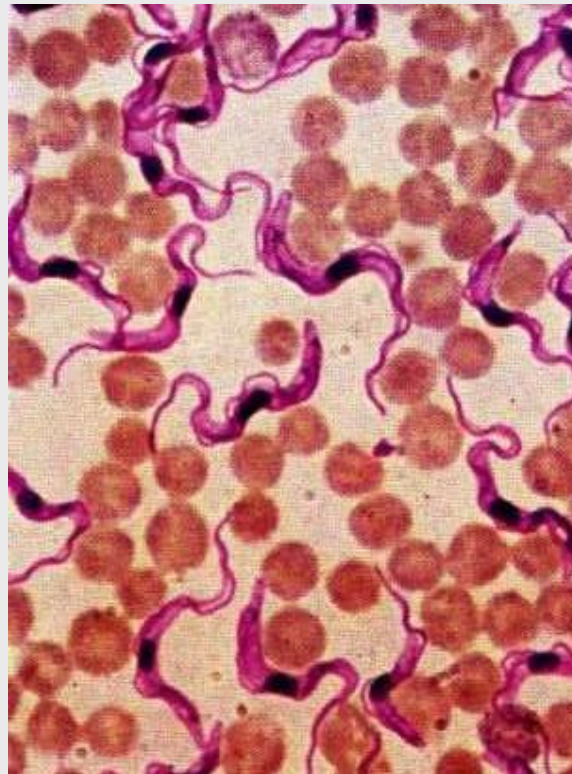
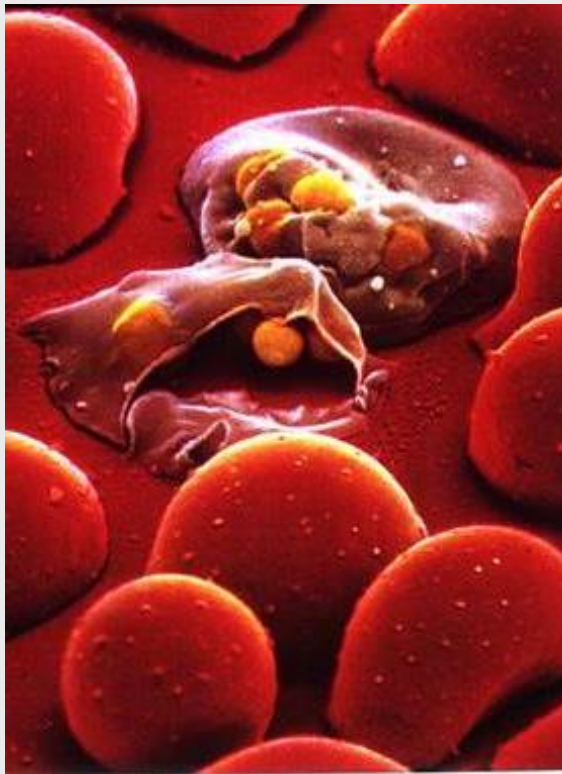


Co nás dnes čeká ...

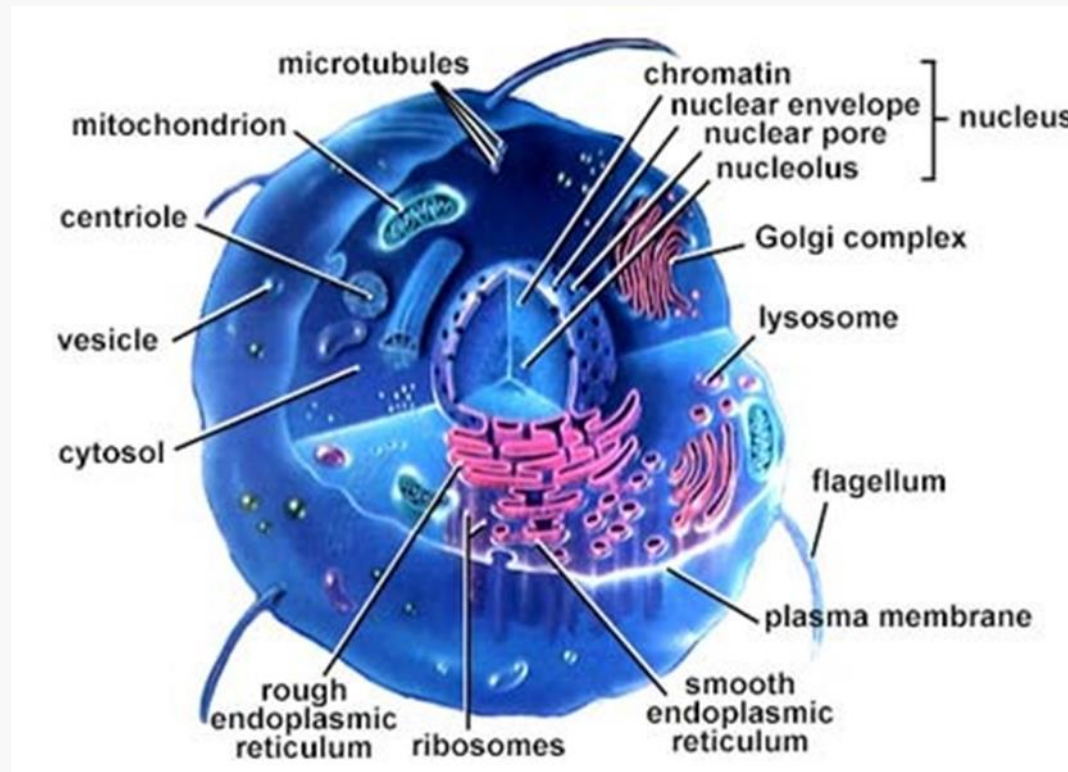
- Specifika buněčné stavby parazitických protozoí
- Protozoární infekce slizničních povrchů (*Giardia, Trichomonas*)
- Parazitická protozoa tělních tekutin (africké trypanosomy)
- Intracelulární parazitismus protozoí (*Trypanosoma cruzi, Leishmania, Plasmodium*)

BUŇKA PRVOKŮ

specifika parazitických protozoí








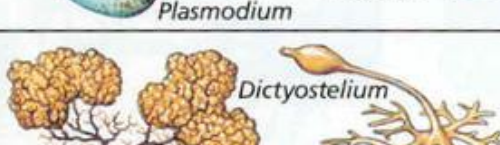


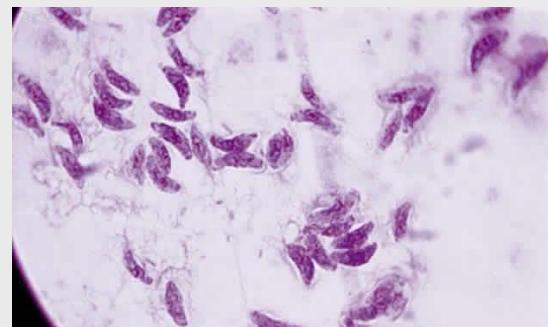
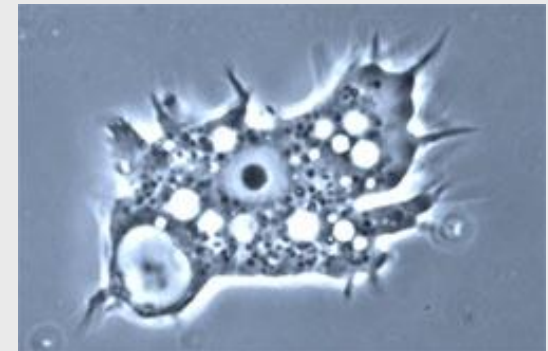
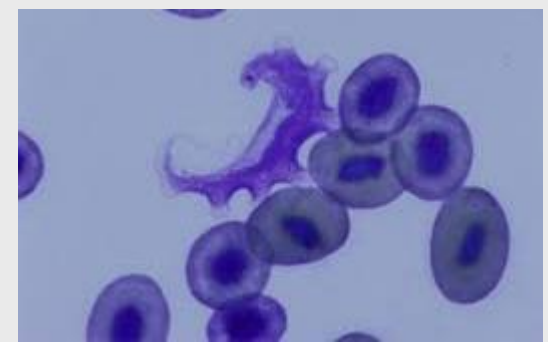
PROTISTA – jednobuněčná eukaryota



Protist Kingdom

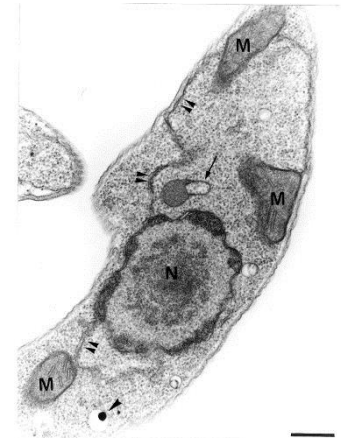
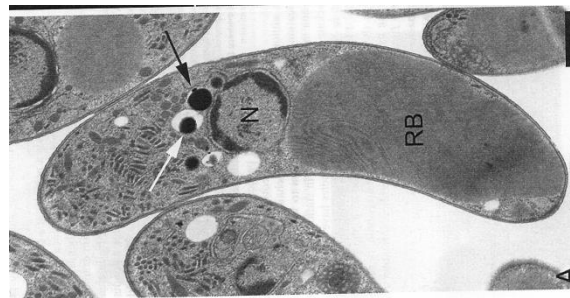
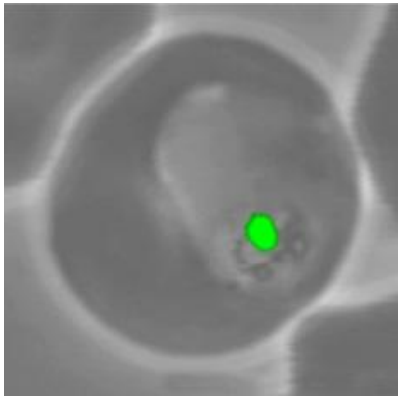
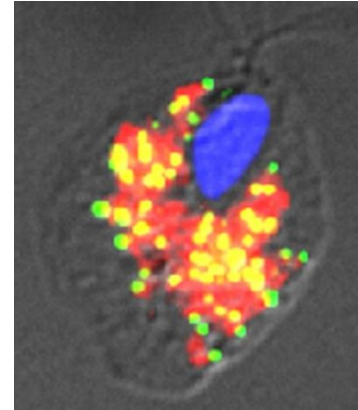
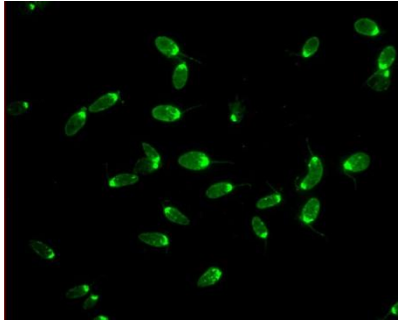
Kingdom Protista

Phylum	Some characteristics	Examples
Euglenophyta (euglenoids)	one-celled make or take in food most have one flagellum	 <p><i>Euglena</i> <i>Phacus</i></p>
Chrysophyta (golden algae)	most are one-celled make own food yellow-brown color	 <p><i>Synedra</i> <i>Diatoma</i></p>
Pyrrophyta (dinoflagellates)	one-celled take in food have two flagella	 <p><i>Gonyaulax</i> <i>Peridinium</i></p>
Sarcodina (sarcodines)	one-celled take in food have pseudopods	 <p><i>Amoeba</i> <i>Globigerina</i></p>
Ciliophora (ciliates)	one-celled take in food have cilia	 <p><i>Paramecium</i> <i>Didinium</i> <i>Vorticella</i></p>
Mastigophora (flagellates)	one-celled take in food have two or more flagella	 <p><i>Trypanosoma</i> <i>Trichomonas</i></p>
Sporozoa (sporozoans)	one-celled take in food no means of movement	 <p><i>Plasmodium</i> <i>Gregarina</i></p>
Myxomycetes (slime molds)	many- or one-celled absorb food change form during life cycle	 <p><i>Dictyostelium</i> <i>Physarum</i></p>



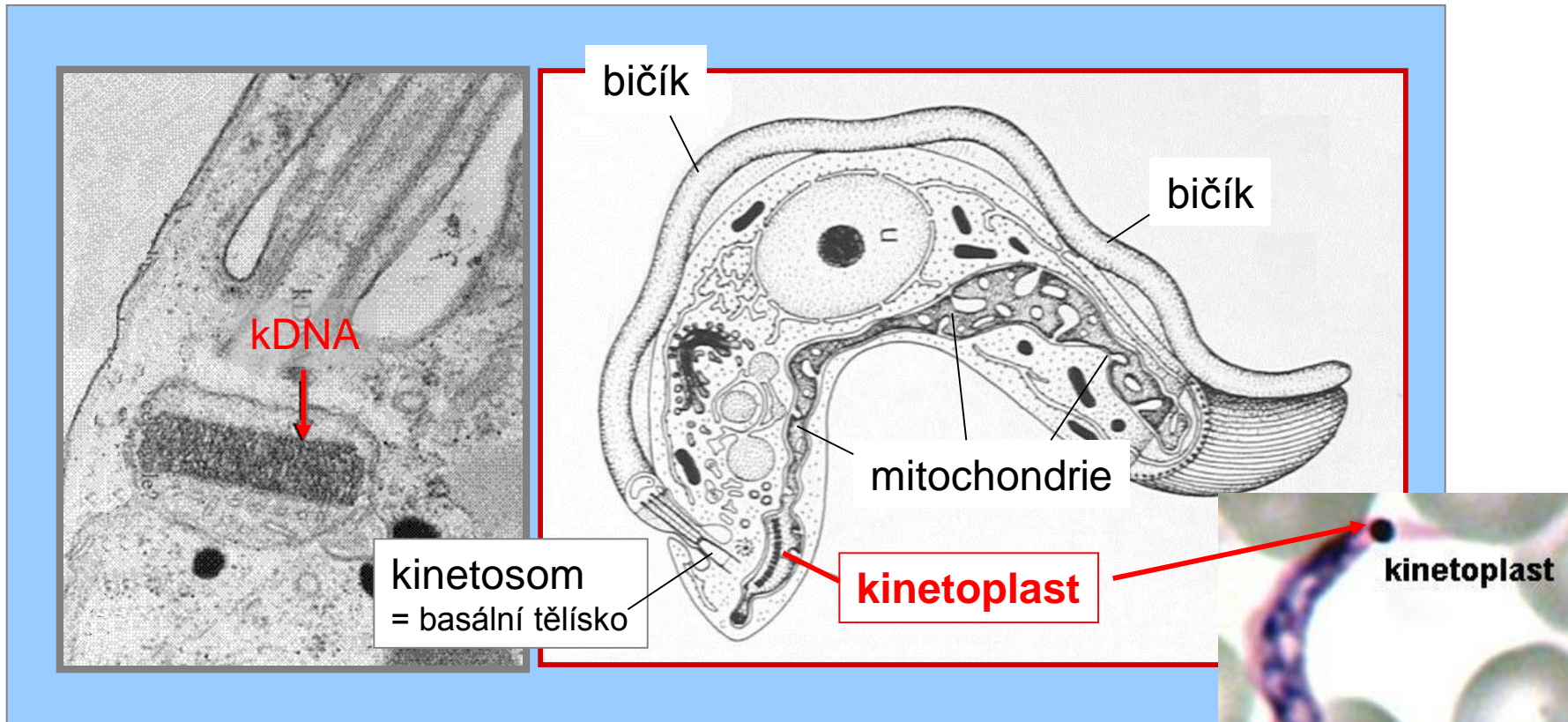
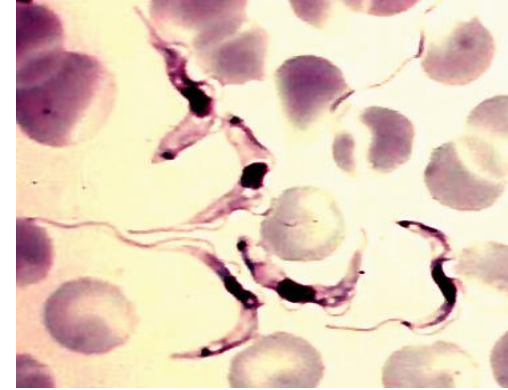
SPECIFICKÉ ORGANELY PRVOKŮ

- KINETOPLAST
- HYDROGENOSOM
+ MITOSOMY
- APICOPLAST
- GLYKOSOM
- ACIDOKALCISOM



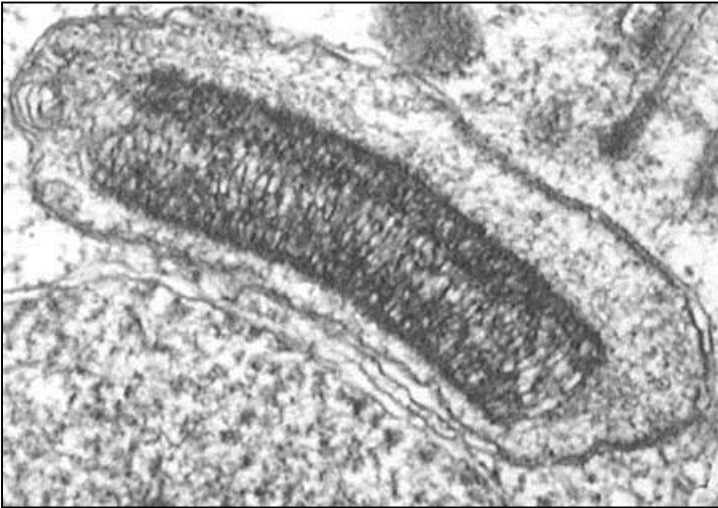
KINETOPLAST

ORGANELA SPECIFICKÁ PRO KINETOPLASTEA
STRUKTURÁLNĚ NEJSLOŽITĚJŠÍ
MITOCHONDRIÁLNÍ DNA



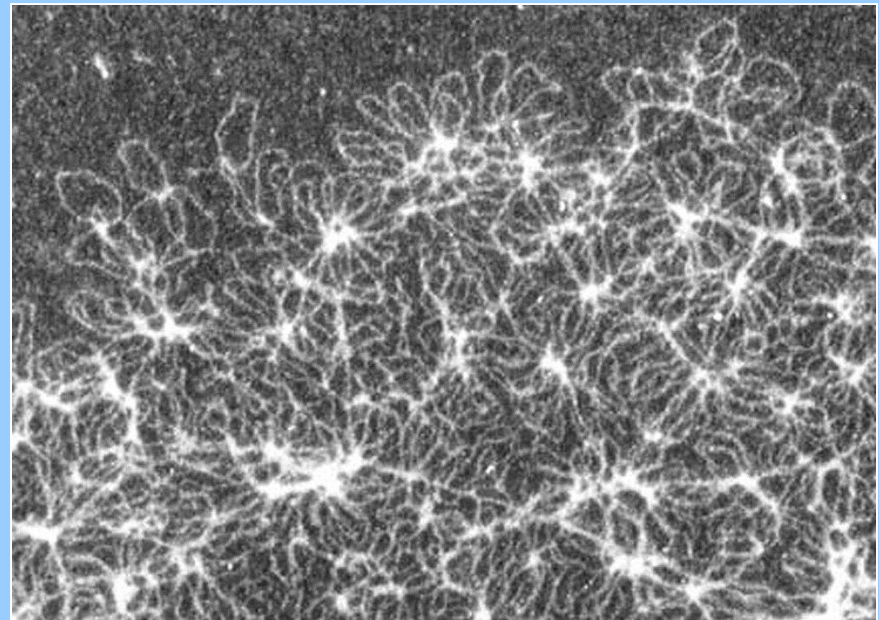
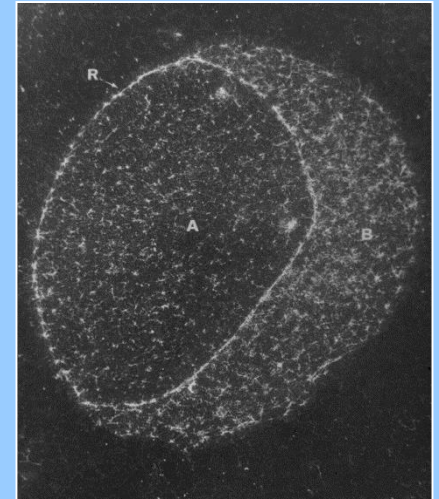
1910-20 průkaz Feulgenovou reakcí - „kinetonucleus“
1963 „znovuobjevení“ DNA v kinetoplastu (Steinert)

KINETOPLAST



- mitochondriální DNA
- 10 – 20% DNA buňky
(cca 4×10^7 kDa)
- zřetězený nukleoid
kruhových molekul

DISKOVITÝ KINETOPLAST KINETOPLASTEAE



KINETOPLAST

KOMPAKTNÍ SÍŤ MOLEKUL kDNA – vysoký obsah **AT**

MINIKROUŽKY

10 000 – 30 000

MINICIRCLE

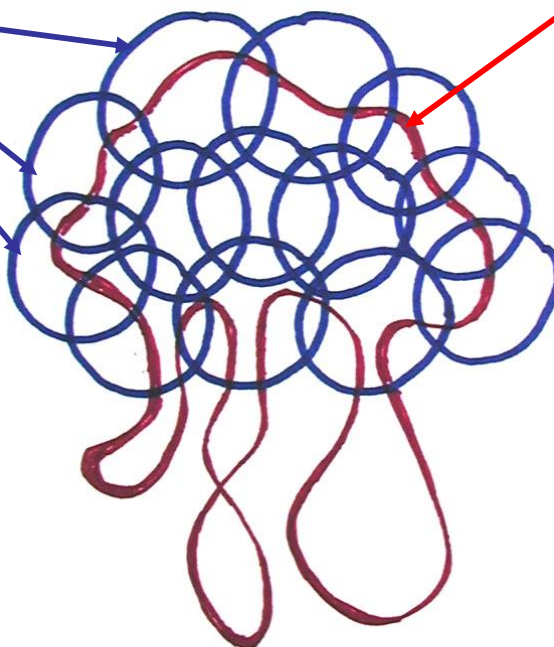
0,3 μm ; 1 kb

NUKLEOID STABILNÍ
PŘI IZOLACI

MAXIKROUŽKY 50

MAXICIRCLE

10 – 12 μm ; 20 – 22 kb



SÍŤ V SÍTI: VŠECHNY MAXIKROUŽKY VZÁJEMNĚ PROPOJENY

FUNKCE MAXIKROUŽKŮ

- GENY PRO rRNA A PROTEINY MITOCHONDRIE NEZBYTNÉ PRO FUNKČNÍ AKTIVACI MITOCHONDRIE PŘI PŘENOSU NA GLOSINY

obdoba mitochondriálních genů jiných eukaryot

JEJICH PRIMÁRNÍ PŘEPIS VYŽADUJE ROZSÁHLÉ POST-TRANSKRIPČNÍ ÚPRAVY **RNA - EDITING**

FUNKCE MINIKROUŽKŮ

- GENY PRO **GUIDE – RNA**
UMOŽŇUJÍ ZČITELNĚNÍ KRYPTOGENŮ MAXIKROUŽKŮ
- STRUKTURÁLNÍ FUNKCE
➡ STEJNOMĚRNÉ ROZDĚLENÍ MAXIKROUŽKŮ PŘI DĚLENÍ KINETOPLASTU

Na mini i maxikroužcích:

UMS – univerzální sekvence označující místo počátku replikace

RNA - EDITING

POST-TRANSKRIPČNÍ ÚPRAVY RNA

Benne et al 1988:

GEN PRO COX III *Trypanosoma brucei*

> 50% mRNA NENÍ KÓDOVÁNO V DNA

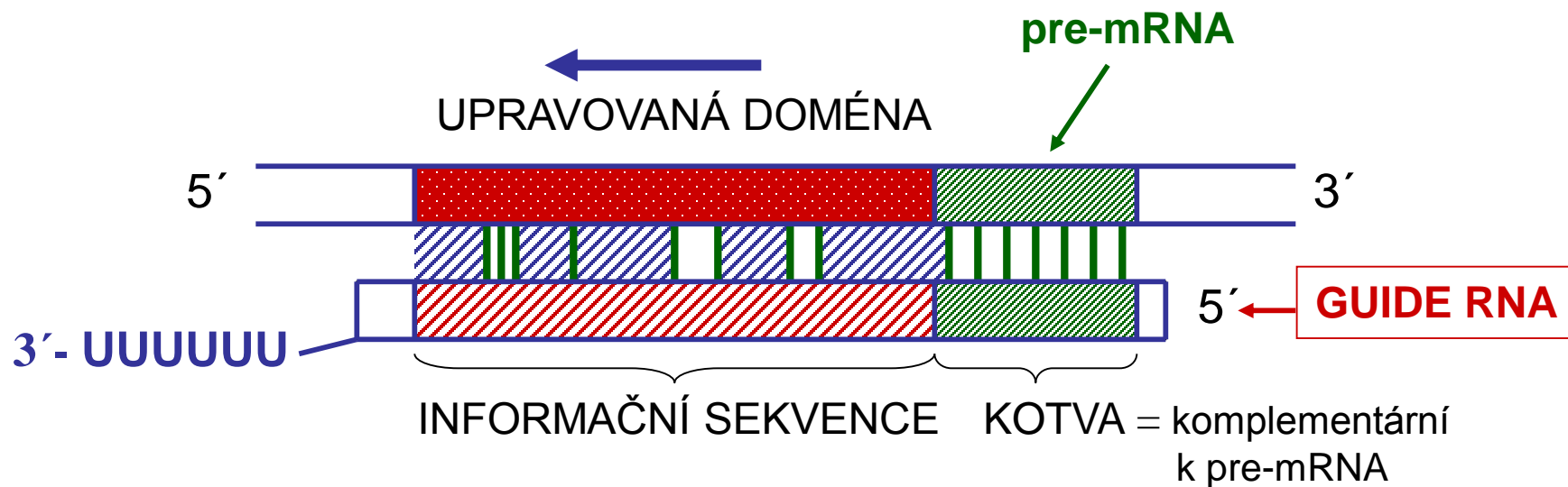
cDNA sondy NEHYBRIDIZUJÍ S GENEM

KRYPTOGEN

PRIMÁRNÍ PŘEPISY NEFUNKČNÍ – BEZ INICIAČNÍCH
A UKONČOVACÍCH KODÓNŮ

DEŠIFROVÁNÍ KRYPTOGENŮ VKLÁDÁNÍM (VYPOUŠTĚNÍM)
URIDINU ŘÍZENÉM **GUIDE RNA**, KRÁTKÝMI MOLEKULAMI,
KTERÉ HYBRIDIZUJÍ S PRIMÁRNÍ PRE-mRNA

GUIDE RNA



UUAGGGGGAGGAGAGAuAGuuAuuAuAuuGuuGuuGAAAuuuGGuuUGuuAUUGGAGUUUAUAG

UUUUUUUUUUUUUAUUAAUAGUAUAGUGACAGUUUAGACUAAGCAAUAGCCUCAUAUC

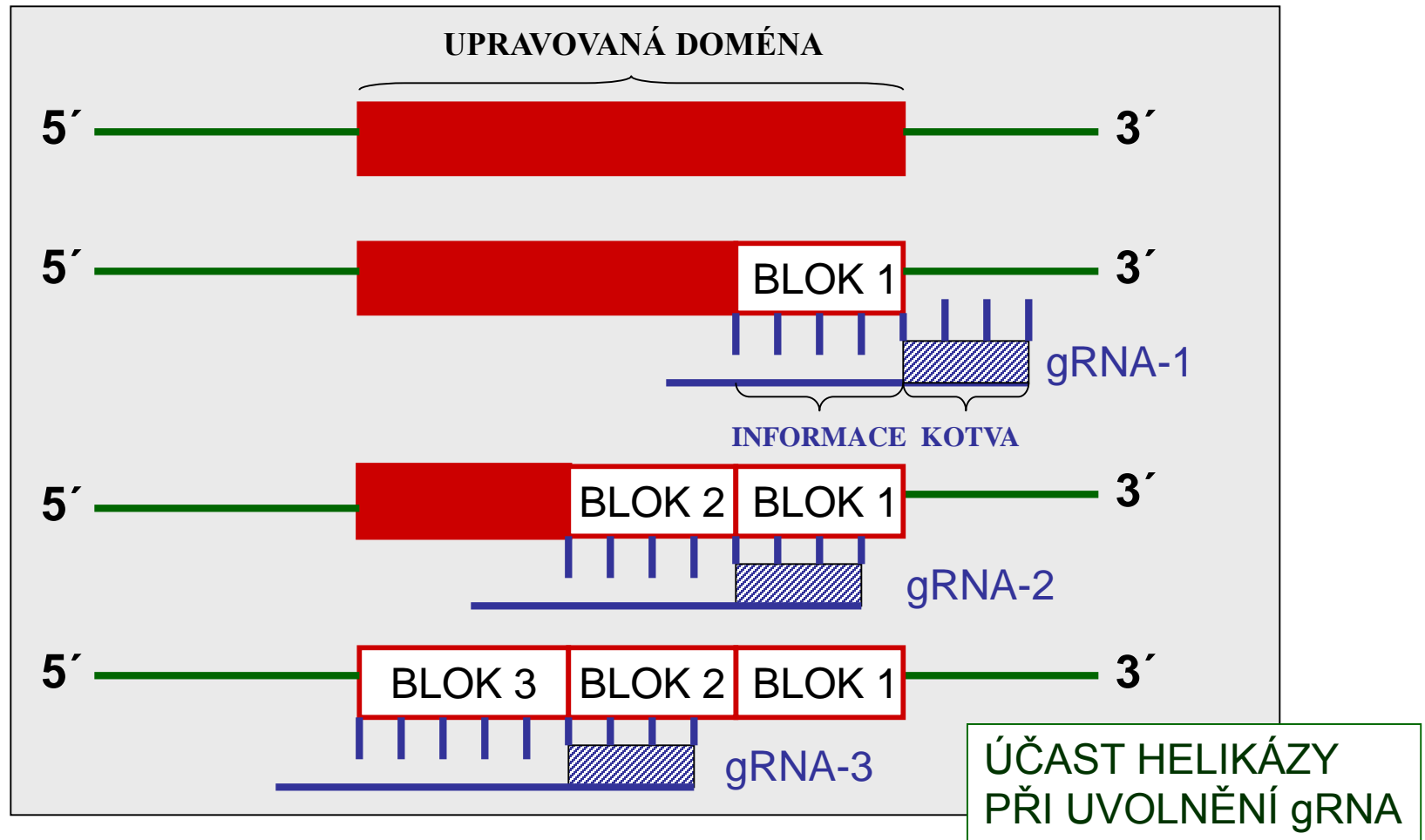
POST-TRANSKRIPČNÍ ÚPRAVOU – VKLÁDÁNÍM URIDINU

- ➔ ČITELNOST KRYPTOGENŮ
- DOPLNĚNÍ INICIAČNÍHO (AUG)
- A UKONČOVACÍHO (UAA) KODONU

RNA - EDITING

POSTUP ÚPRAV OD 3' K 5' KONCI

MEZIPRODUKTY: ČÁSTEČNĚ UPRAVENÉ PRE-mRNA



ÚPRAVY REDIGOVANÉHO BLOKU: vždy za posledním komplementárním místem

MECHANISMUS RNA-EDITINGU

ENZYMOVÁ KASKÁDA

POSTUPNÝ ÚČINEK

ENDONUKLEÁZY ➡ TERMINÁLNÍ URIDYL TRANSFERÁZY ➡ RNA LIGÁZY

EDITOSOM

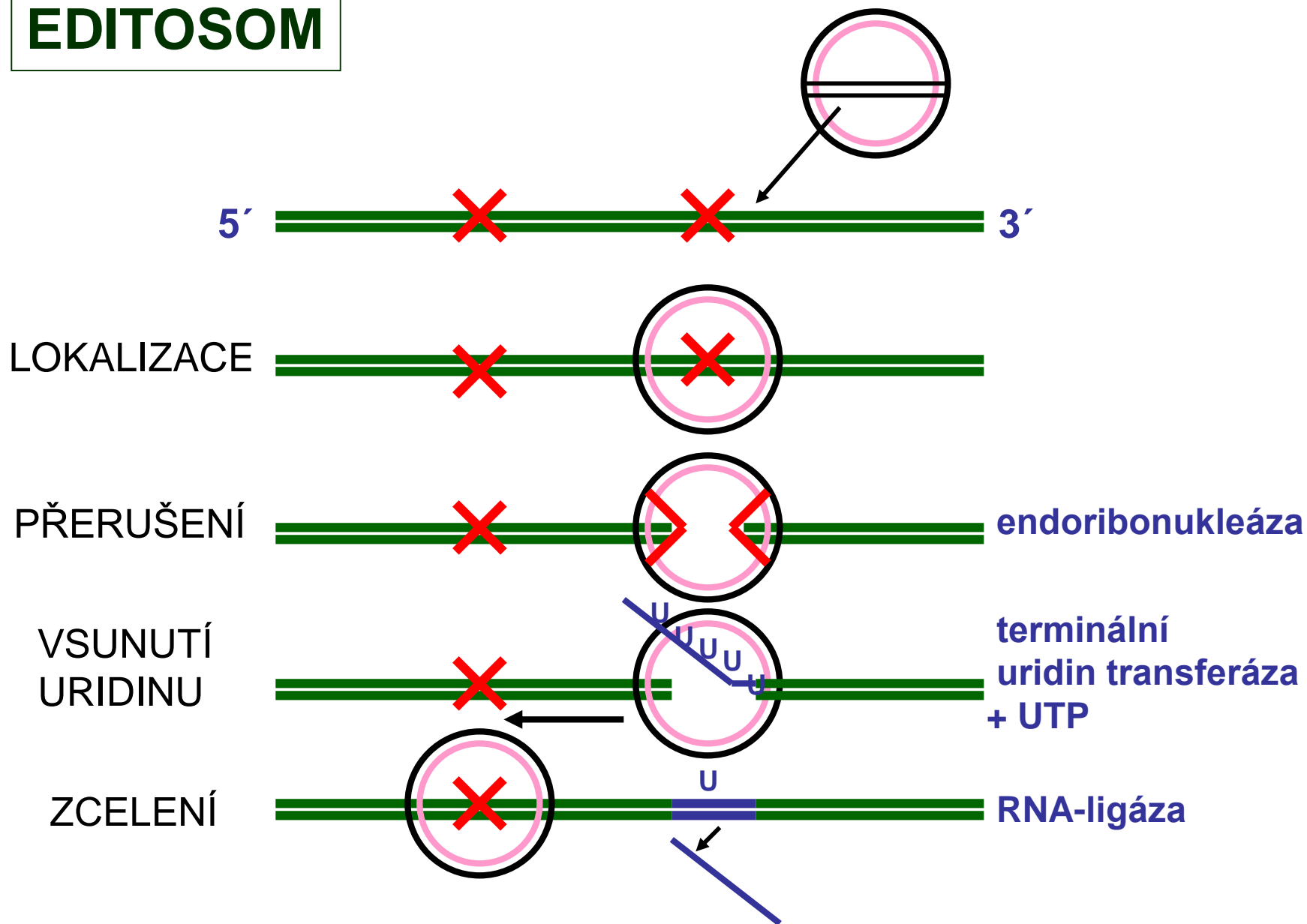
VYSOKOMOLEKULÁRNÍ RIBONUKLEOPROTEINOVÝ KOMPLEX
OBSAHUJÍCÍ POTŘEBNÉ KOMPONENTY PRO EDITING

~ 1.6 MDa

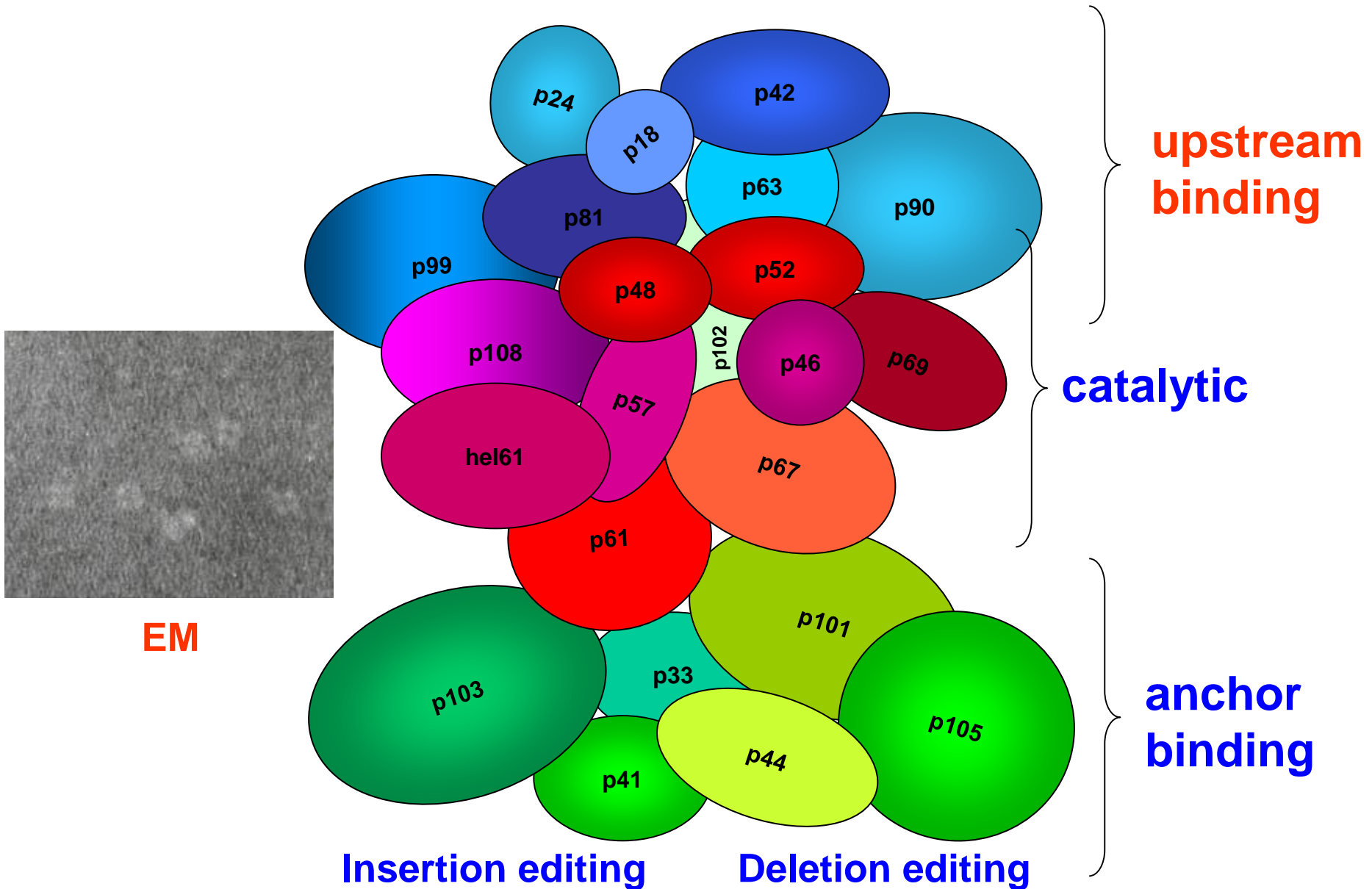
> 20 proteinů, mnohé v párech

+ přidružené faktory – nejsou stabilní součástí editosomu,
jsou ale nezbytné pro správný editing

EDITOSOM



Editosome Model



RNA editing je komplexní, ale přesný proces

- řada koordinovaných enzymatických kroků
- každý enzym přispívá k přesnosti úprav
- gRNA určuje počet a místo vložení nebo vyloučení U
- výsledkem je přesně upravená mRNA schopná translace

VÝZNAM

REGULACE EXPRESE MITOCHONDRIÁLNÍCH GENŮ

(INICIAČNÍ KODON – AUG)

Trypanosoma brucei

DIFERENCIOVANÝ EDITING RŮZNÝCH PŘEPISŮ

- KONSTITUČNÍ VE VŠECH FÁZÍCH VÝVOJOVÉHO CYKLU
- JEN U VEKTOROVÝCH FOREM
- JEN U KREVNÍCH FOREM

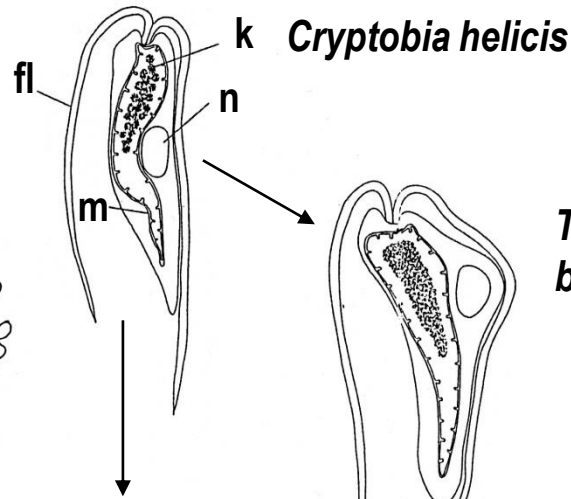
VÝZNAM

JE EDITING EVOLUČNÍ RESIDUUM (?)

PŮVODNÍ MECHANISMUS MODIFIKACÍ A OPRAV RNA PŘED VZNIKEM POLYMERÁZ

- **PAN-EDITING** u evolučně starších forem
- DALŠÍ VÝVOJ: reverzní transkripce částečně upravené mRNA
do DNA maxikroužků → omezování editovaných úseků
- Riziko RNA editingu:
Účast velkého množství gRNA podmínkou úspěšné úpravy kryptogenu
Mutace genu pro jedinou gRNA může znemožnit transkripci.

Evoluce kinetoplastu



PANKINETOPLAST

Jednotlivé spiralizované kruhy po celé mitochondrii

Trypanoplasma borreli

MEGAKINETOPLAST

Dlouhé molekuly linearizovaných minikroužků zapojených v tandemu

POLYKINETOPLAST

Jednotlivé relaxované kruhy v kompaktních shlucích na několika místech mitochondrie

Dimastigella trypaniformis

PROKINETOPLAST

Jeden kompaktní shluk relaxovaných kruhů, ojediněle 2-3 kruhy propojené

Bodo saltans

DISKOVITÝ KINETOPLAST

Propojená síť kruhových molekul

Trypanosoma brucei

DYSKINETOPLASIE

1. CHYBÍ KINETOPLASTOVÁ DNA
2. DEZORGANIZACE STRUKTURY KINETOPLASTU
3. CHYBÍ MAXIKROUŽKY
4. HOMOGENIZACE MINIKROUŽKŮ

DŮSLEDKY:

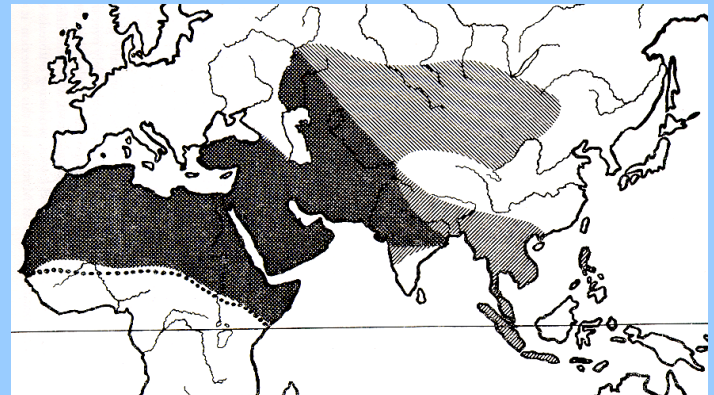
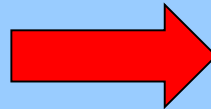
NESCHOPNOST VÝVOJE V PŘENAŠEČI

NEJSOU EXPRIMOVÁNY MITOCHONDRIÁLNÍ GENY

→ NESCHOPNOST FUNKČNÍ AKTIVACE MITOCHONDRIE
= METABOLICKY ARESTOVANÁ KREVNÍ FÁZE

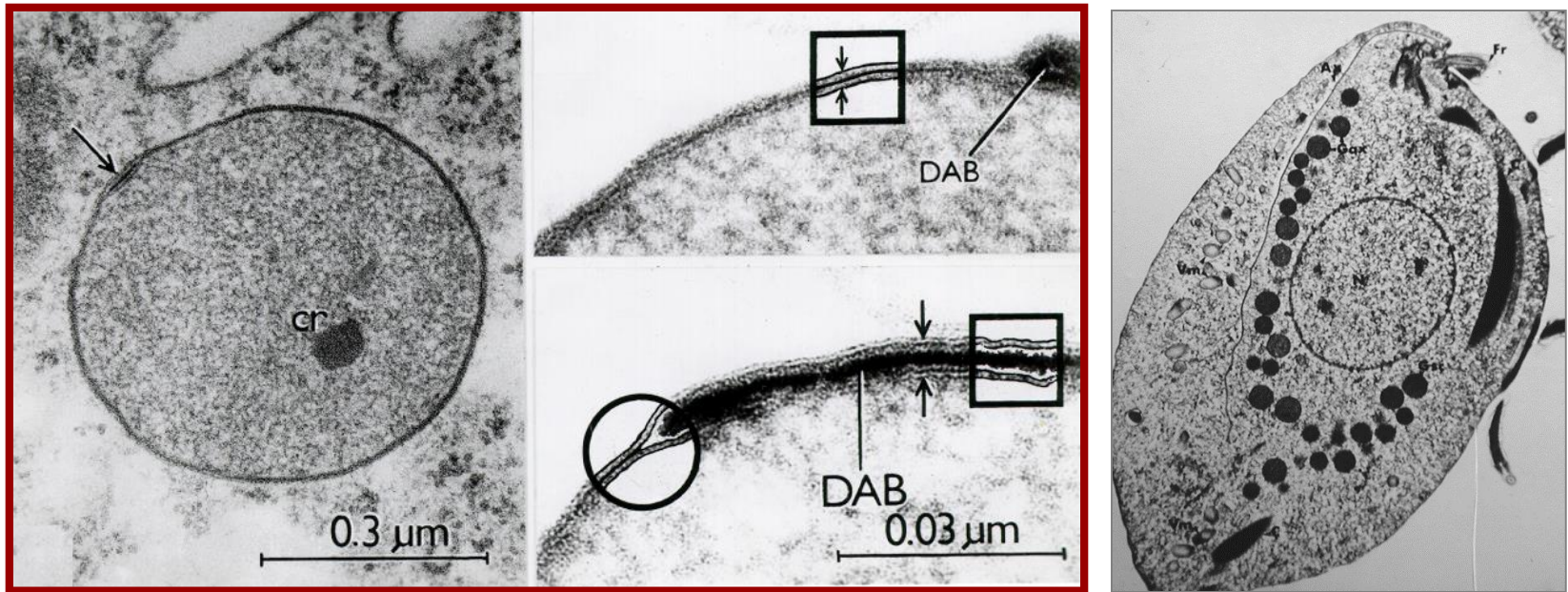
Trypanosoma equiperdum
sexuální přenos (venerická
nákaza koní)

Trypanosoma evansi
pasivní přenos (bodavé
mouchy, ovádi, upíři) -> únik z
glossinového pásu



HYDROGENOSOM

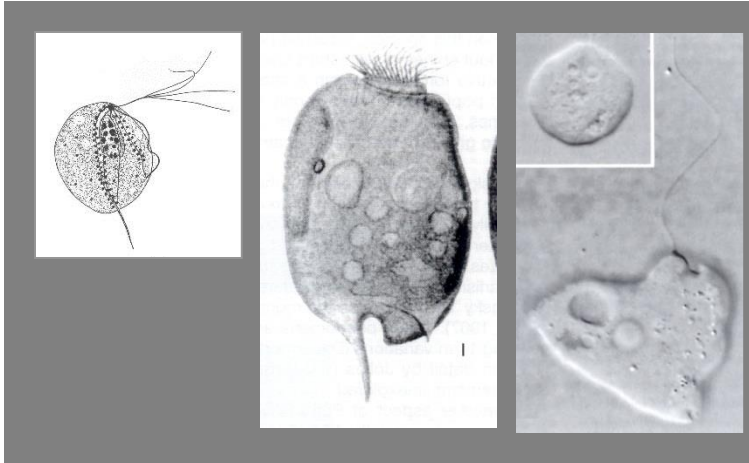
ORGANELA ANAEROBNÍCH AMITOCHONDRIÁLNÍCH PROTIST



OBJEV A CHARAKTERIZACE: U TRICHOMONÁD (*Trichomonas foetus*)
1973 – 1975 M.Müller et al. (Rockefeller University, New York)
J.Čerkasov et al. (Karlova univerzita, Praha)

HYDROGENOSOM

VÝSKYT: U PROTIST ADAPTOVANÝCH NA ANAEROBIOZU
bez vzájemné příbuznosti



- TRICHOMONADIDA
 - HYPERMASTIGIDA
 - BACHOROVÍ NÁLEVNÍCI
 - HOUBA *Neocallimastix* Z BACHORU
 - NÁLEVNÍCI A BIČÍKOVCI
- z anaerobních sladkovodních
a mořských sedimentů

PŮVOD:

PŘEDPOKLAD – OPAKOVANÝ VZNIK Z MITOCHONDRIÍ
u organismů na různém evolučním stupni jako adaptace
na život v anaerobním prostředí

ALTERNATIVNĚ – SPOLEČNÝ PŘEDCHŮDCE HYDROGENOSOMŮ
A MITOCHONDRIÍ

HYDROGENOSOMY NEMAJÍ VLASTNÍ GENOM

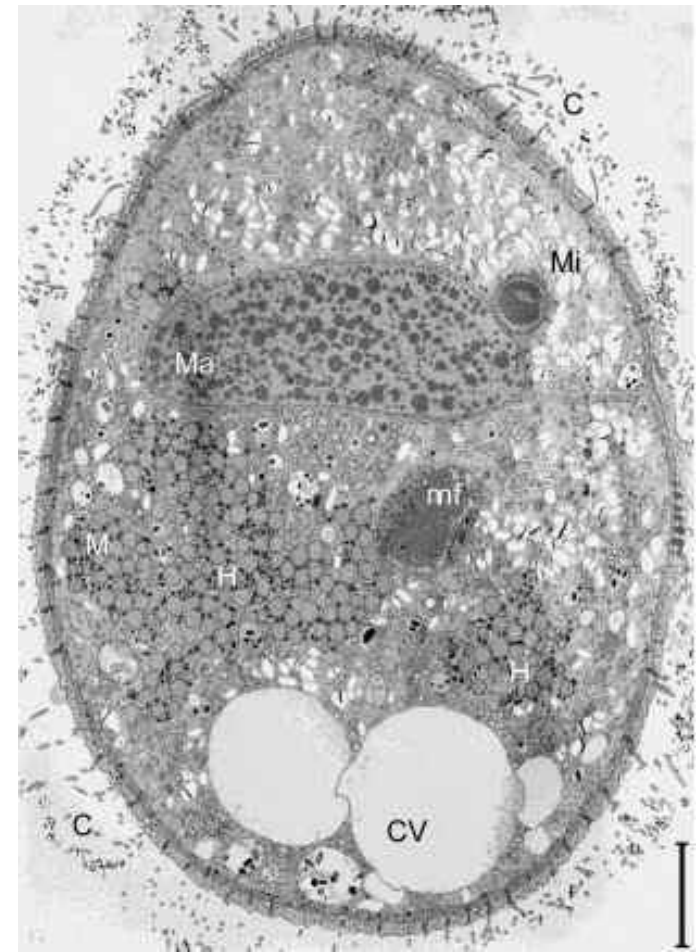
- VŠECHNY PROTEINY KÓDOVÁNY V JÁDŘE
- SYNTÉZA NA VOLNÝCH RIBOSOMECH
- IMPORT DO HYDROGENOSOMU

Výjimka: Nález mitochondriálního genomu v hydrogenosomech nálevníků ze střeva švábů *Nyctotherus ovalis*.

**HYDROGENOSOMY
OBSAHUJÍ
MITOCHONDRIÁLNÍ DNA
A RIBOSOMY**

Vnitřní membrána tvoří výběžky podobné cristám.

Syntrofní asociace s metanogenními bakteriemi.



FUNKCE HYDROGENOSOMŮ

- **METABOLISMUS PYRUVÁTU**

PRODUKCE ATP SUBSTRÁTOVOU FOSFORYLACÍ

PRODUKCE H_2

- **METABOLISMUS MALÁTU**

- **TVORBA Fe-S CENTER**

- **DETOXIFIKAČNÍ PROCESY**

RUBRERYTHRIN – THIOREDOXIN – Fe-S FLAVOPROTEINY

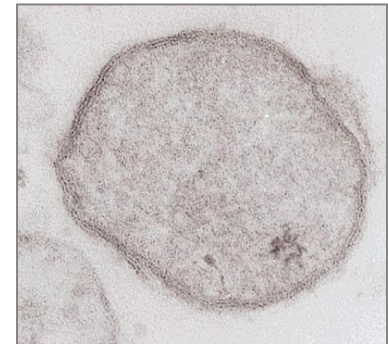
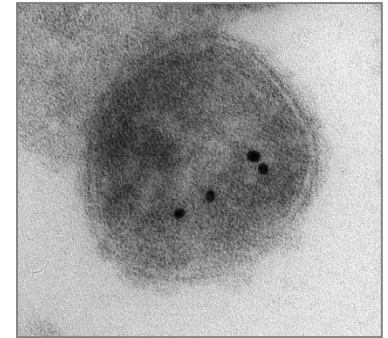
FARMAKOLOGICKÝ VÝZNAM

AKTIVACE 5-NITROIMIDAZOLOVÝCH LÉČIV

Poruchy hydrogenosomálního metabolismu – souvislost s rezistencí

MITOSOM

- organela anaerobních prvoků nemá vlastní genom
- dvojitá membrána
- mitochondriální typ mechanismů pro import proteinů
- nemá respirační funkci
- nepodílí se na tvorbě energie

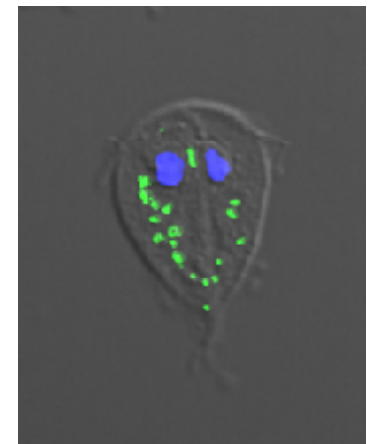


Giardia intestinalis

Tovar et al. 2003 (+Tachezy, Šuťák)
tvorba Fe-S center

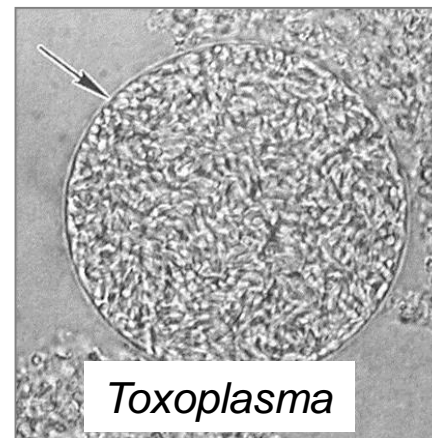
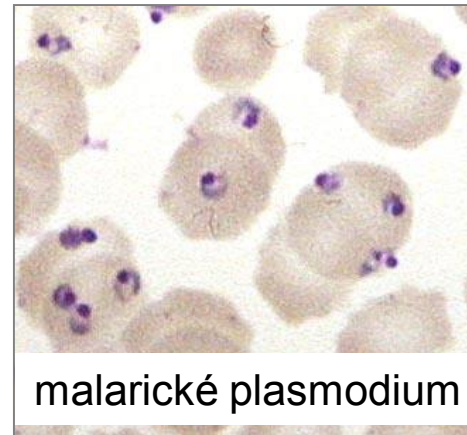
Entamoeba histolytica

Clark et al. 1999, Samuelson 1999
metabolická aktivace sulfátů



APICOPLAST

ORGANELA CHARAKTERISTICKÁ PRO APICOMPLEXA
s výjimkou gregarin a kryptosporidií



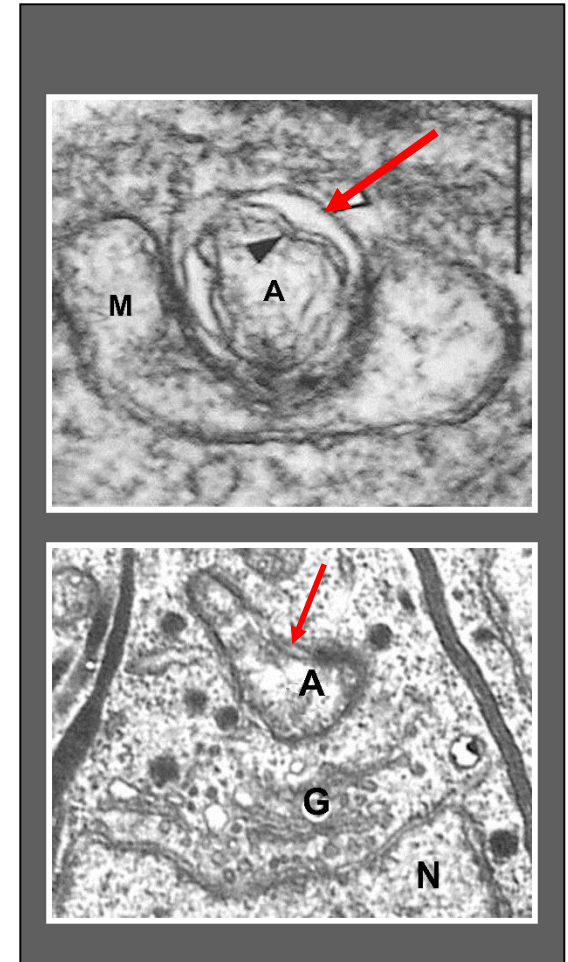
APICOPLAST

- OVÁLNÁ ORGANELA BLÍZKO JÁDRA, MITOCHONDRIE A GOLGIHO APARÁTU
- 4 MEMBRÁNY
- JE AUTOREPLIKAČNÍ
- MÁ VLASTNÍ GENOM

PŮVOD: sekundární symbióza s červenou řasou

DŮLEŽITÉ METABOLICKÉ FUNKCE

- syntéza mastných kyselin
- syntéza izoprenoidů
- syntéza aromatických aminokyselin a ubiquinonu (Šikimatoва dráha)

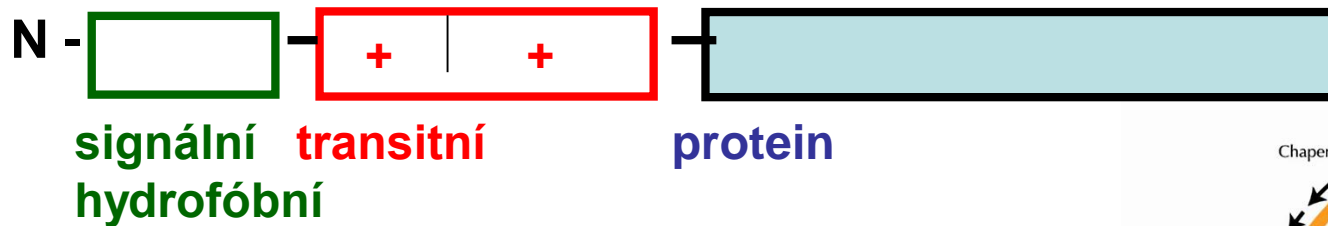


NEPOSTRADATELNÁ ORGANELA metabolické dráhy a proteiny
roslinného typu

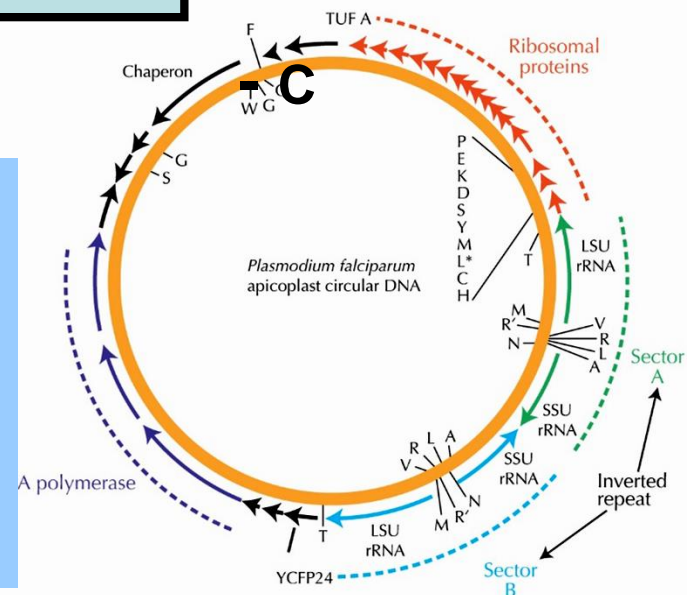
NADĚJNÝ CÍL PRO CHEMOTERAPII bez rizika poškození hostitele!

GENOM APICOPLASTU

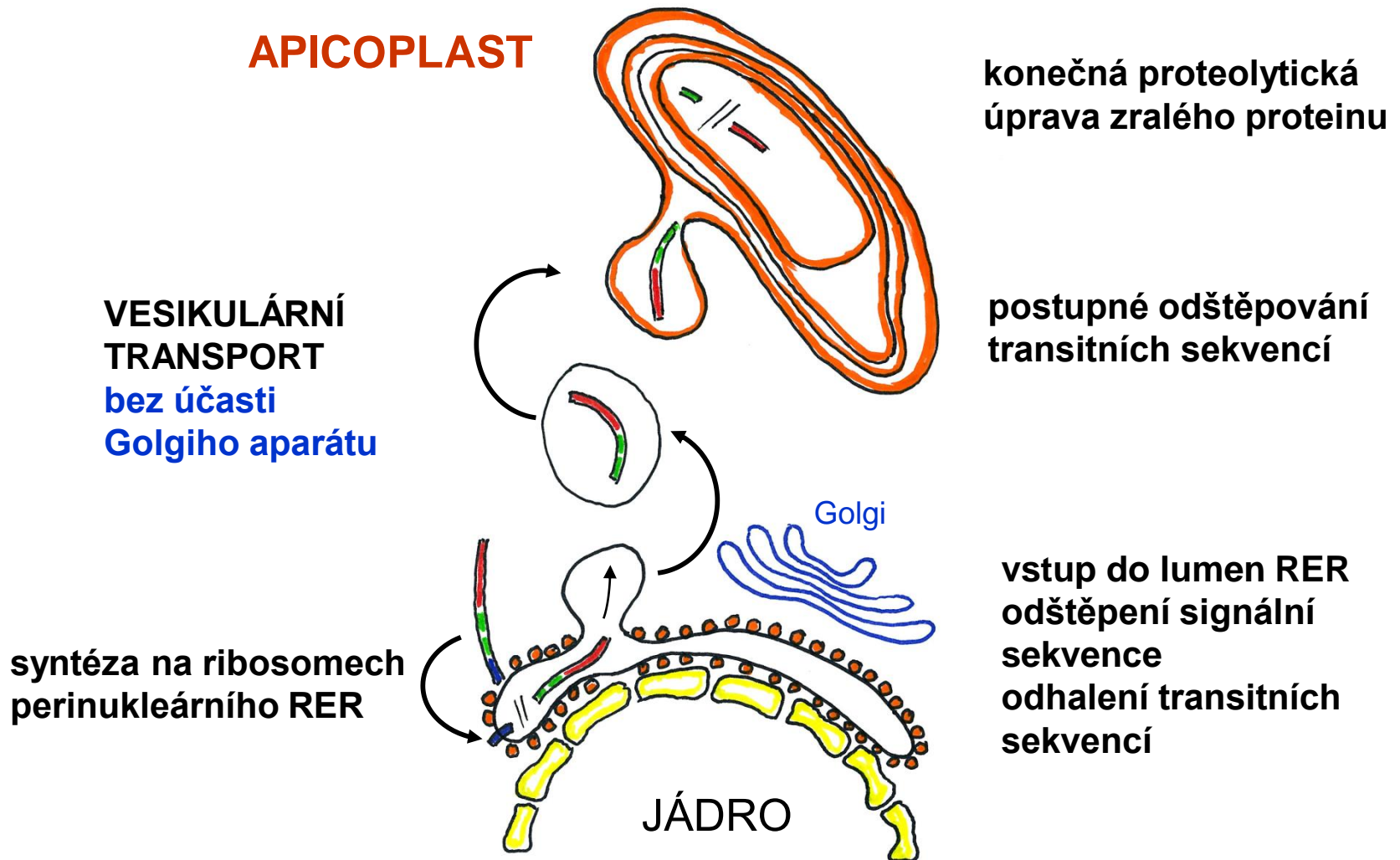
- **CIRKULÁRNÍ MOLEKULA DNA ~ 35 kb**
- USPOŘÁDÁNÍ GENŮ A JEJICH SEKVENCE OBDOBNÉ JAKO V GENOMU PLASTIDŮ
- KÓDOVÁNY PŘEDEVŠÍM GENY SOUČÁSTÍ TRANSKRIPČNÍHO A TRANSLAČNÍHO APARÁTU (rRNA, podjednotky RNA polymerázy, elongační faktor aj.)
- VĚTŠINA METABOLICKÝCH PROTEINŮ KÓDOVÁNA V JÁDŘE
→ **IMPORT DO APICOPLASTU**

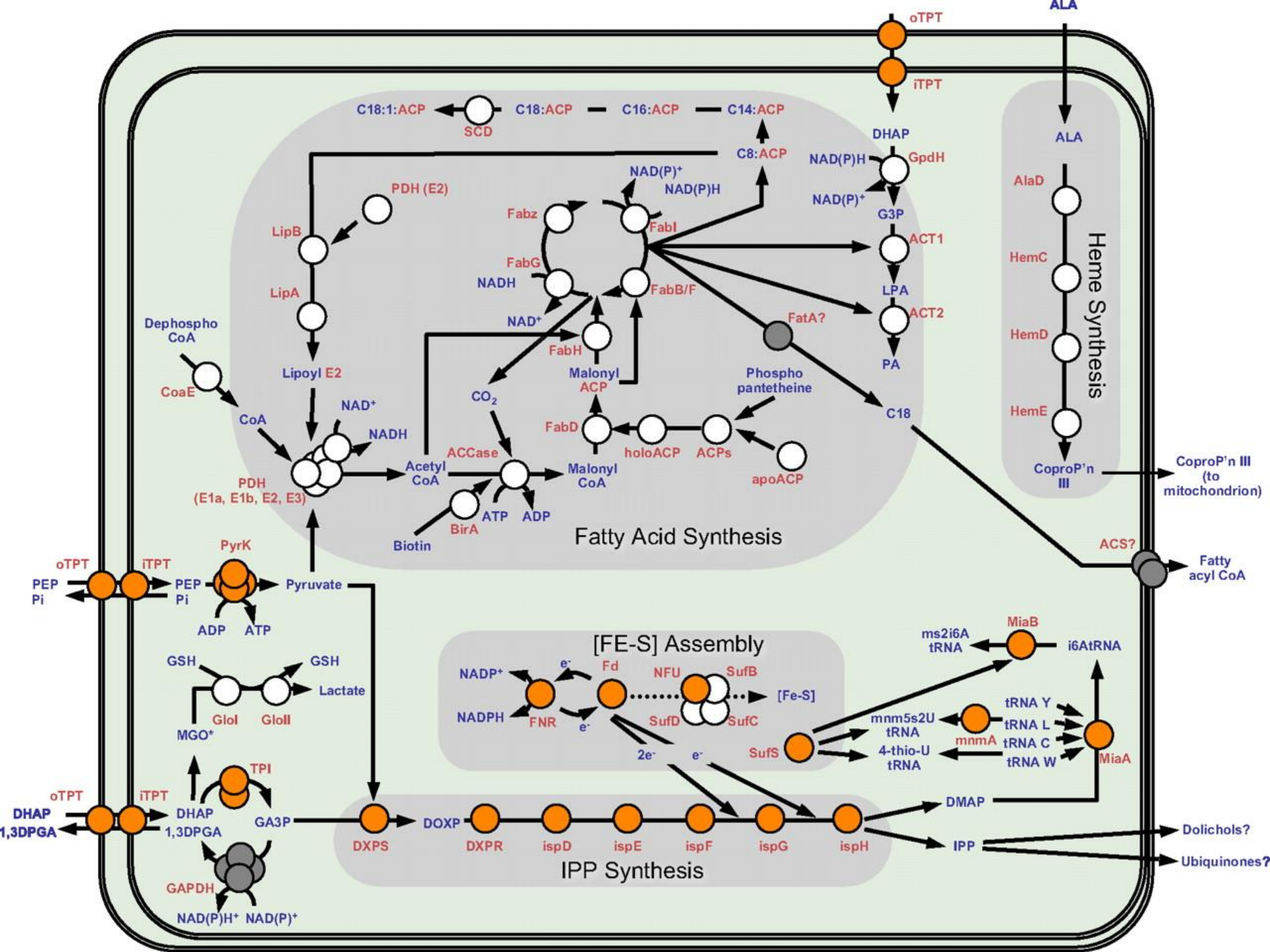


1. syntéza na ribosomech perinukleárního ER, kotranslační vstup do ER
2. odštěpení signálního peptidu - odhalení dvojdišné transitní značky
3. vesikulární transport do apicoplastu – během transportu odštěpení části značky
4. konečná proteolytická úprava zralého proteinu v apicoplastu



IMPORT DO APICOPLASTU





BIOSYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN

SAVCI

TYP I sdružená dráha
katalyzuje multifunkční fúzní protein

APICOPLAST bakterie – rostliny (plastidy)

TYP II jednotlivé enzymové aktivity katalyzují
oddělené proteiny

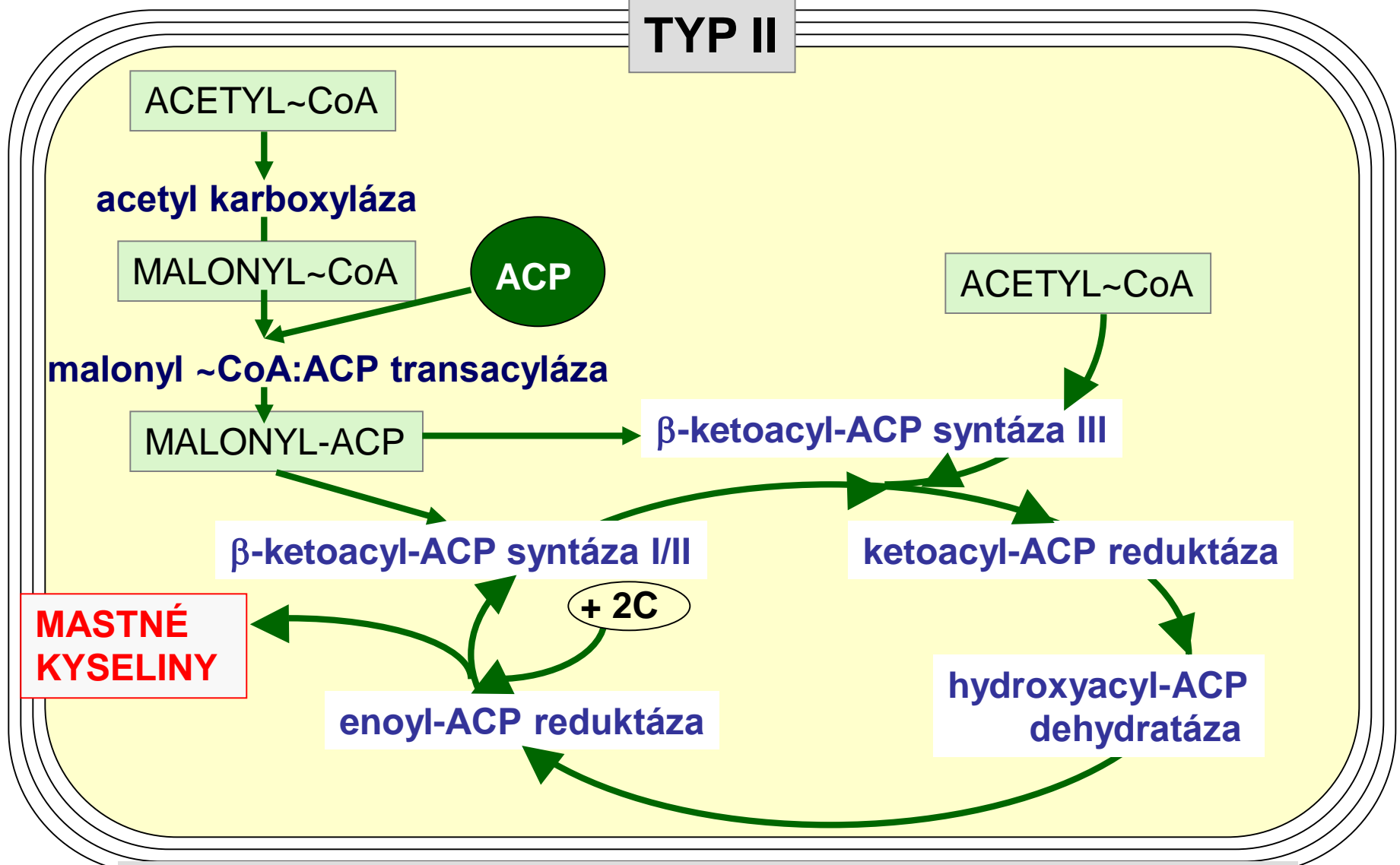
3 β -ketoacyl-ACP syntázy
 β -ketoacyl-ACP reduktáza
 β -hydroxyacyl-ACP dehydratáza
enoyl-ACP reduktáza

ACP = proteinový nosič acylu (**A**cy **C**arrier **P**rotein)

KÓDOVÁNY V JÁDŘE  **IMPORT DO APICOPLASTU**

BIOSYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN V APICOPLASTU

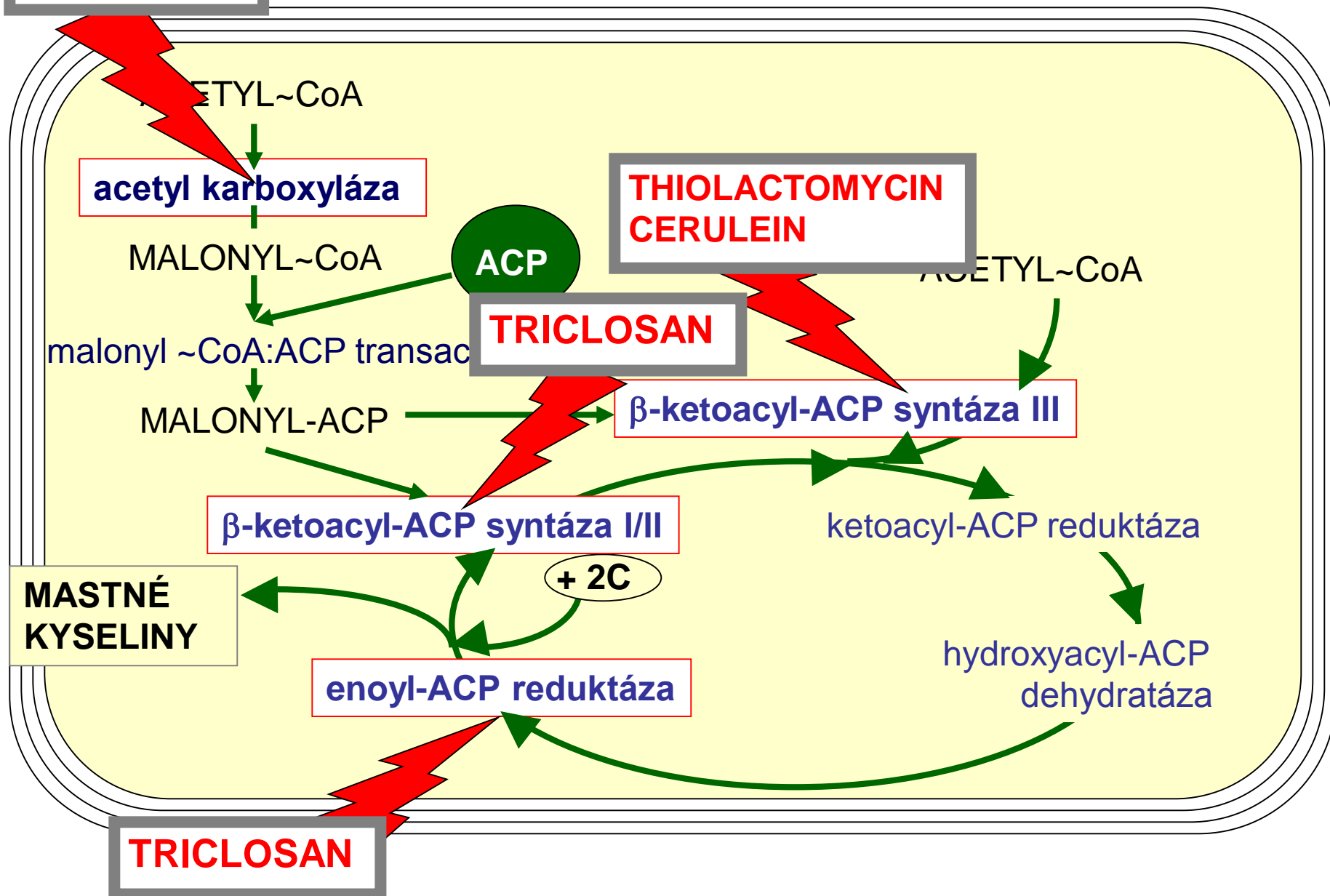
TYP II



PRODLUŽOVÁNÍ ACYLOVÉHO ŘETĚZCE V KAŽDÉM CYKLU

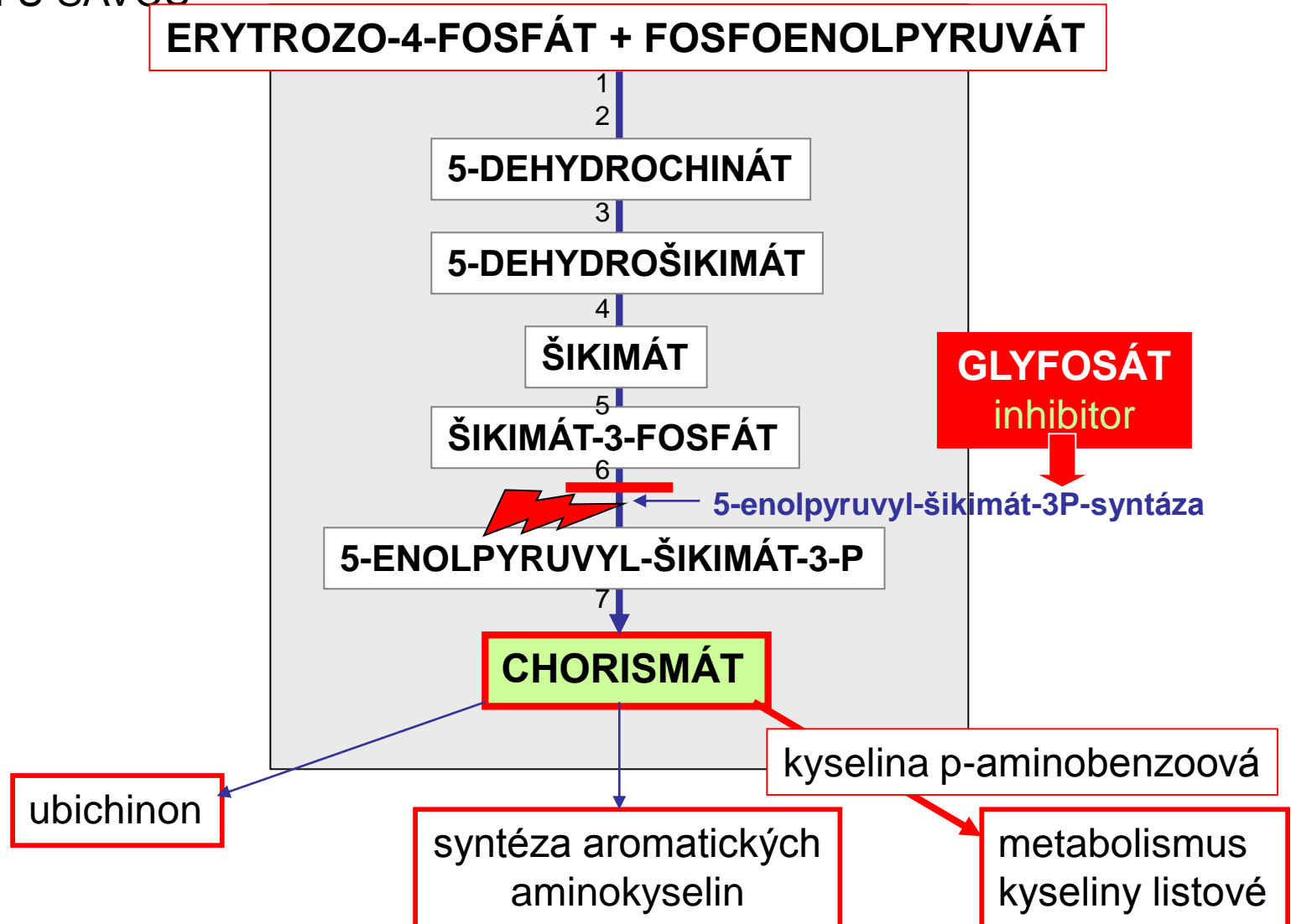
HERBICIDY

INHIBITORY SYNTÉZY MASTNÝCH KYSELIN

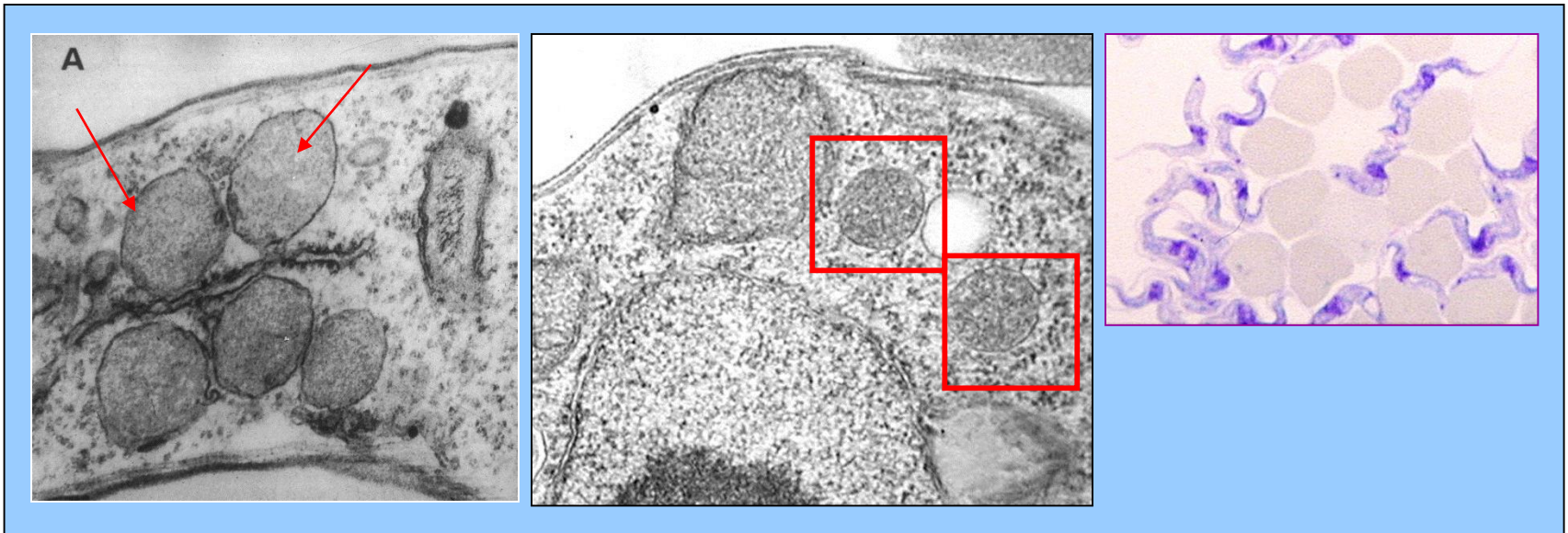


ŠIKIMATOVA DRÁHA

- U ŘAS, VYŠŠÍCH ROSTLIN, HUB A BAKTERIÍ (U ROSTLIN V PLASTIDECH)
- NENÍ U SAVCŮ



GLYKOSOM

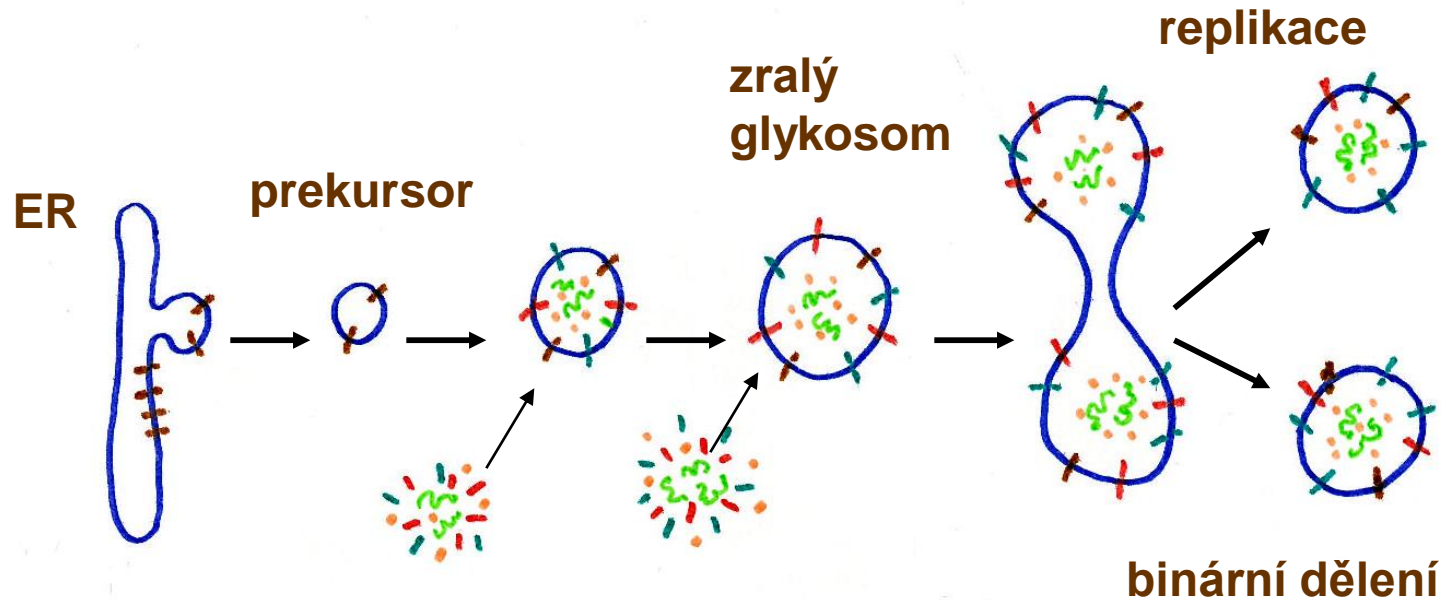


- KULOVITÉ NEBO OVÁLNÉ ORGANELY
- JEDNODUCHÁ MEMBRÁNA
- GRANULÁRNÍ MATRIX – amorfní nebo krystaloidní inkluze (core)

**HLAVNÍ METABOLICKÁ ORGANELA KREVNÍCH FOREM
AFRICKÝCH TRYPANOSOM - výskyt u všech kinetoplastid**

**Objev: ORGANELOVÁ LOKALIZACE GLYKOLYTICKÝCH ENZYMŮ
1977 Fred Opperdoes (ICP Brusel)**

BIOGENEZE GLYKOSOMŮ

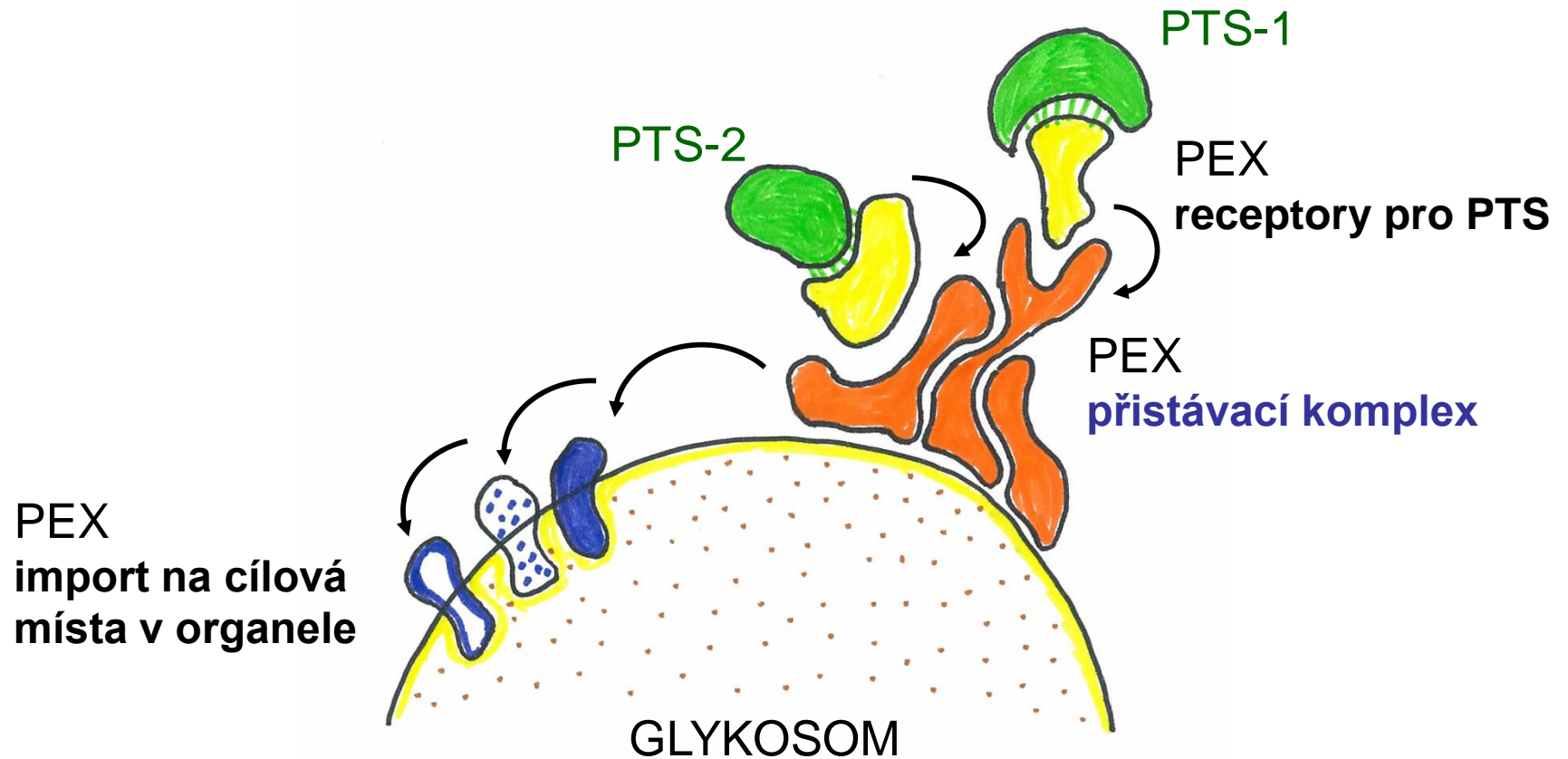


PUČENÍ PREKURSORŮ Z ENDOPLASMICKÉHO
RETIKULA → IMPORT PROTEINŮ A LIPIDŮ → RŮST →
ZRÁNÍ → REPLIKACE

NEMAJÍ VLASTNÍ GENOM

- VŠECHNY PROTEINY KÓDOVÁNY V JÁDŘE
- SYNTÉZA PROTEINŮ NA VOLNÝCH RIBOSOMECH V CYTOSOLU
- POST-TRANSLAČNÍ IMPORT DO GLYKOSOMŮ (spec. PEX komplexy)

IMPORT DO GLYKOSOMU



GLYKOSOMY AFRICKÝCH TRYPANOSOM

cca 240/buňka

T.brucei

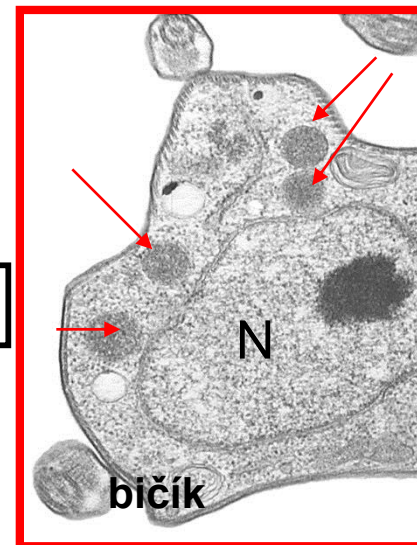
HLAVNÍ METABOLICKÁ FUNKCE: **GLYKOLÝZA**

90% glykosomálních proteinů = **glykolytické enzymy**

7 ENZYMŮ GLYKOLYTICKÉ DRÁHY

(od hexokinázy po fosfoglycerát kinázu)

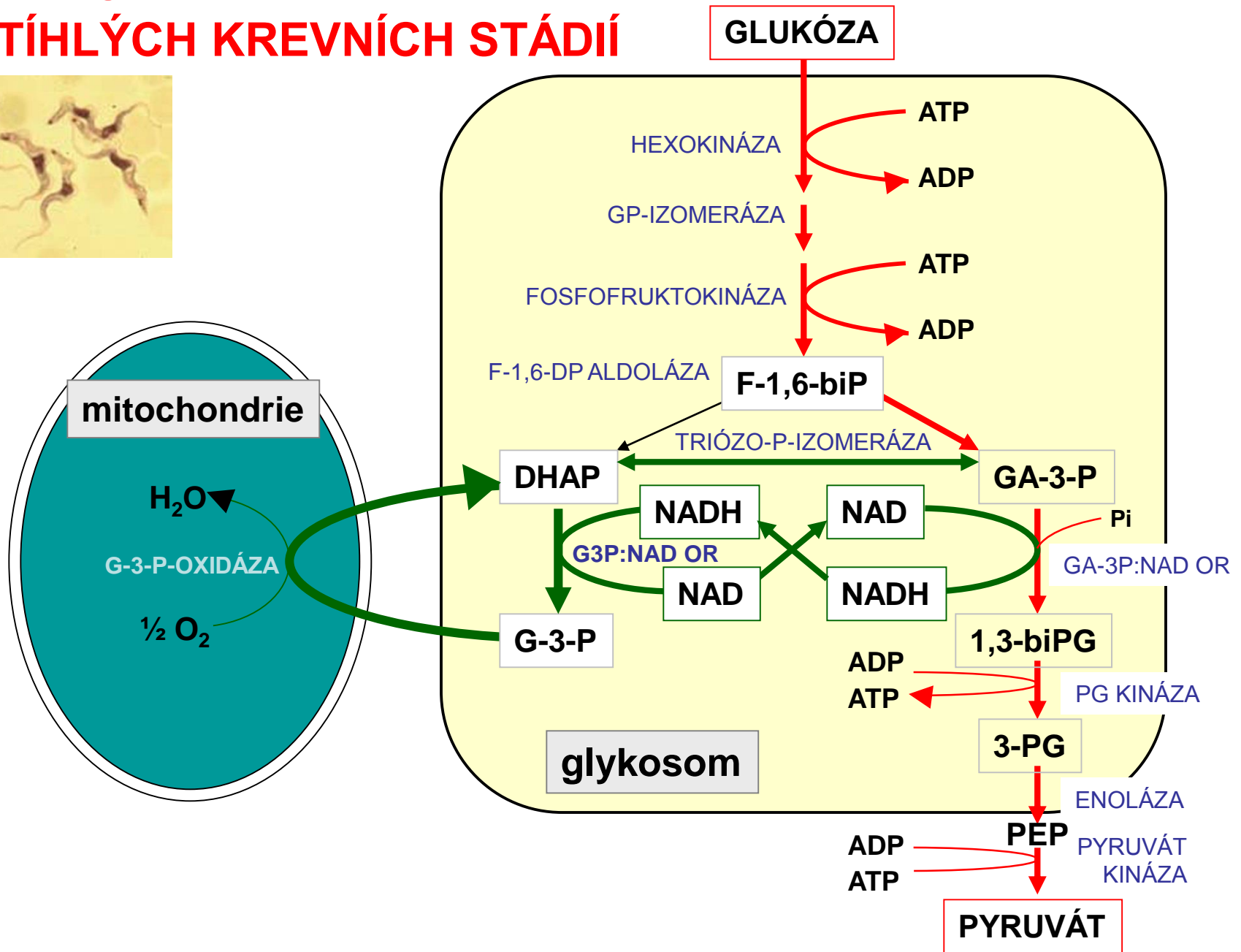
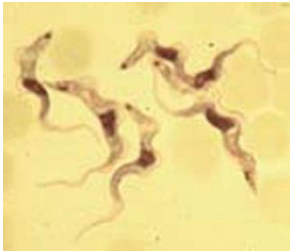
ORGANELOVÁ LOKALIZACE GLYKOLÝZY UNIKÁTNÍ
není u jiných organismů



VÝZNAM:

- OCHRANA GLYKOSOMÁLNÍHO ATP PŘED NEŽÁDOUCÍ SPOTŘEBOU
- PREVENCE METABOLICKÝCH INTERFERENCÍ
- ZABEZPEČENÍ EFEKTIVNOSTI GLYKOLÝZY

GLYKOLÝZA ŠTÍHLÝCH KREVNÍCH STÁDIÍ



DALŠÍ METABOLICKÉ PROCESY V GLYKOSOMECH

- ODBOURÁVÁNÍ MASTNÝCH KYSELIN β -OXIDACÍ
- BIOSYNTÉZA ÉTEROVÝCH LIPIDŮ
- FOSFORIBOSYL TRANSFERÁZOVÁ REAKCE „SALVAGE“ PURINŮ
- NĚKTERÉ REAKCE SYNTÉZY PYRIMIDINOVÝCH NUKLEOTIDŮ

ACIDOKALCISOM

1995 – 1999
Roberto DOCAMPO

**KYSELÉ VAKUOLY S VYSOKÝM OBSAHEM Ca^{2+}
BEZ SOUVISLOSTI S ENDOCYTÓZOU A LYSOSOMÁLNÍM SYSTÉMEM**

VÝSKYT: **KINETOPLASTIDA** – *Trypanosoma cruzi*, *T.brucei*, *Leishmania*
APICOMPLEXA – *Toxoplasmi*, *Eimeria*, *Plasmodium*

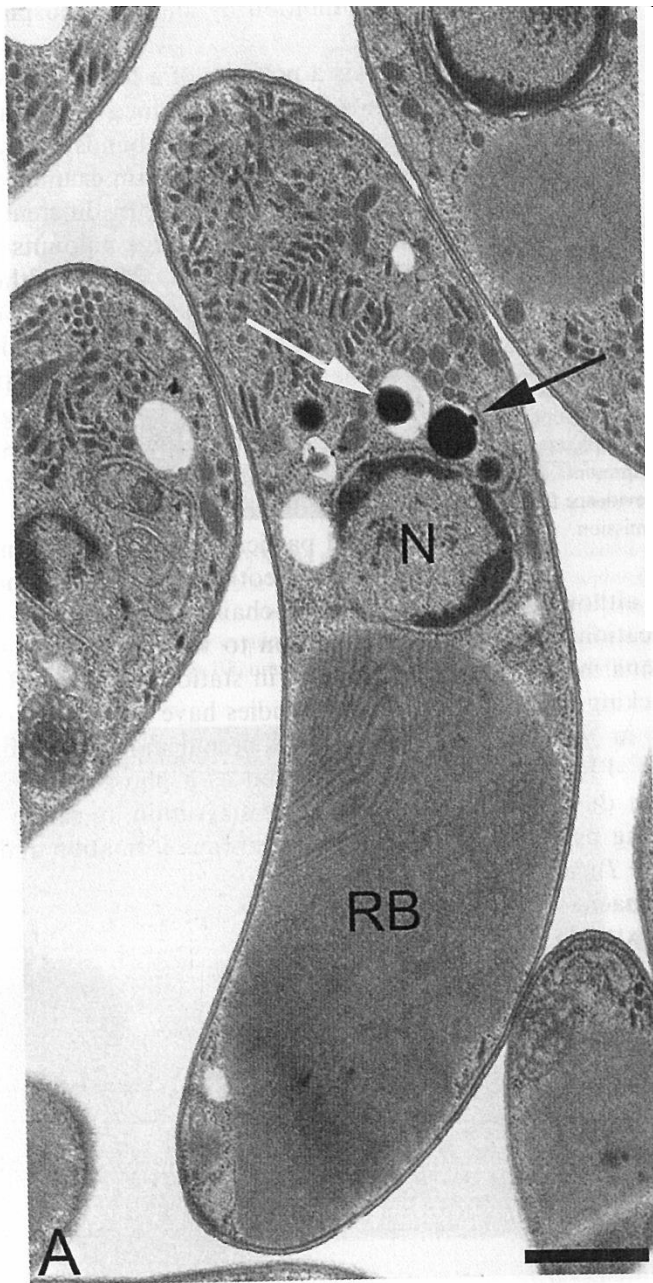
FUNKCE ACIDOKALCISOMŮ

- SUBCELULÁRNÍ REZERVOÁR Ca^{2+}
- REGULACE INTRACELULÁRNÍHO pH
- REZERVOÁR ENERGETICKY ZUŽITKOVATELNÝCH FOSFÁTŮ
PP_i A PolyP
- OSMOREGULACE

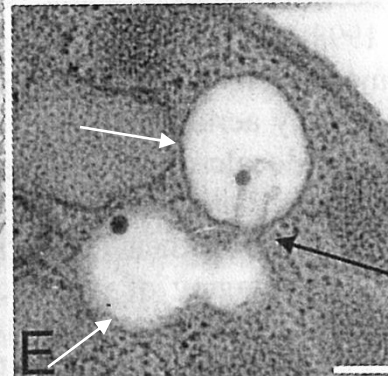
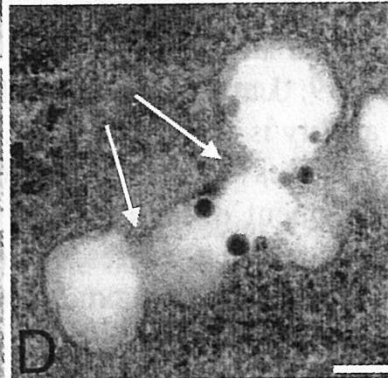
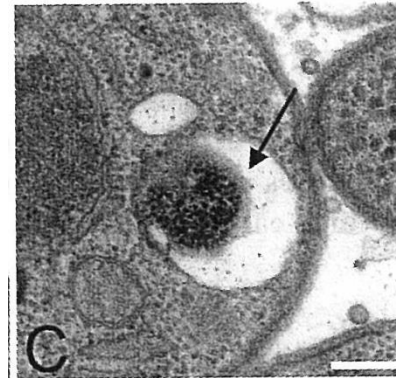
ACIDOKALCISOMY

TOXOPLASMA

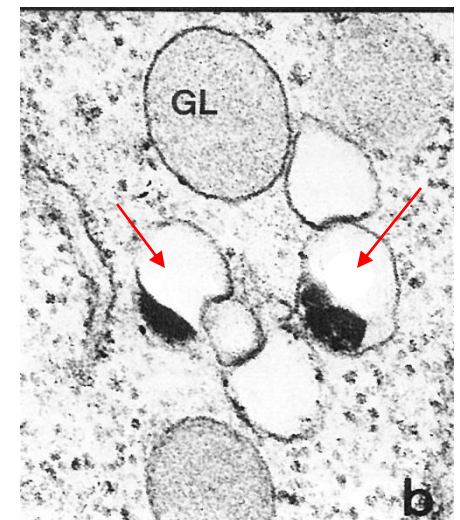
MORFOLOGIE V
TRANSMISNÍM
ELEKTRONOVÉM
MIKROSKOPU



EIMERIA



TRYPANOSOMA

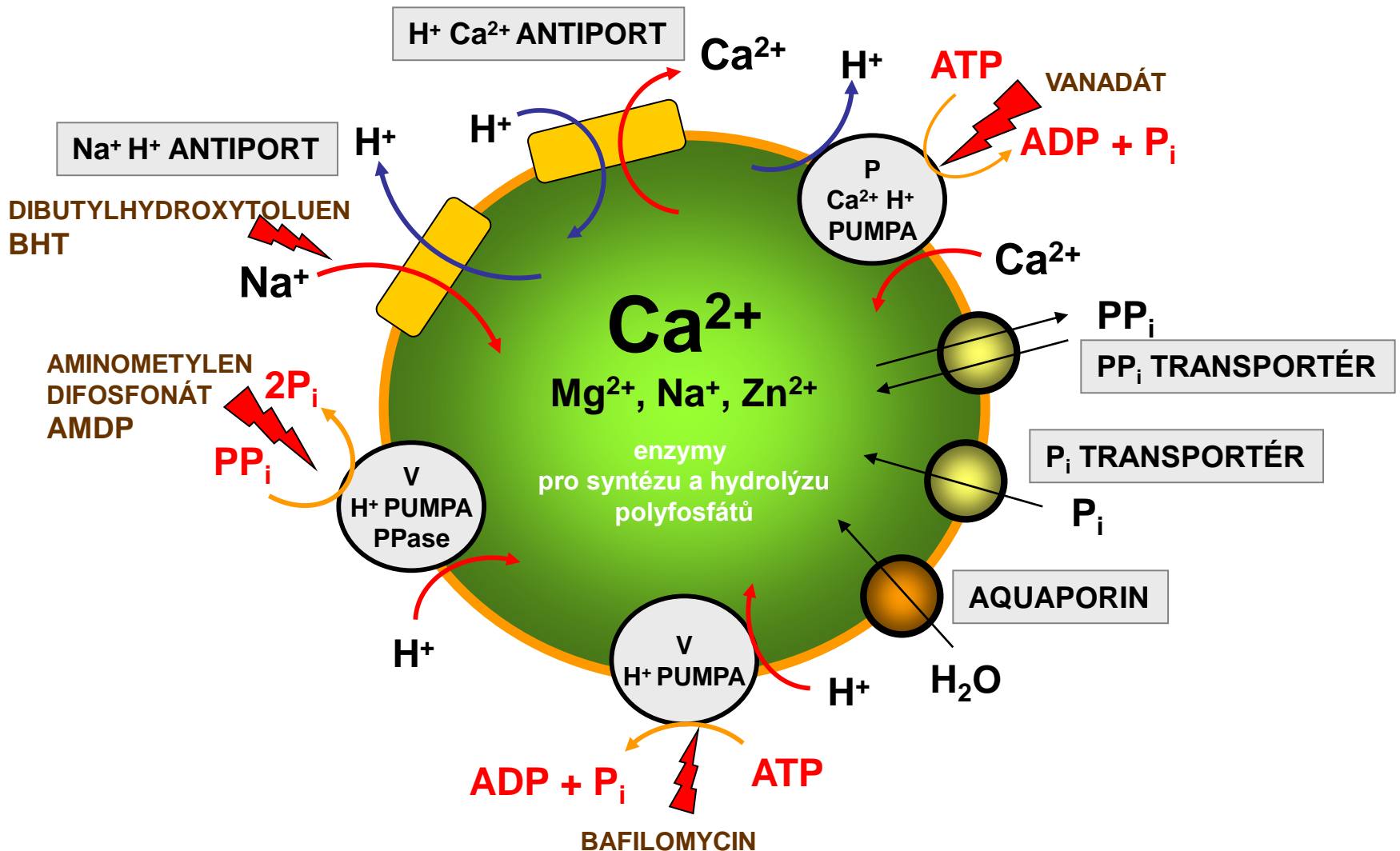


ACIDOKALCISOM

Ca²⁺ - H⁺ PUMPA – P- PROTEIN: PŘÍSLUN Ca²⁺

PROTONOVÉ V-PUMPY a Na⁺ H⁺ ANTIPORTY: REGULACE pH

AQUAPORINY: OSMOREGULACE



ZÁVĚR

- PARAZITIČTÍ PRVOCI MAJÍ ŘADU SPECIFICKÝCH ORGANEL, SOUVISEJÍCÍCH S JEJICH ZPŮSOBEM ŽIVOTA
- FUNKČNÍ SLOŽKY TĚCHTO ORGANEL JSOU VĚTŠINOU (ČI VÝHRADNĚ) KÓDOVÁNY V JÁDRU BUŇKY A DO PŘÍSLUŠNÉ ORGANELY TRANSPORTOVÁNY
- DÍKY SVÉ VÝLUČNOSTI SKÝTAJÍ POTENCIÁLNÍ NADĚJNÉ CÍLE PRO ANTIPROTOZOÁRNÍ TERAPII