
PRODUKTY UVOLNĚNÉ PŘI DESTRUKCI TRYPANOSOM

• FOSFOLIPÁZY A MASTNÉ KYSELINY



PRODUKTY UVOLNĚNÉ PŘI DESTRUKCI TRYPANOSOM

- **KININY** KARDIOVASKULÁRNÍ REGULÁTORY



DŮSLEDKY NADPRODUKCE KININU

ZVÝŠENÍ PROPUSTNOSTI CÉV
ÚNIK TEKUTIN

OTOK

ZPOMALENÍ CÍRKULACE KRVE

PERIFERNÍ HYPOXIE

ANOXIE

AUTOLYTICKÉ PROCESY
INDUKCE ZÁNĚTU

GENERALIZOVANÝ ZÁNĚT

IMUNOPATOLOGICKÉ PROCESY

IMUNOKOMPLEXY

1. VAZBA NA ERYTHROCYTY

ZVÝŠENÉ ODSTRAŇOVÁNÍ MAKROFÁGY VE SLEZINĚ

→ **ANÉMIE**

2. VAZBA NA ENDOTEL CÉV

CHEMOATRAKTIVNÍ EFEKT NAVÁZANÝCH KOMPLEXŮ
PRO ZÁNĚTLIVÉ BUŇKY

→ **PERIVASCULITIS**

V RŮZNÝCH TKÁNÍCH

V SRDCI → MYOCARDITIS

V MOZKU → MENINGITIS

ENCEPHALITIS

3. USAZOVÁNÍ V KAPILÁRÁCH GLOMERULŮ LEDVIN

→ **ZÁNĚT LEDVIN GLOMERULONEPHRITIS**

IMUNOSUPRESE

VĚTŠINA NEMOCNÝCH ZEMŘE NA PŘIDRUŽENÉ INFEKCE

1. PRODUKCE B-MITOGENU PARAZITY

POLYKLONÁLNÍ STIMULACE B-BUNĚK

ÚTLUM SPECIFICKÉ ODPOVĚDI

LYMFOIDNÍ B-HYPERPLASIE

SPLENOMEGALIE

2. HYPOKOMPLEMENTEMIE

VYČERPÁNÍ CHRONICKOU NEFUNKČNÍ AKTIVACÍ

3. DESORGANIZACE LYMFOIDNÍ TKÁNĚ

PŘÍČINY:

ZÁNĚT VYVOLANÝ CHRONICKOU PŘÍTOMNOSTÍ PARAZITŮ

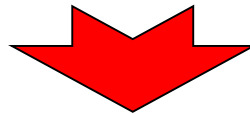
CYTOTOXICKÝ ÚČINEK NADPRODUKCE TNF- α

SPAVÁ NEMOC - ZANEDBÁVANÁ INFEKCE (NEGLECTED DISEASE)

výskyt v 36 afrických státech ~ 50 milionů lidí v rizikových oblastech

1960 PŘENOS INFEKCE TÉMĚŘ ZASTAVEN

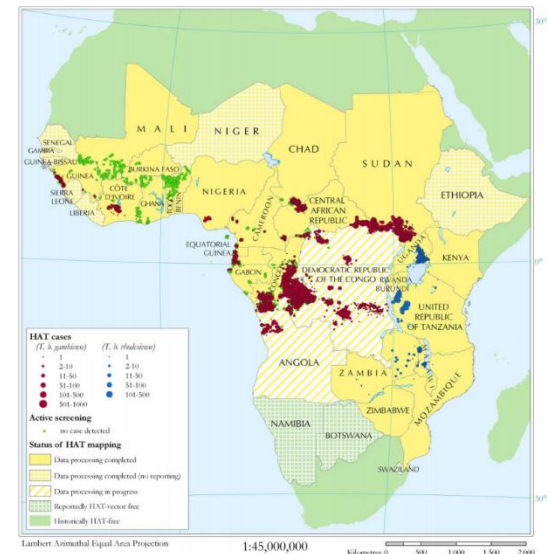
Nezájem nových vlád, zanedbané sledování a léčba, nedostatek financí a neatraktivita pro farmaceutické firmy, občanské války, přesuny obyvatelstva a rozpad zdravotnické infrastruktury



NÁVRAT SPAVÉ NEMOCI

nová ohniska (Kongo, Středoafrická Republika, Angola, Sudán)

Distribution of human African trypanosomiasis
(African sleeping sickness)



Cases

50,000

40,000

30,000

20,000

10,000

0

1940

1943

1946

1949

1952

1955

1958

1961

1964

1967

1970

1973

1976

1979

1982

1985

1988

1991

1994

1997

2000

2003

2006

2009

2012

Year

Patient non-infecté

Patient infecté

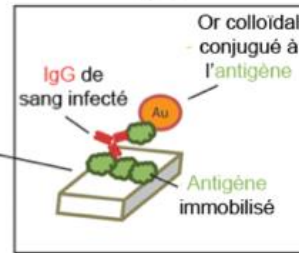


Contrôle

Test

Sérum ou sang

Test



Boj a ochrana – glossiny

- postřiky míst odpočinku dospělců insekticidy, není známa rezistence
- aplikace opticky atraktivních pastí napuštěných pyretroidy
- vypouštění sterilních samců, úspěšná eradikace na Zanzibaru



G. fusca



G. morsitans



G. palpalis



ZÁVĚR

- DÍKY CYKlickÉ VÝMĚNĚ POVRCHOVÝCH ANTIGENŮ TRYPANOSOMY DLOUHODOBĚ PŘÍTOMNÉ V HOSTITELI
- KOMPLEXNÍMI MECHANISMY VYVOLÁVAJÍ ŘETĚZOVÉ PATOFYZIOLOGICKÉ STAVY VEDOUcí K VYČERPÁVÁNÍ A NÁSLEDNĚ ZHROUCENÍ IMUNITY
- CHRONICKÝ PRŮBĚH NEMOCI JE VÝHODNÝ PRO PARAZITA, ALE NEVEDE KE ZMÍRNĚNÍ PATOGENITY A NEODVRÁTÍ SMRT HOSTITELE