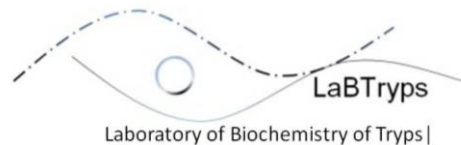


Aspectos contemporâneos da parasitologia

BMP0104

Introdução aos kinetoplastídeos



Ariel Mariano Silber
Depto de Parasitologia
ICB-USP



@Ariel_Lab

Kinetoplastídeos

Ordem	Subordem	Família	Género
		Bodonidae	Bodo Ichtyobodo
	Bodonina		
		Cryptobiidae	Cryptobia Trypanoplasma
Kinetoplastida			
	Trypanosomatina	Trypanosomatidae	Trypanosoma Leishmania Endotrypanum Crithidia Blastocrithidia Leptomonas Herpetomonas Phytomonas

Kinetoplastídeos

Supergrupo	Grupo	Subgrupo	Agrupamento	Géneros
Excavata	Euglenozoa	Kinetoplastea	Metakinetoplastina	
			↓ Compreende o clado Trypanosomatida	
			↓ (equivalente à família) Trypanosomatidae	Trypanosoma Leishmania Endotrypanum Crithidia Blastocrithidia Leptomonas Herpetomonas Phytomonas

Morfologias e estágios do ciclo de vida

Epimastigota



T. cruzi e *T. brucei*

- * Flagelo anterior ao núcleo
- * Replicativo, não infeccioso
- * Presente no inseto vetor

Promastigota



Leishmania spp.

Trypomastigota



T. cruzi e *T. brucei*

- * Flagelo posterior ao núcleo
- * Infeccioso, não replicativo
- * Dois origens: metacíclicos (derivados de epimastigotas) e sangüícolas (derivados de infecção)

Amastigota



T. cruzi e *Leishmania* spp.

- * Sem flagelo evidente
- * Replicativo, e infeccioso
- * Presente no hospedeiro mamífero como forma intracelular

Algumas peculiaridades

1. Citoesqueleto:

- A. **Microtubulos Subpeliculares**
- B. Flagelo

2. A membrana plasmática e a cobertura de superfície

3. Organização do DNA mitocondrial em uma estrutura única: **Cinetoplasto**

4. Um sistema complexo de **edição de RNA mitocondrial**

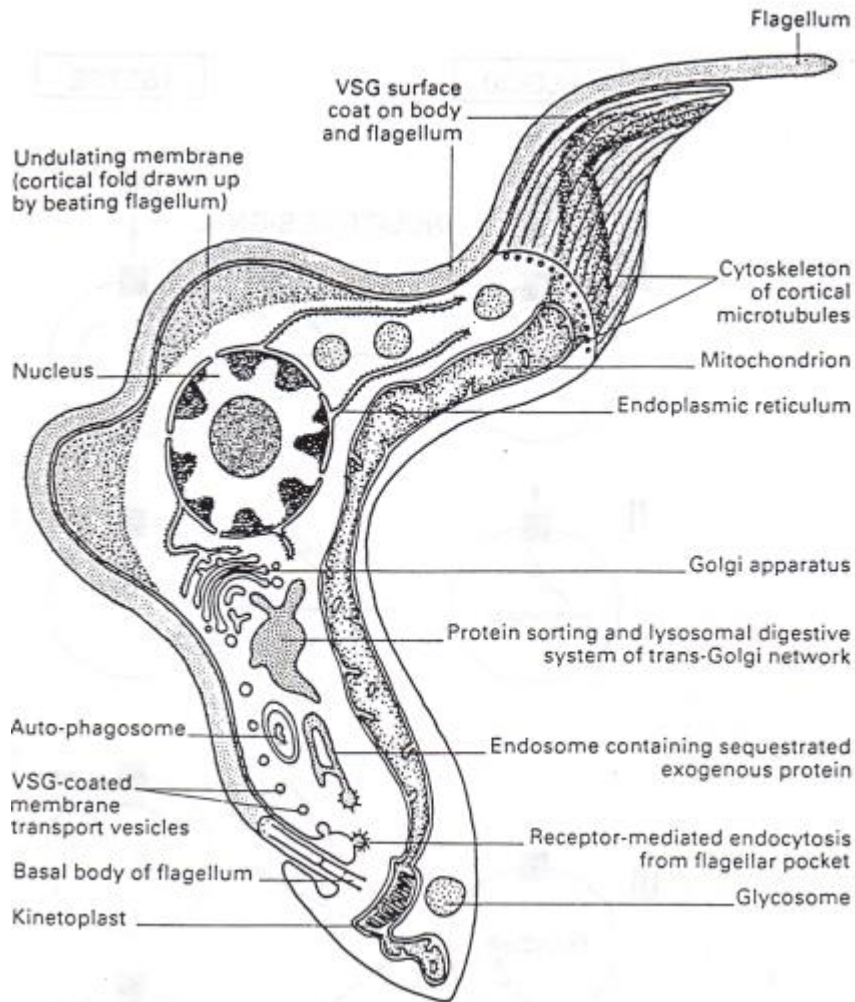
5. Expressão gênica:

- A. Arranjos de genes em **policistrons gigantes**
- B. **Trans-splicing** dos mRNAs transcritos

6. A compartimentalização da glicolise: **glicossomo**

7. Metabolismo de Tióis e do Nitrogênio

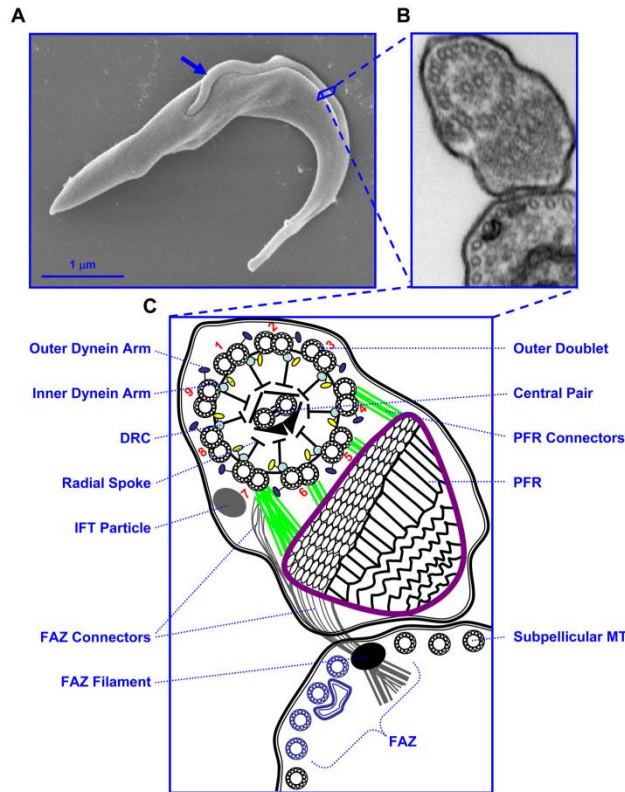
Trypanosoma brucei, um modelo



Estruturas particulares:

- **Flagelo**
- **Paraflagellar rod**
- **Microtubulos Subpeliculares**
- **Mitocôndria**
- **Cinetoplasto**: Região da mitocôndria contendo DNA altamente empacotado (20% do total)
- **Glicossomos**: peroxissomos contendo enzimas da via glicolítica

Flagelo: organela multifuncional



Motilidade

Adesão às células do hospedeiro

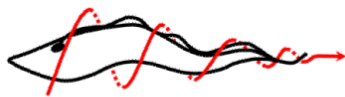
Endocitose

Divisão celular (parasitas sem movimento flagelar não conseguem completar citocinese)

Flagelo único no extremo anterior, emergendo próximo do corpo basal

Três domínios de membrana contíguos mas diferenciados: i. superfície celular; ii. Bolso flagelar; iii. membrana flagelar

Aderido ao corpo celular formando hélice levogira (sent antero-posterior) através da Flagellar Attachment Zone (FAZ), estrutura formada por proteínas do citoesqueleto e conexões membranosas



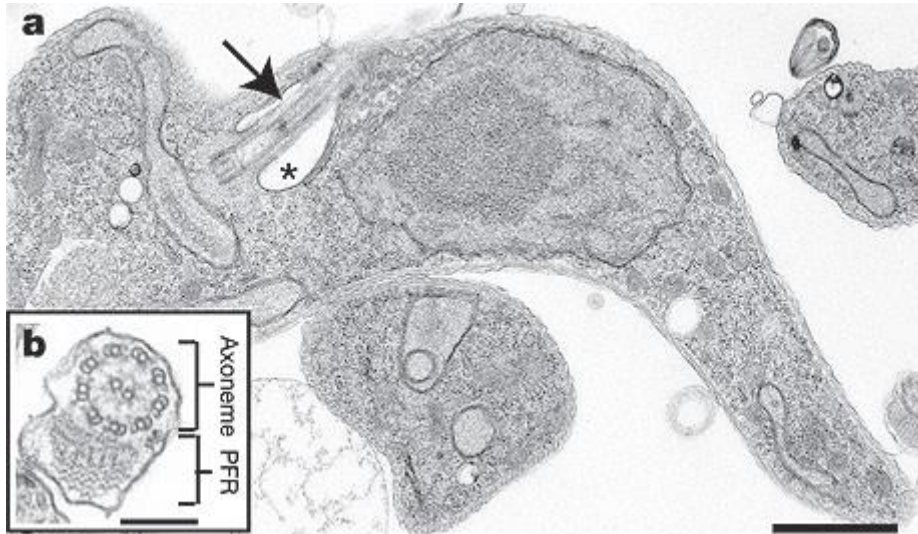
WT, Forward

Axonema típico (9 + 2)

Paraflagelar Rod (função ainda desconhecida)

Microtúbulos em Kinetoplastídeos

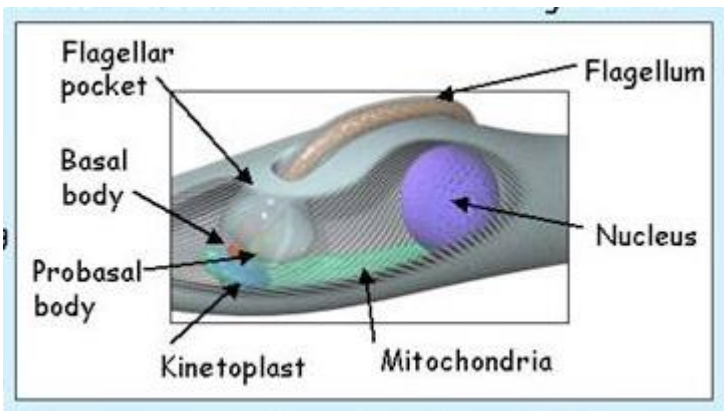
Micrografia eletrónica de varredura



O flagelo emerge do bolso flagelar e fica aderido ao corpo da célula ao longo do seu comprimento. Apresenta dois elementos estruturais principais:

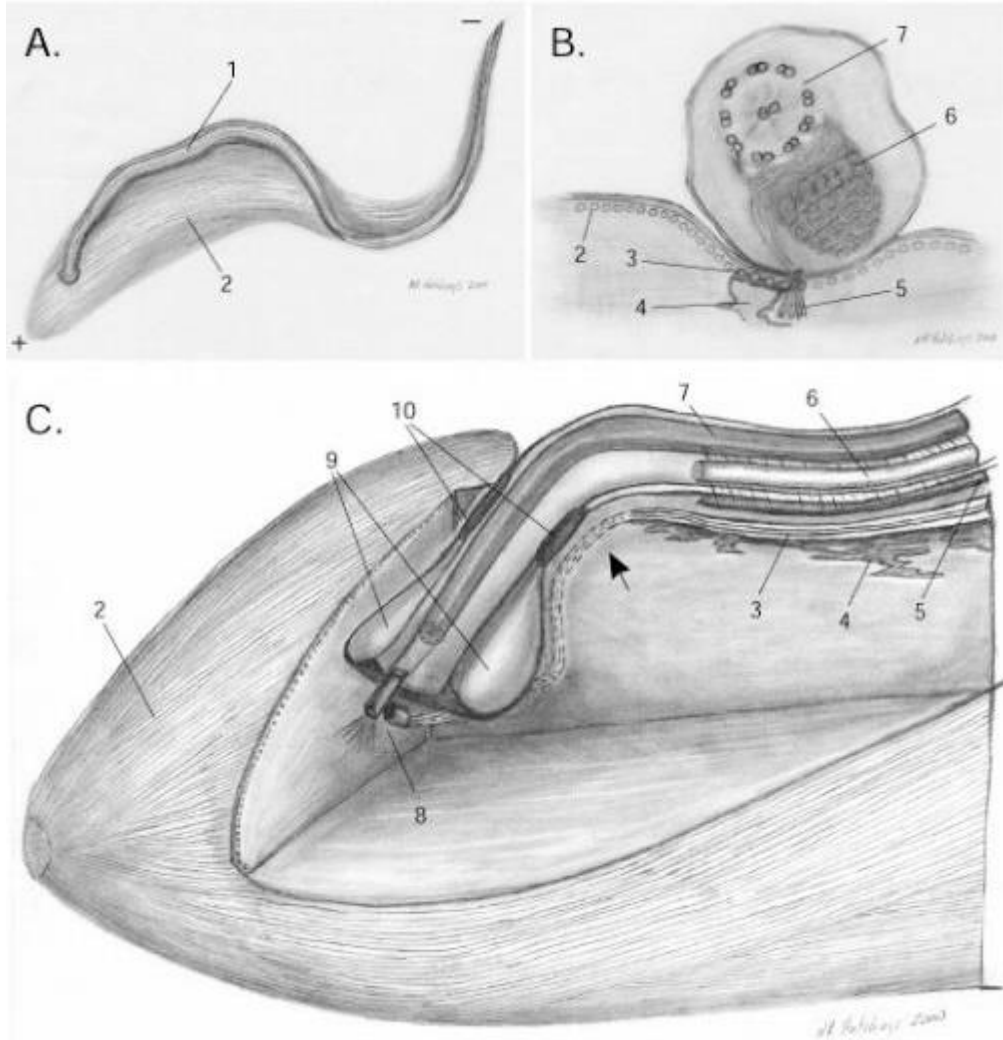
- (1) O **axonema microtubular (com estrutura canónica 9+2)** e
- (2) a **paraflagellar rod (PFR)**: uma estrutura Particular na região de emergência do flagelo com função ainda desconhecida.

Reconstrução 3D



Hill et al. 2003

Citoesqueleto em Kinetoplastídeos

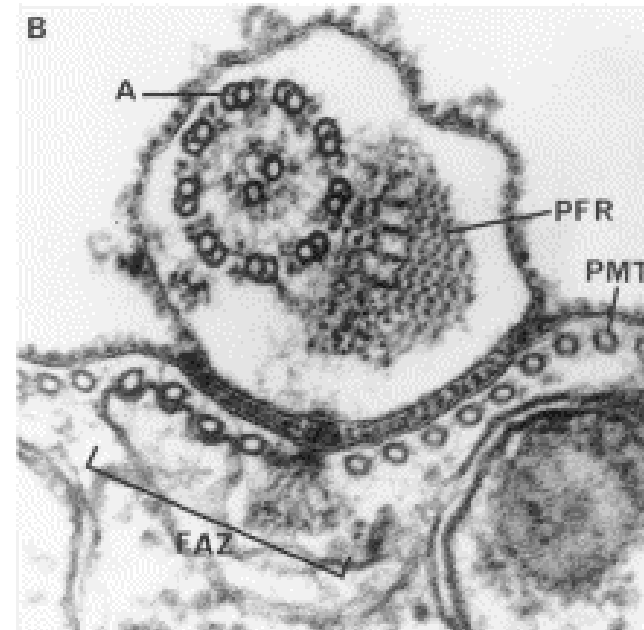
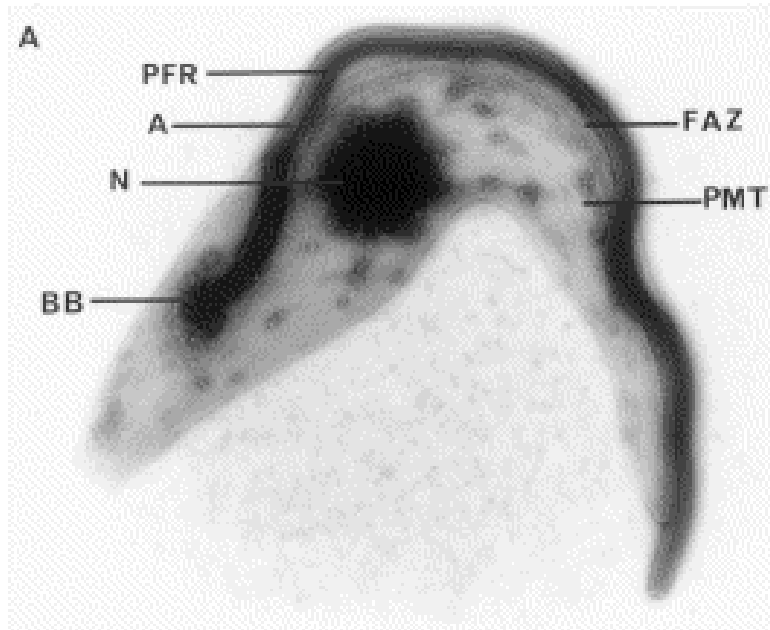


Citoesqueleto com estrutura única:

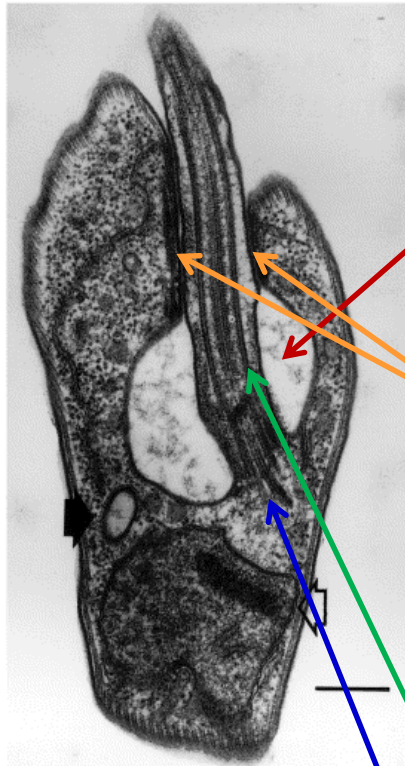
- **A:** Arranjo tipo gaiola de microtubulos sub-peliculares delimitando o corpo inteiro.
- Microtúbulos intimamente associados à membrana celular.
- Alto grau de entrecruzamento entre microtúbulos e a cara interna da MP
- **B: Seção transversal no méio da célula** olhando em sentido posterior-anterior. O flagelo contém um típico set de "9 + 2" microtúbules (7) junto com uma estrutura filamentosa chamada PFR (6). **Zona de adesão flagelar:** (5).
- **C: visão em corte da região do bolso flagelar.** O bolso flagelar (9) está formado por uma invaginação da MP na região onde o flagelo emerge do complexo do corpo basal (8).

Microtúbulos em Kinetoplastídeos

- Resistente a drogas com potente atividade antimicrotubular: colchicine
- Formados por subunidades de alfa e beta tubulina.
- Interconectados por proteínas associadas a microtúbulos (MAPs).
- Os novos microtúbulos são iniciados a partir de microtúbulos preexistentes.
- A maioria dos MT se estendem ao longo de todo o comprimento da célula.
- Há um quarteto especializado de MT na região de adesão do flagelo (FAZ).

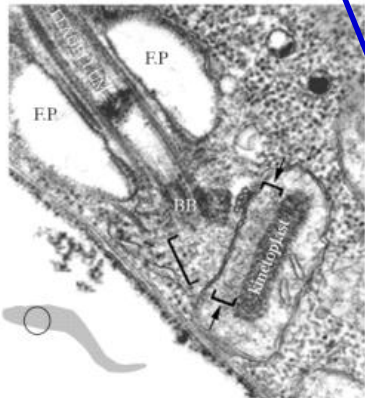


Bolso flagelar em Kinetoplastídeos



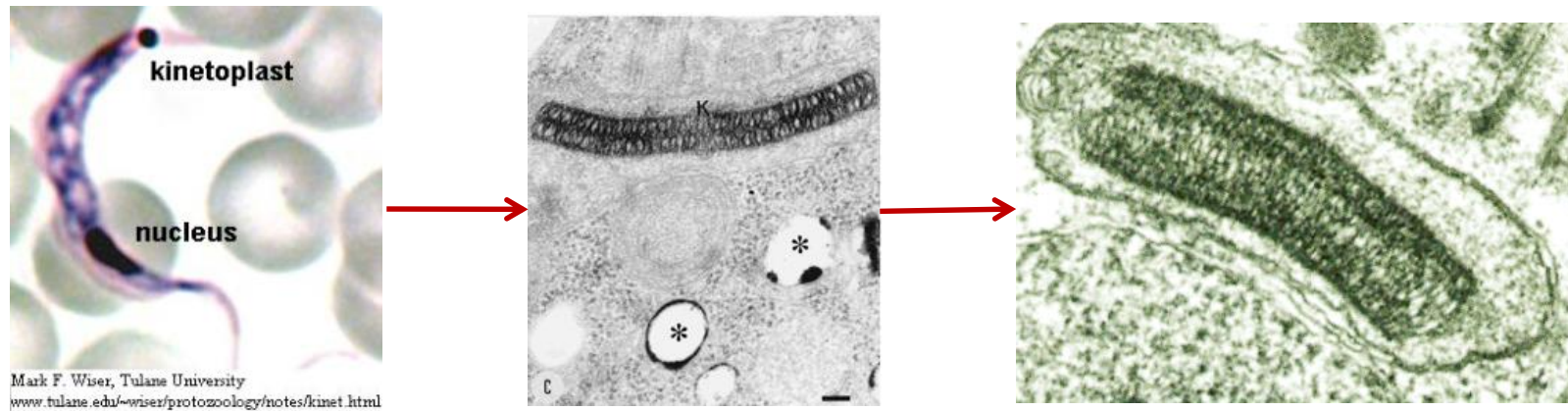
Formado por:

- (1) Uma invaginação da MP por onde o flagelo emerge. A invaginação forma um bolso devido à presença de zonas de adesão.
- (2) Nas zonas de adesão se aderem as duas camadas lipídicas criando uma barreira. O bolso flagelar é uma região livre de microtúbulos sub-peliculares, o que permite à membrana participar em eventos de fusão e excisão (exo- e endocitose). Sabe-se também que no bolso flagelar concentram-se as proteínas de membrana que participam dos processos de transporte de metabólitos, tendo uma função fundamental desde o ponto de vista nutricional.
- (3) A invaginação que forma o bolso flagelar forma também o lúmen do flagelo por onde passa o axonema.
- (4) O axonema se origina a partir do corpo do complexo basal.

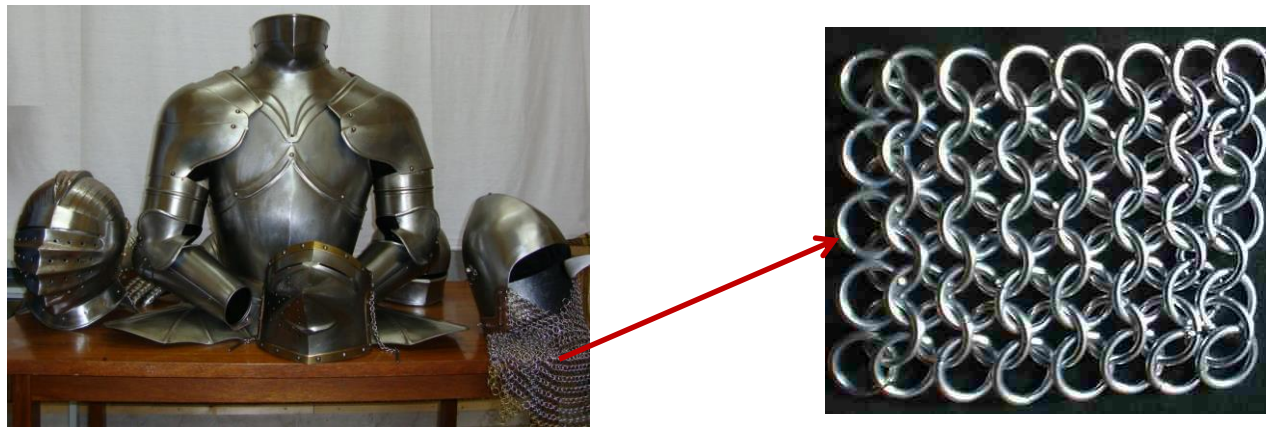


O cinetoplasto em Kinetoplastídeos

DNA com estrutura em forma disco formando uma rede próxima do corpo basal do flagelo
Contem o genoma mitocondrial
Tem valor taxonômico para esta ordem

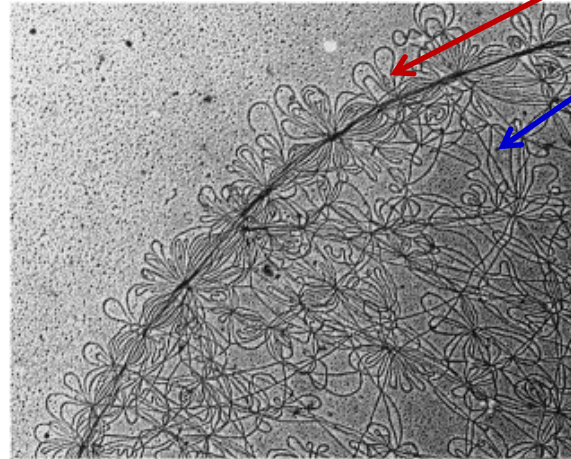
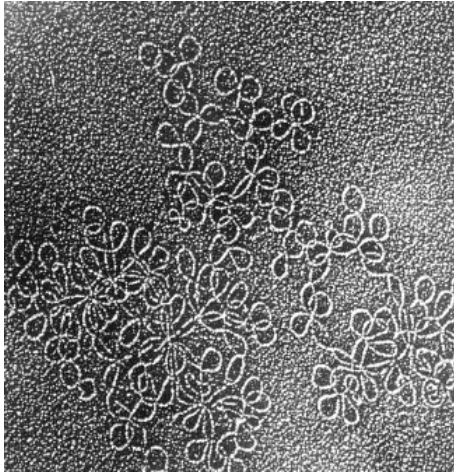


A estrutura parece uma cota de malha de armadura



O cinetoplasto em Kinetoplastídeos

- Cinetoplasto: rede formada por anéis de DNA denominados mini e maxi círculos



5-20 x10³ minicírculos (0.8-2.5 kb) e 20-50 maxicírculos (23-36 kb).

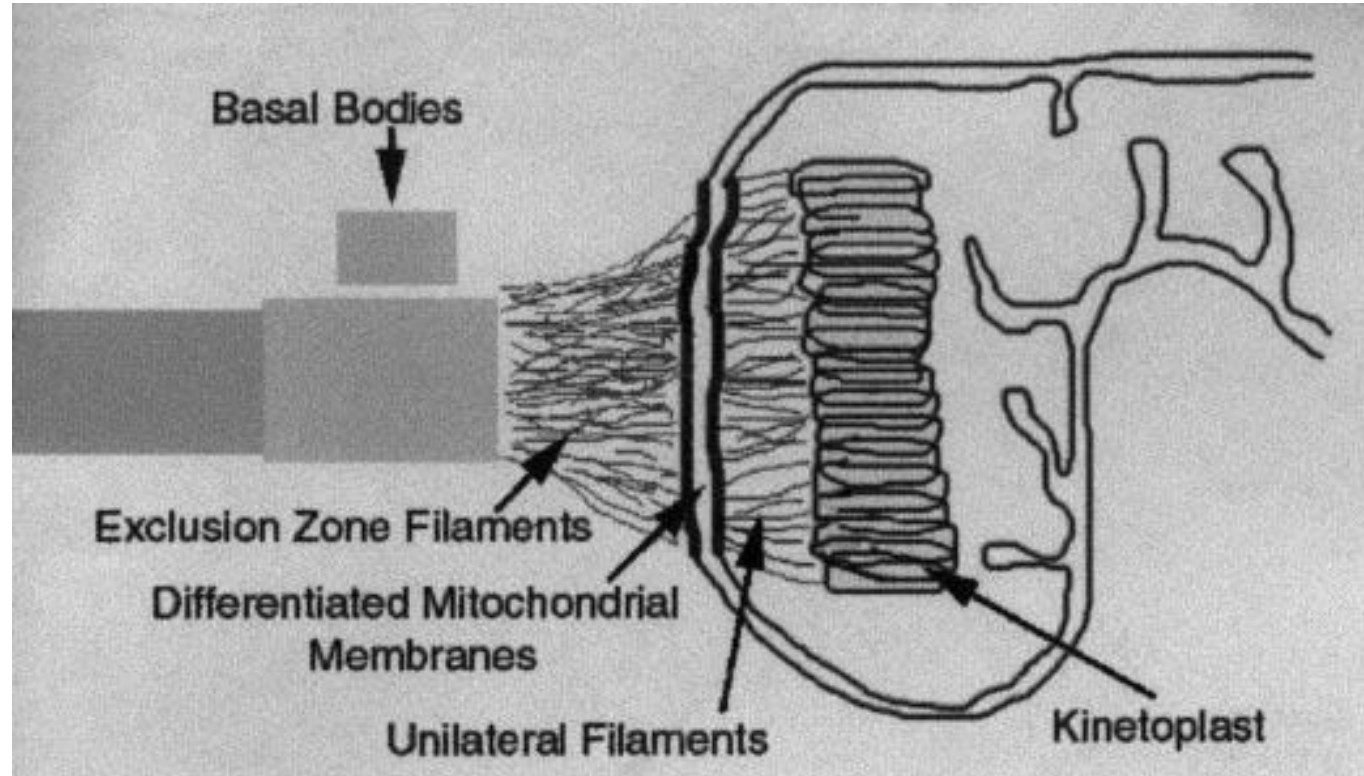
- **Maxicírculos: 20-40 kb.** DNA codificante de RNAs ribossomais e subunidades de complexos da cadeia respiratória. Também possuem uma região variável não transcrita.

mRNAs transcritos de maxicírculos são “editados”

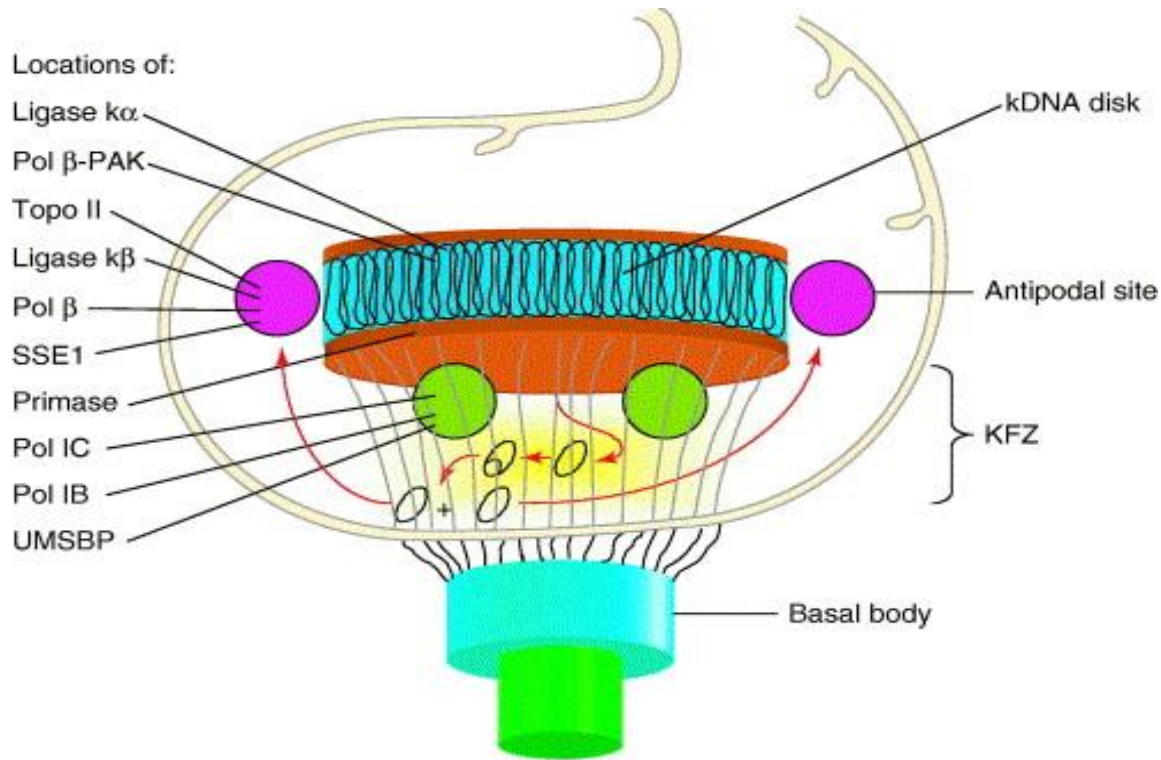
- **Minicírculos: 0.5-2.5 kb.** Codificam os gRNAs (RNAs guia)

Corpo basal, flagelo e kinetoplasto

As três estruturas estão fisicamente conectadas



O problema da replicação do cinetoplasto



Replicação próxima de fase S
(sincronizada com ciclo celular)

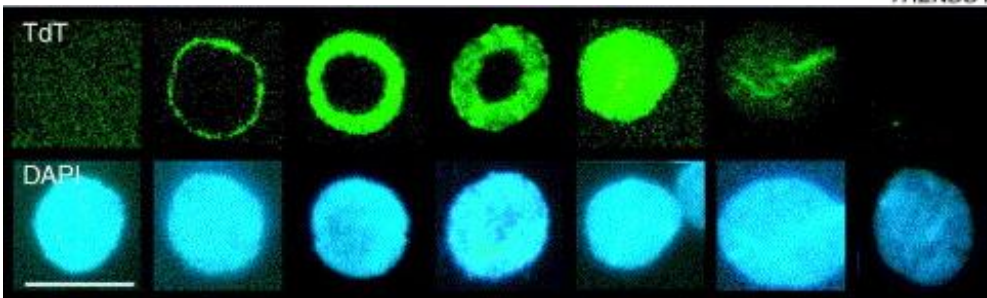
O kDNA é rodeado por proteínas que formam complexo replicativo

Minicírculos NÃO replicam enquanto estiverem unidos à rede. Só quando são soltos (DNA Topoisomerase II)

Minicírculos são covalentemente unidos à rede após replicação mas “niquados” (o que os marca minicírculo replicados)

Maxicírculos replicam sem serem retirados da rede

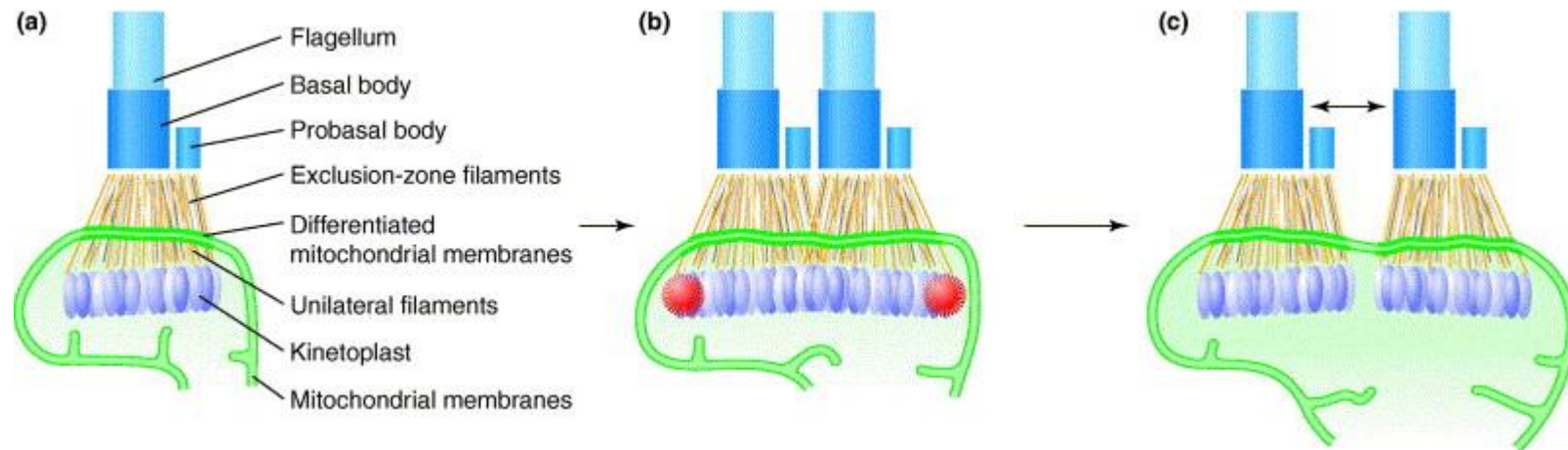
Os nicks são recheados e as redes filhas são reorganizadas (DNA Topoisomerase II)



TRENDS in Parasitology

O problema da replicação do cinetoplasto

Ao separar-se os corpos basais flagelares separam os cinetoplastos replicados

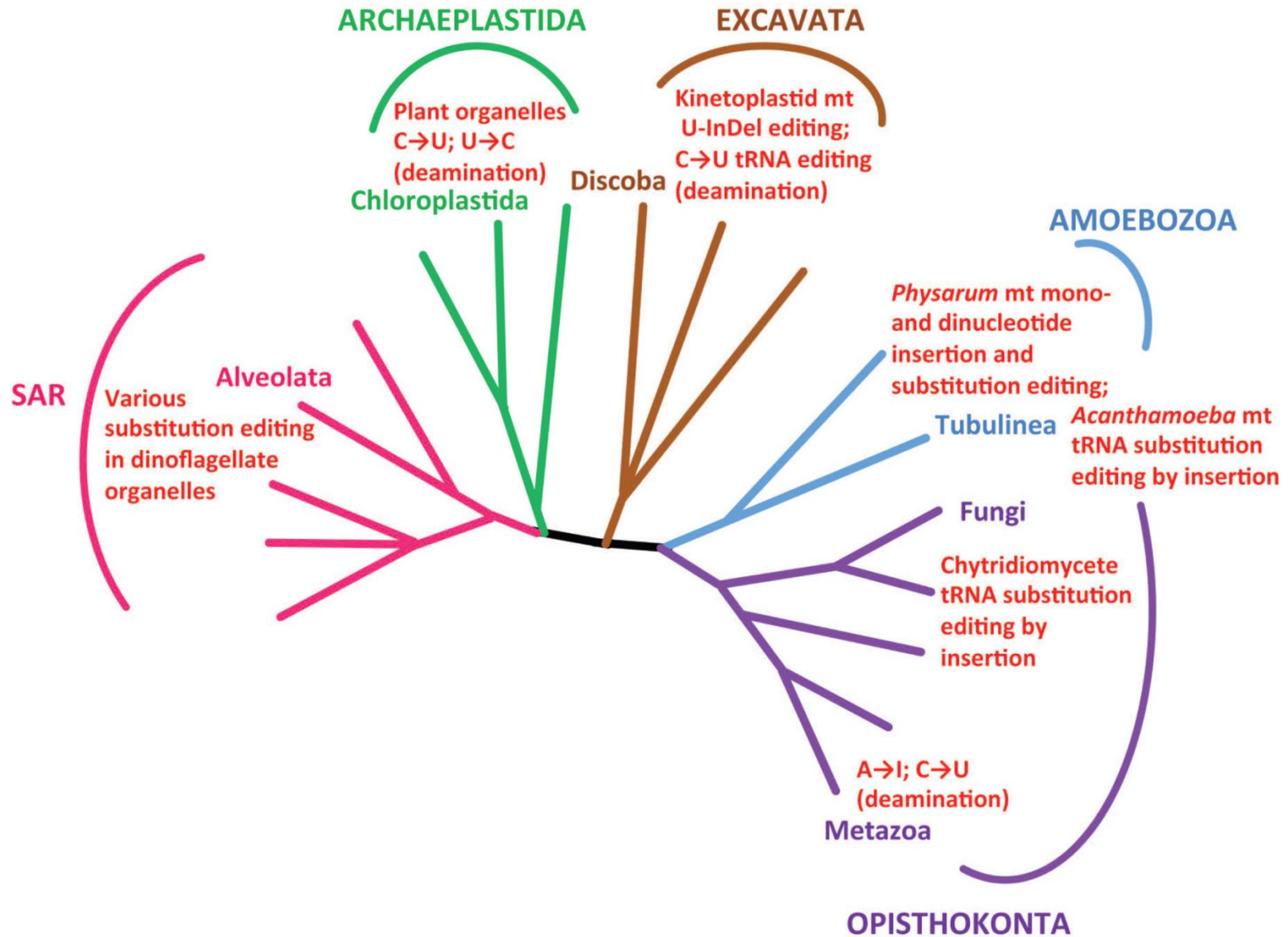


A edição de RNA em Kinetoplastídeos

Os transcritos primários mitocondriais (pré-mRNAs) devem ser modificados mediante inserções e deleções sítio específicas de resíduos uridilato (U).

- Os pré-mRNAs são codificados nos maxicírculos de DNA.
- A edição dos pré-mRNAs cria códons de início e terminação da tradução, corrige fases de leitura, e até constrói fases de leitura abertas completas a partir de sequências não traduzíveis.
- Os transcritos editados são traduzidos para produzir componentes da cadeia de fosforilação oxidativa: subunidades do complexo I (NADH-UQ reductase), III (Cyt bc1), IV (cyt oxidase) and V (ATP sintase).
- Os minicírculos codificam RNAs-guia (gRNAs) que sinalizam o quê, e onde editar.

A edição de RNA

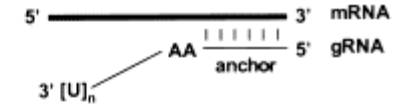


A edição de RNA em Kinetoplastídeos

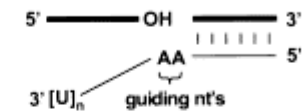
Eventos catalíticos na inserção e deleção

- Pré-mRNAs são editados 3' a 5'.
- Interação entre RNAs por pareamento de bases (Watson-Crick) e pareamento G-U determina os sítios de clivagem e o nro. de Us a serem adicionados ou removidos.
- Acontece um clivagem do pré-mRNA por uma endonuclease a montante do duplex formado (8-10 bp) entre o pré-mRNA e seu gRNA “cognato”. Us são adicionadas ao 5' por uma TUTase (terminal uridyl transferase) ou removidas por uma ExoUase. Os fragmentos de mRNA resultantes 5' 3' são ligados por uma RNA ligase.

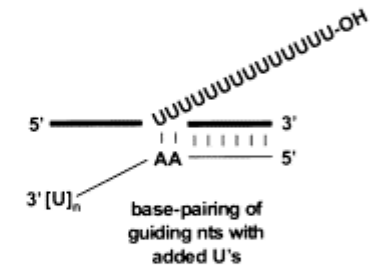
1. Annealing



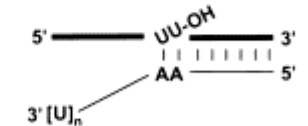
2. Cleavage



3. U-addition



4. Trimming



5. Ligation



Organização nuclear

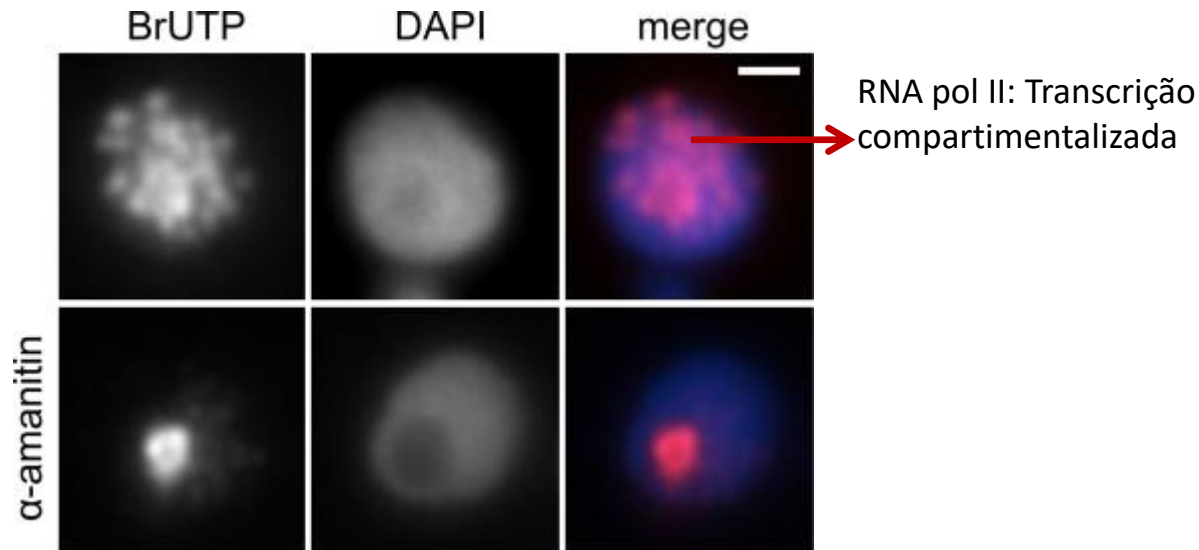
Ploidia: 2N - *L. major*: 36 cromossomos, *T. cruzi*: 28 cromossomos

Genoma transcrito pelas três RNA polimerases

RNA Pol I pode transcrever genes que codificam proteínas

Genes organizados em “large directional gene clusters” (disposição cabeça-cauda) separados por regiões denominadas “strand switch regions”, transcritos por RNA pol II

RNA pol III: funções convencionais (RNAs não codificantes)



Expressão gênica em Kinetoplastídeos

Eucariotas

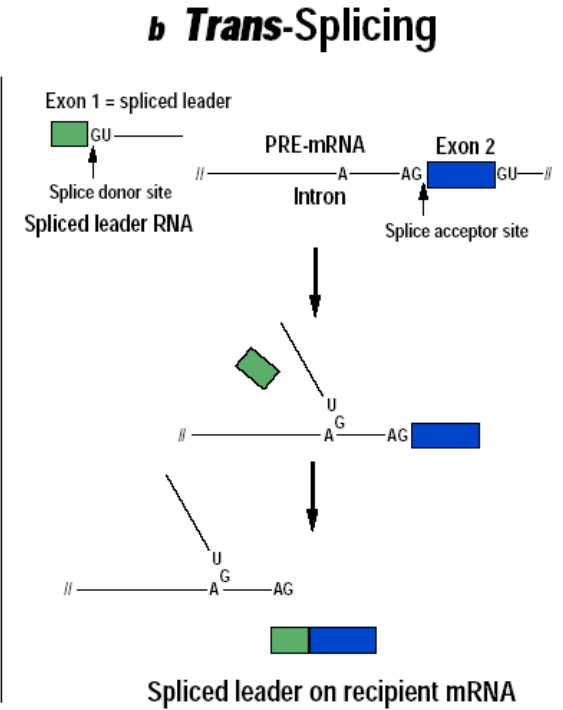
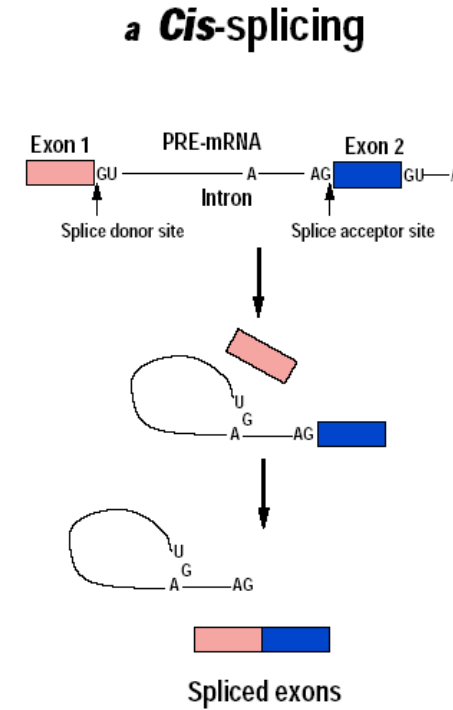
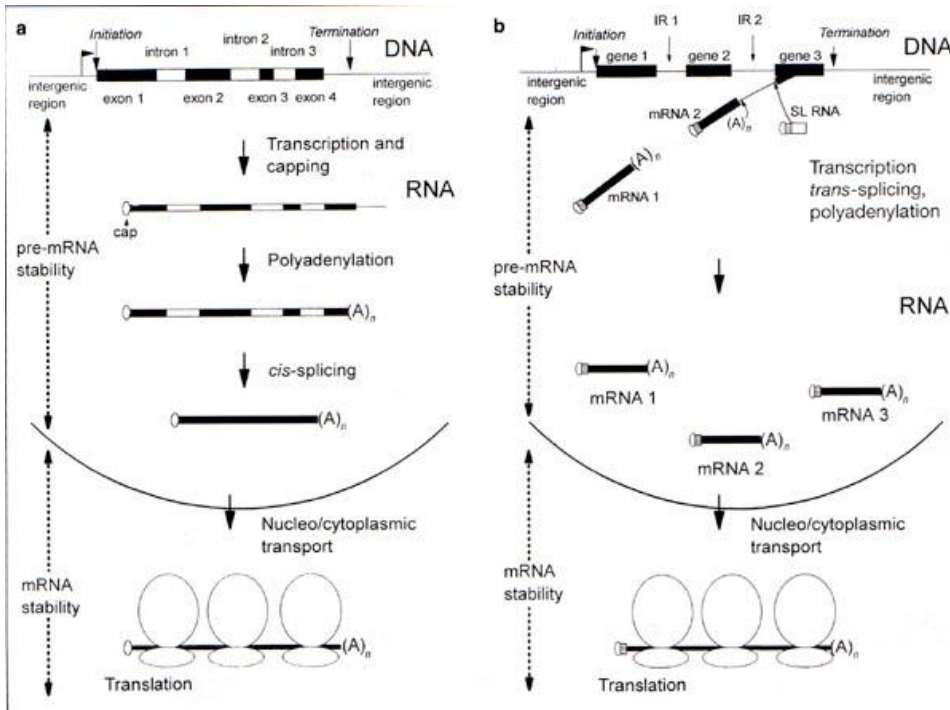
- o DNA é desenovelado (helicase) e transcrito a um pré-mRNA
- o Pre-mRNA é processado para remoção dos introns – *Cis-splicing* e *capping*
- o Pre-mRNA madura a um mRNA – Poliadenilação
- o mRNA é transportado for a do núcleo
- os ribossomos traduzem o mRNA a proteínas

Kinetoplastídeos

- o DNA é desenovelado (helicase) e transcrito a um pré-mRNA – transcrição poli-cistrônica
- Ausência de introns
- o Pre-mRNA madura a um mRNA – *Trans-splicing*, adição de um *mini-exon* e Poliadenilação
- o mRNA é transportado for a do núcleo
- os ribossomos traduzem o mRNA a proteínas

Expressão gênica em Kinetoplastídeos

Eucariotas e tripanossomas: semelhanças e diferenças



Cis-splicing :
*Elimina introns

Trans-splicing
*Separa genes e adiciona o Mini Exon e a cauda de poli-A ao mRNA

Expressão gênica em Kinetoplastídeos

Regulação da expressão gênica

Como regra geral não há sequências promotoras no genoma dos kinetoplastídeos

Regulação pós-transcricional:

- dosagem gênica (Nro. cópias)
- taxas de trans-splicing e polyadenilação
- estabilidade dos mRNAs
- taxas de tradução

Outras vias de regulação das atividades proteicas:

localização subcelular

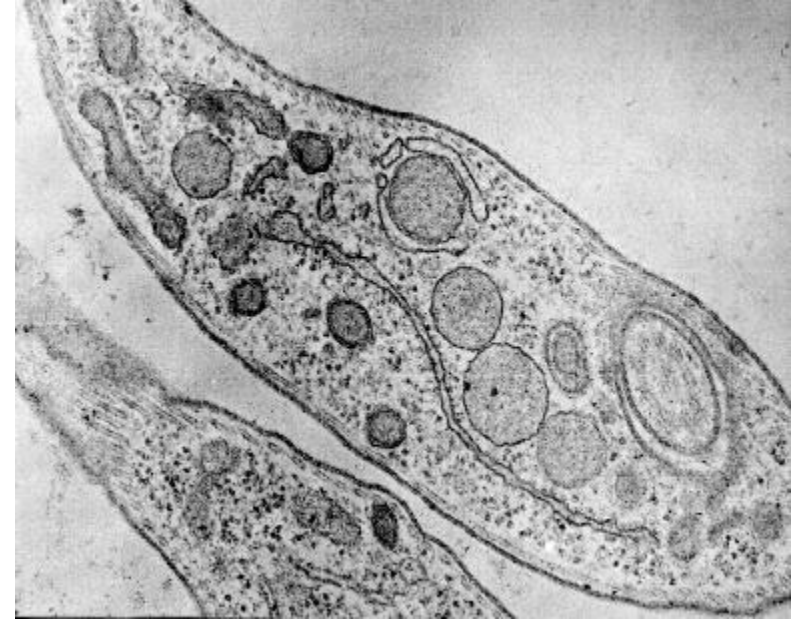
Outras????

Glicólise em Kinetoplastídeos

As primeiras reações da via glicolítica estão compartimentadas em uma organela denominada glicosomo (derivados de peroxissomos)

Algumas características:

- (1) Membrana com uma bicamada de fosfolipídeos electron-densa, e matriz proteica, sem DNA detectável;**
- (2) Aproximadamente 90% das enzimas são glicolíticas, porém há presença de outras enzimas do metabolismo redox (enzimas do metabolismo de peróxidos, oxidação de ácidos graxos);**



Glicólise em Kinetoplastídeos

Glc é convertida em piruvato com a produção de metabólitos reduzidos como succinato e alanina.

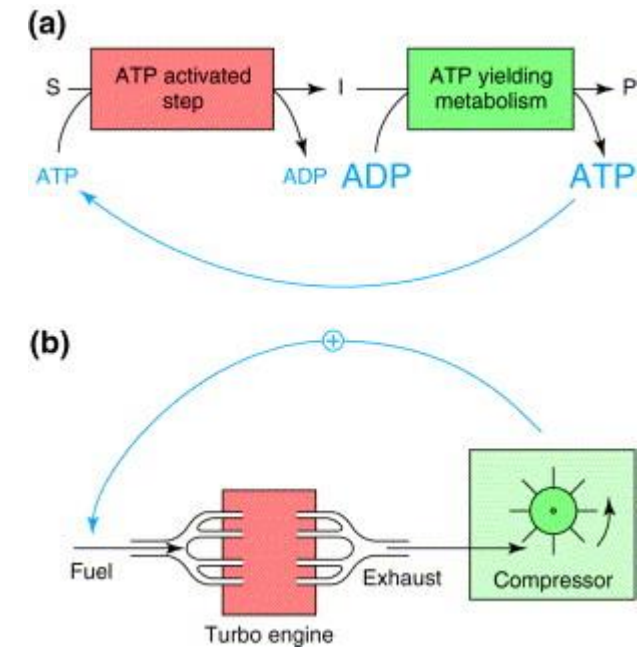
Algumas características da glicólise:

“Fermentação aerobia”

Ausência de efeito Pasteur

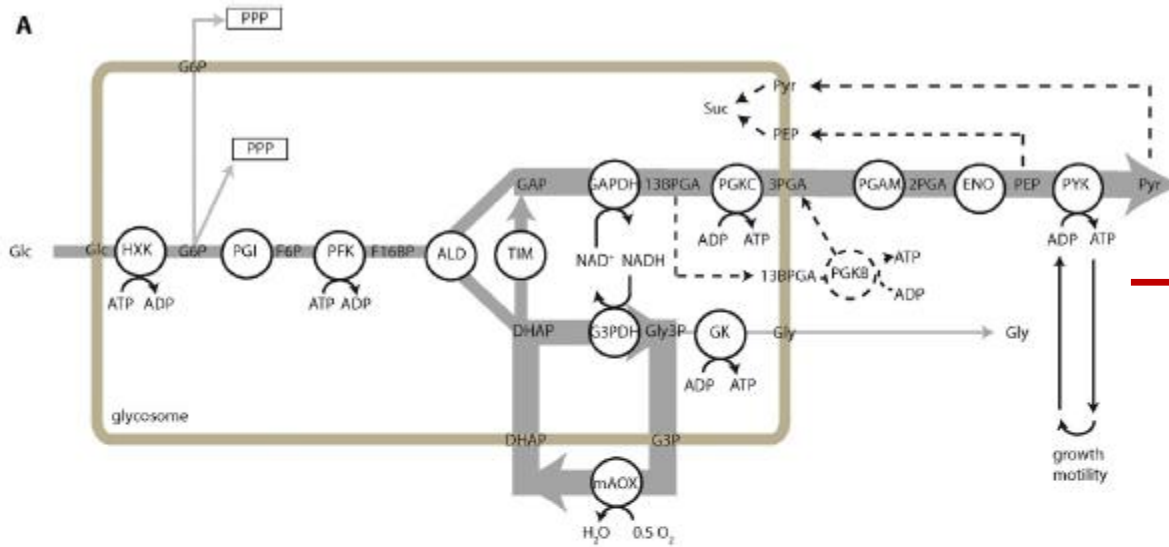
Ausência de pontos regulatórios característicos (hexoquinase por exemplo)

Turbo design of tryps glycolysis

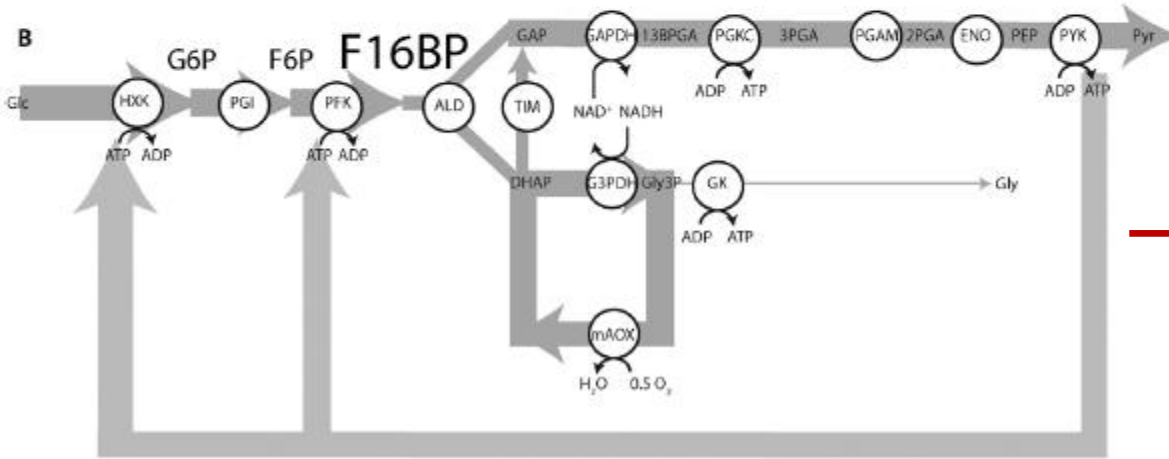


A compartimentalização das enzimas glicossomais possibilita a configuração regulatória da glicólise em tryps

A lógica do controle glicosossomal

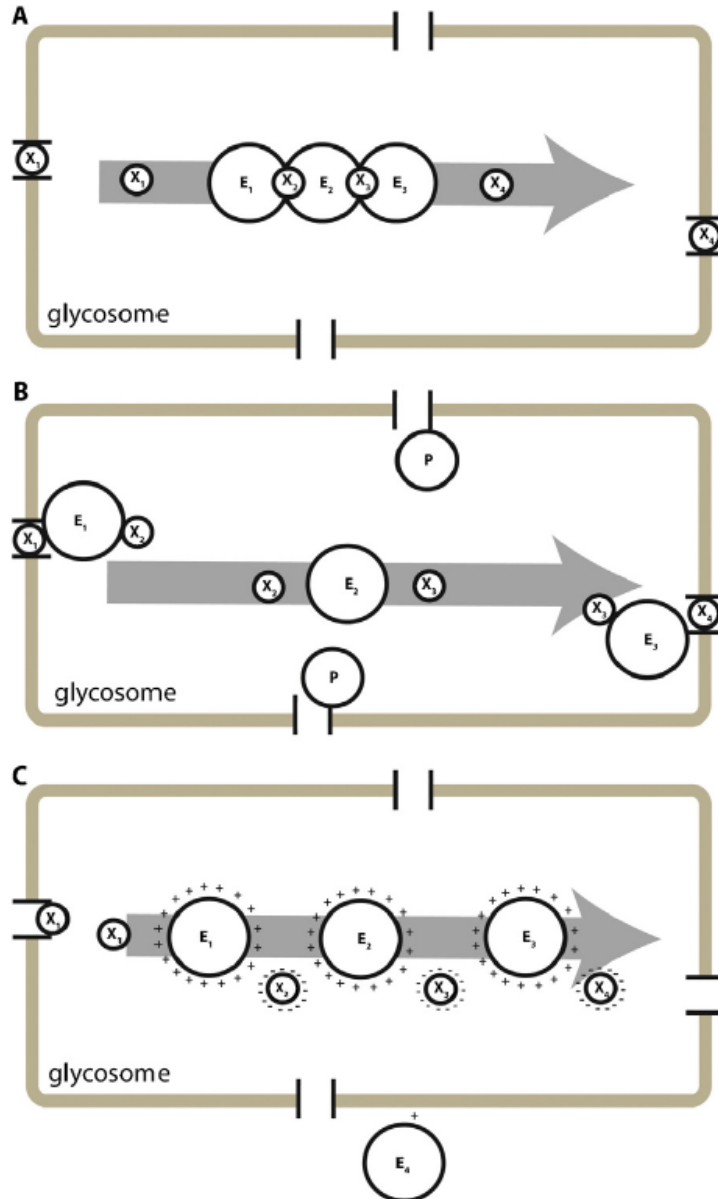


Simulação da via glicolítica COM compartimentalização



Simulação da via glicolítica SEM compartimentalização

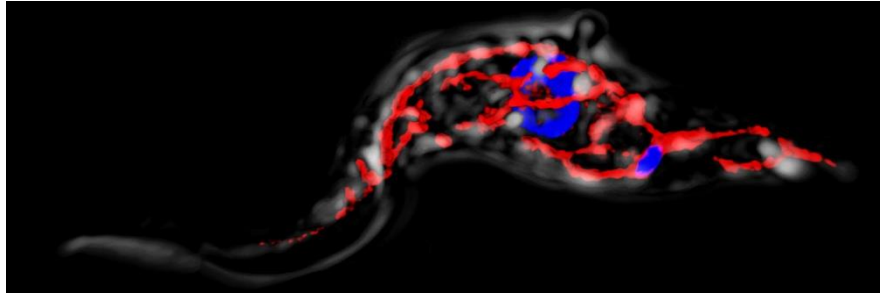
A lógica do controle glicosossomal



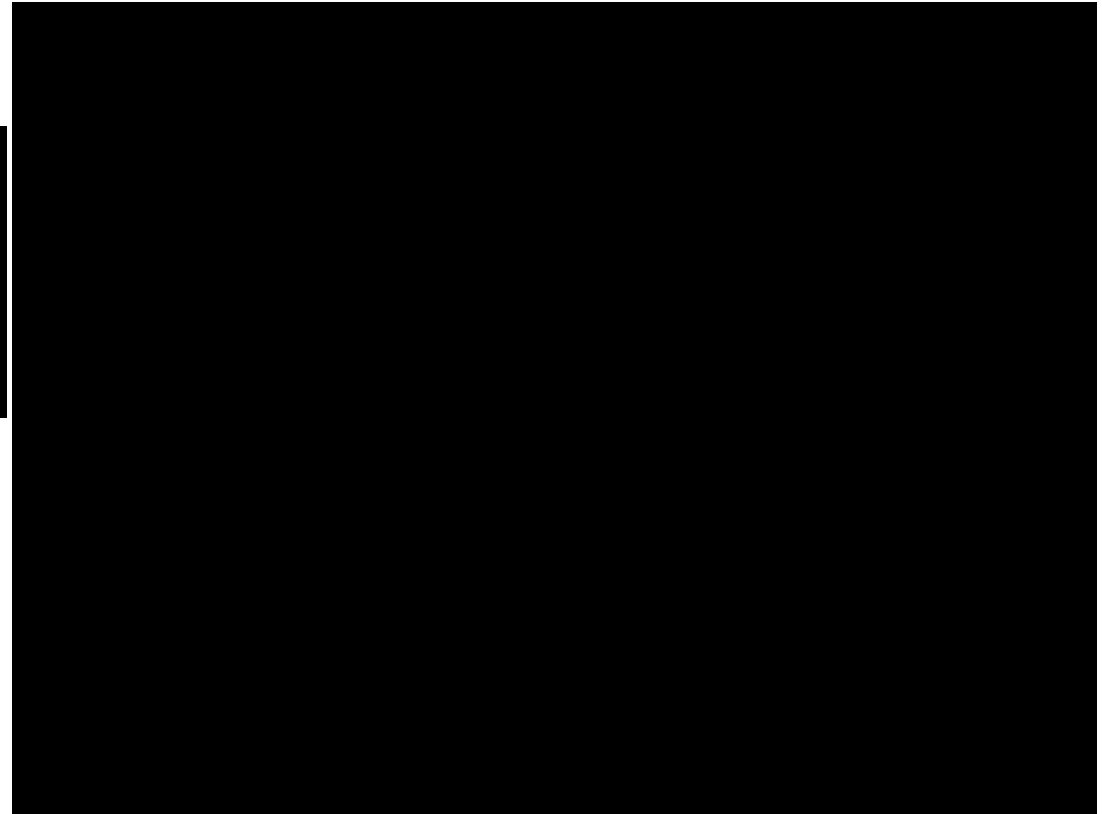
Entrada e saída de metabólitos:

- Exclussão por tamanho
- Não permitidos: NXPs (ATP, ADP, GTP, etc.), NAD(P)(H), FADH₂, X-CoA

A mitocôndria e o metabolismo energético em Kinetoplastídeos



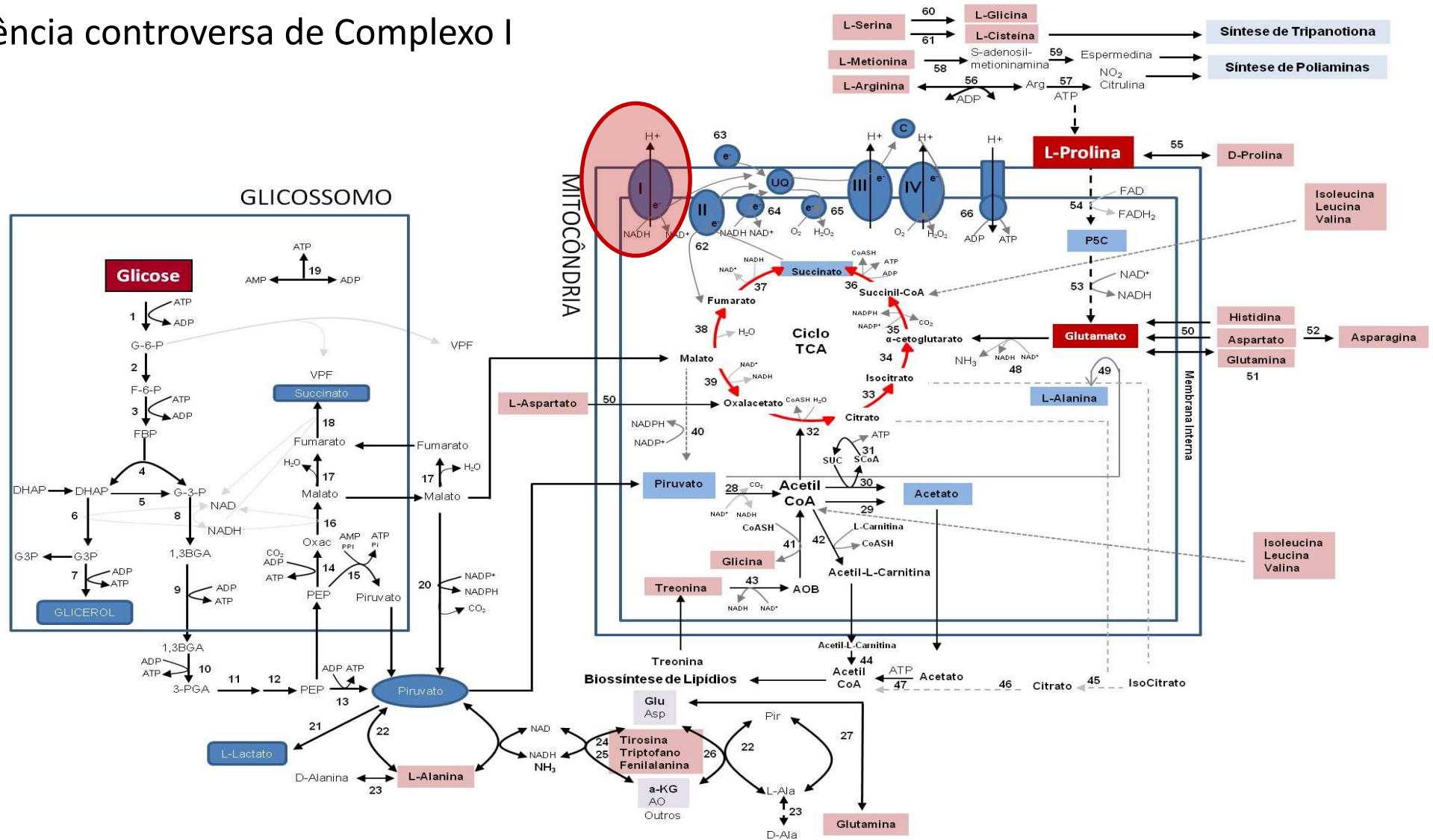
Credit: Dr. Megan Provelones – Penn State Brandwyne.



Vanwalleghem G. Et al., 2015, Nat. Commun.

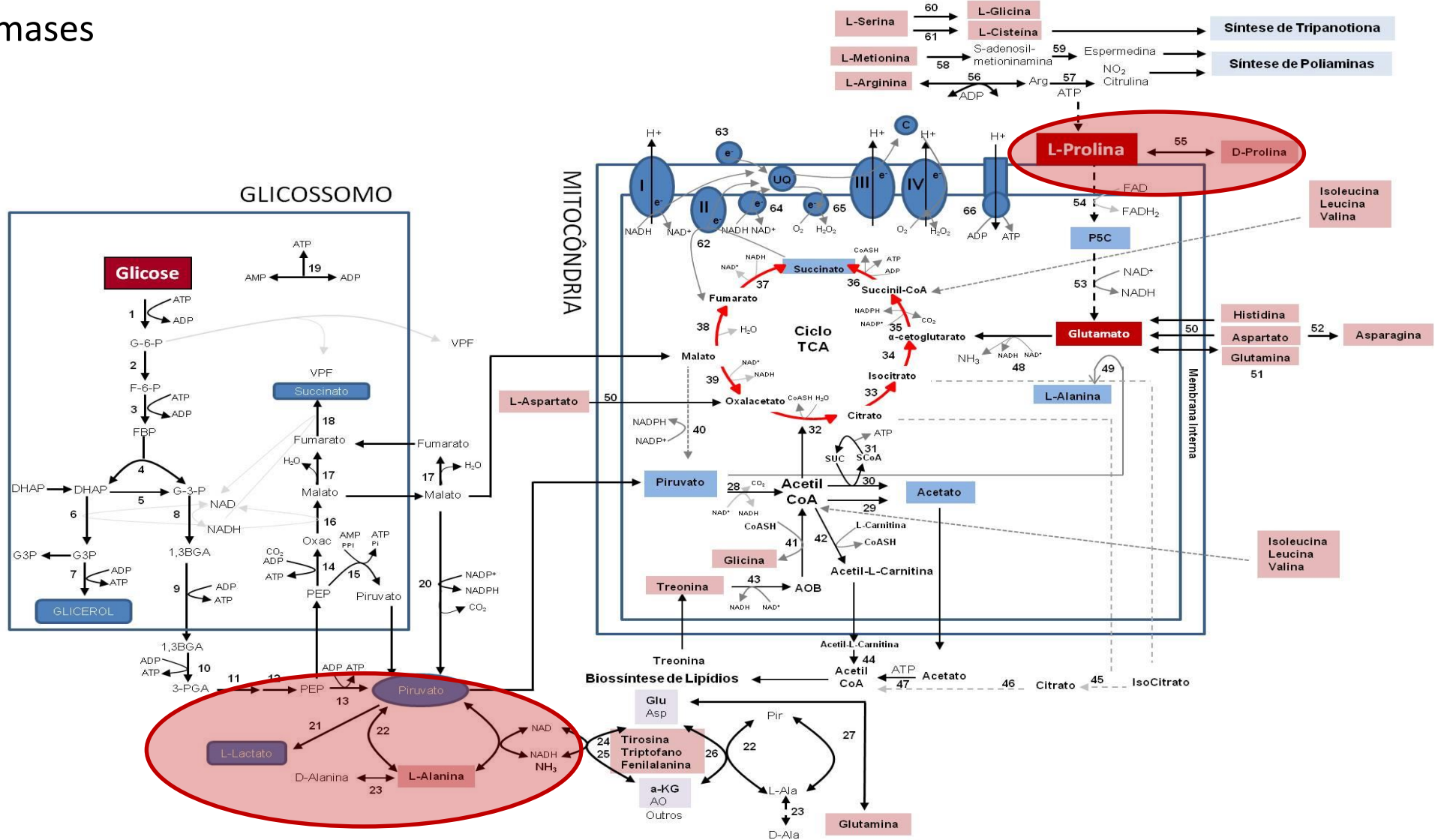
Metabolismo energético

Existência controversa de Complexo I



Metabolismo energético

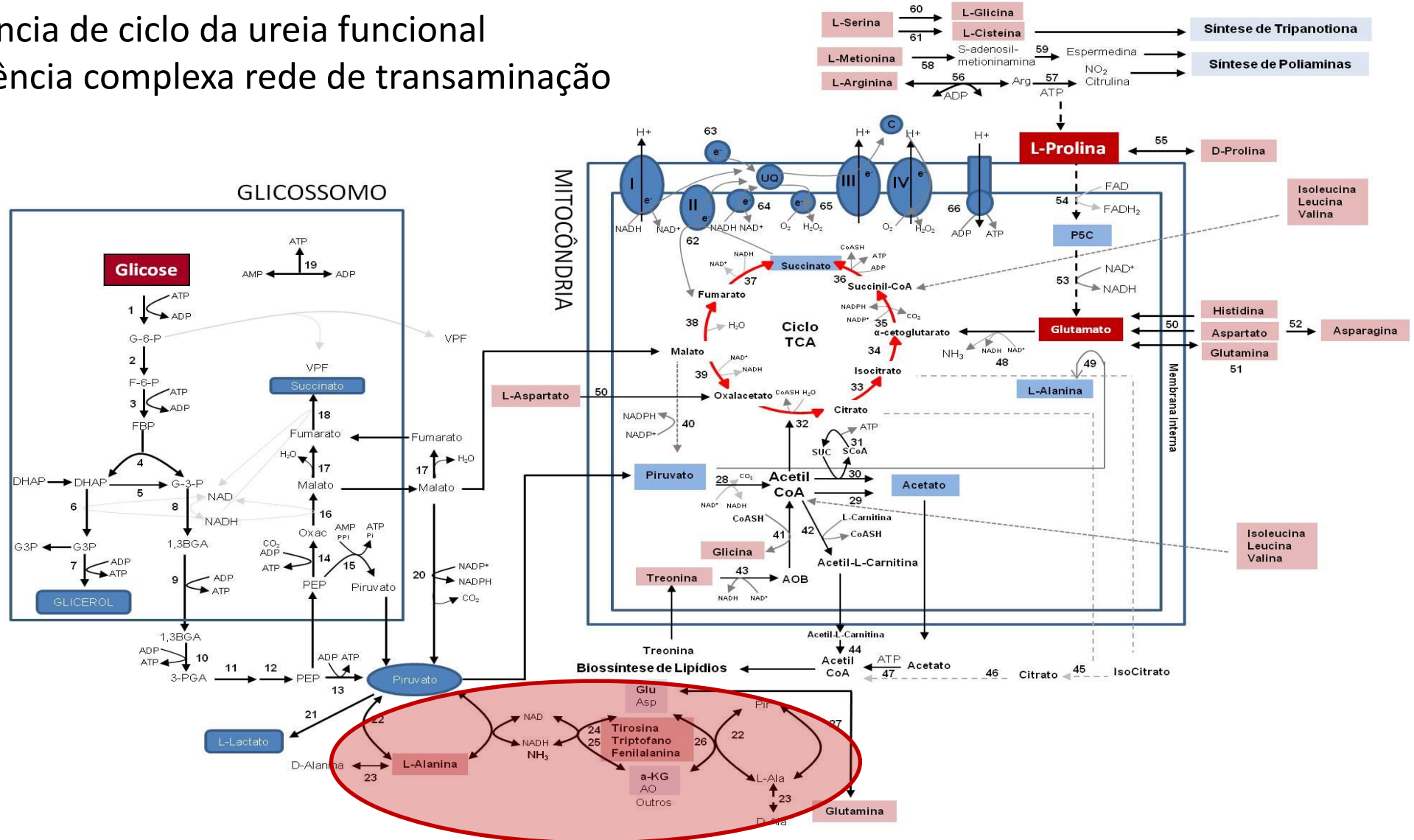
Racemases



Metabolismo energético

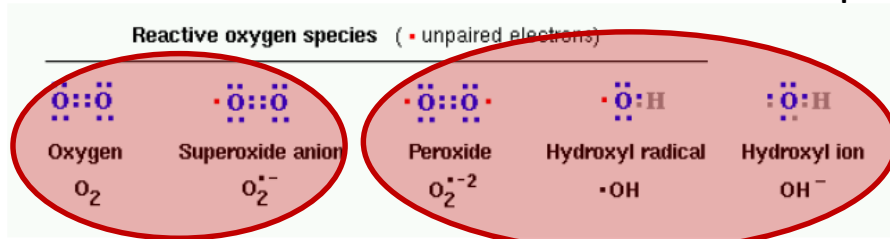
Ausência de ciclo da ureia funcional

Existência complexa rede de transaminação



Metabolismo redox

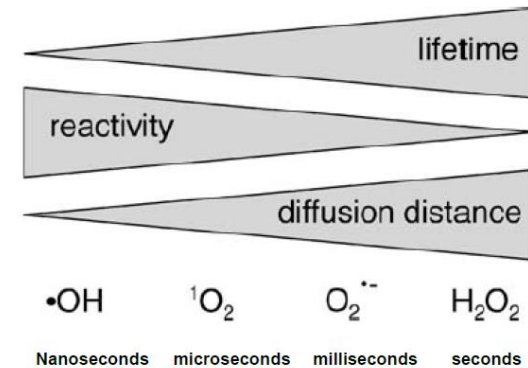
Espécies reativas do Oxigênio (ROS) são um conjunto bem diverso de espécies químicas com uma diversidade de características fisicoquímicas.



Defesa Enzimática (Catalases, peroxidases, etc.)

Defesa química (-SH, outras espécies químicas reduzidas)

Méia-vida das ROS



Metabolismo redox

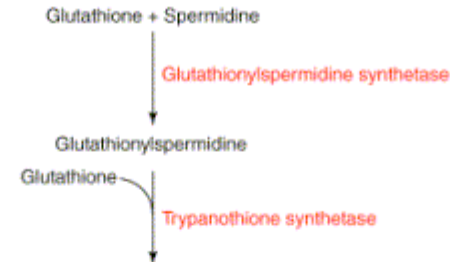
Sistemas de defesa contra o estresse oxidativo

Baseado em tióis de baixo peso molecular

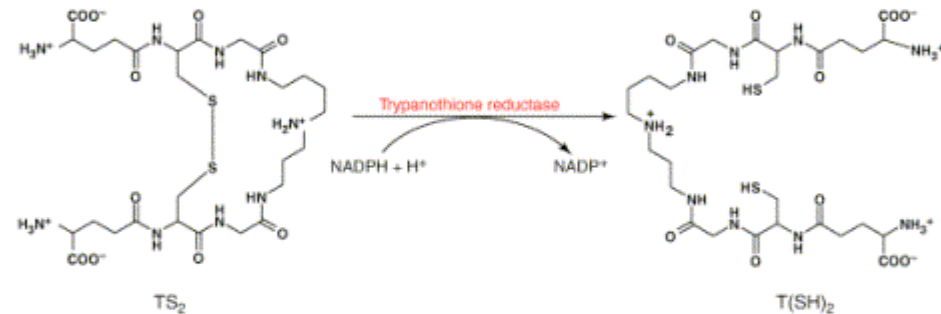
- Sistema comum a todos os eucariotas: **cisteína e derivados de aminoácidos enxofrados**

- Sistema exclusivo de Kinetoplastídeos: síntese de um conjugado de bis-glutathionyl-espermidine (**trypanotiona**) e a atividade **trypanotiona reductase** (este sistema substitui o baseado em glutathiona/glutathiona reductase).

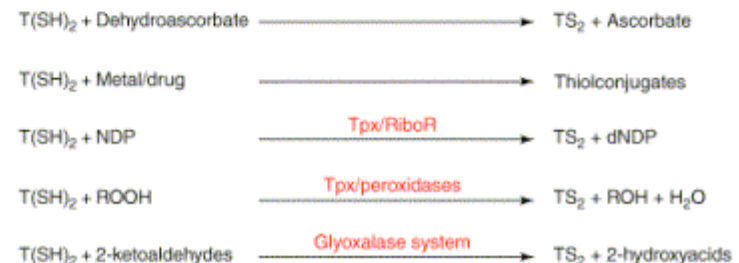
(a) T(SH)₂ synthesis



(b) TS₂ reduction

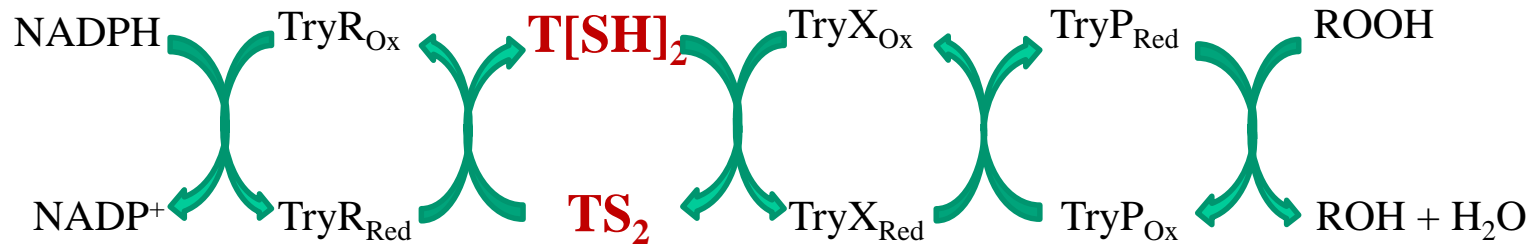


(c) T(SH)₂-dependent reactions



Metabolismo redox

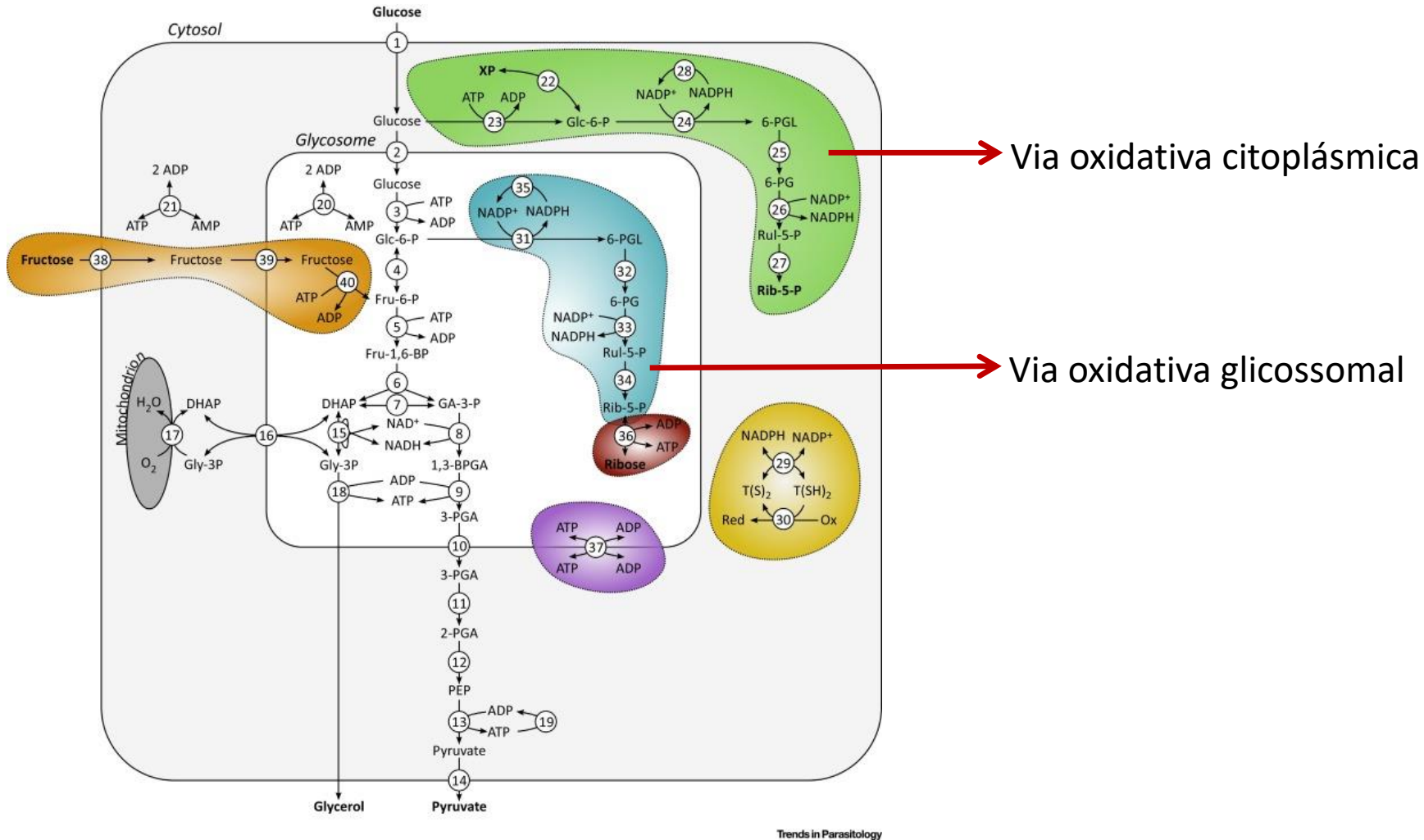
Sistemas de defesa contra o estresse oxidativo



NADPH fornece o potencial redutor à enzima trypanotiona reductase, que mantém um alto nível de trypanotiona reduzido, que por sua vez reduz tryparedoxina que finalmente reduz tryparedoxina peroxidase. Esta última, finalmente cataliza a redução final de peróxidos a H₂O ou alcoóis.

TryR: trypanotiona reductase
TryX: tryparedoxina
TryP: tryparedoxina peroxidase
ROOH: peroxide

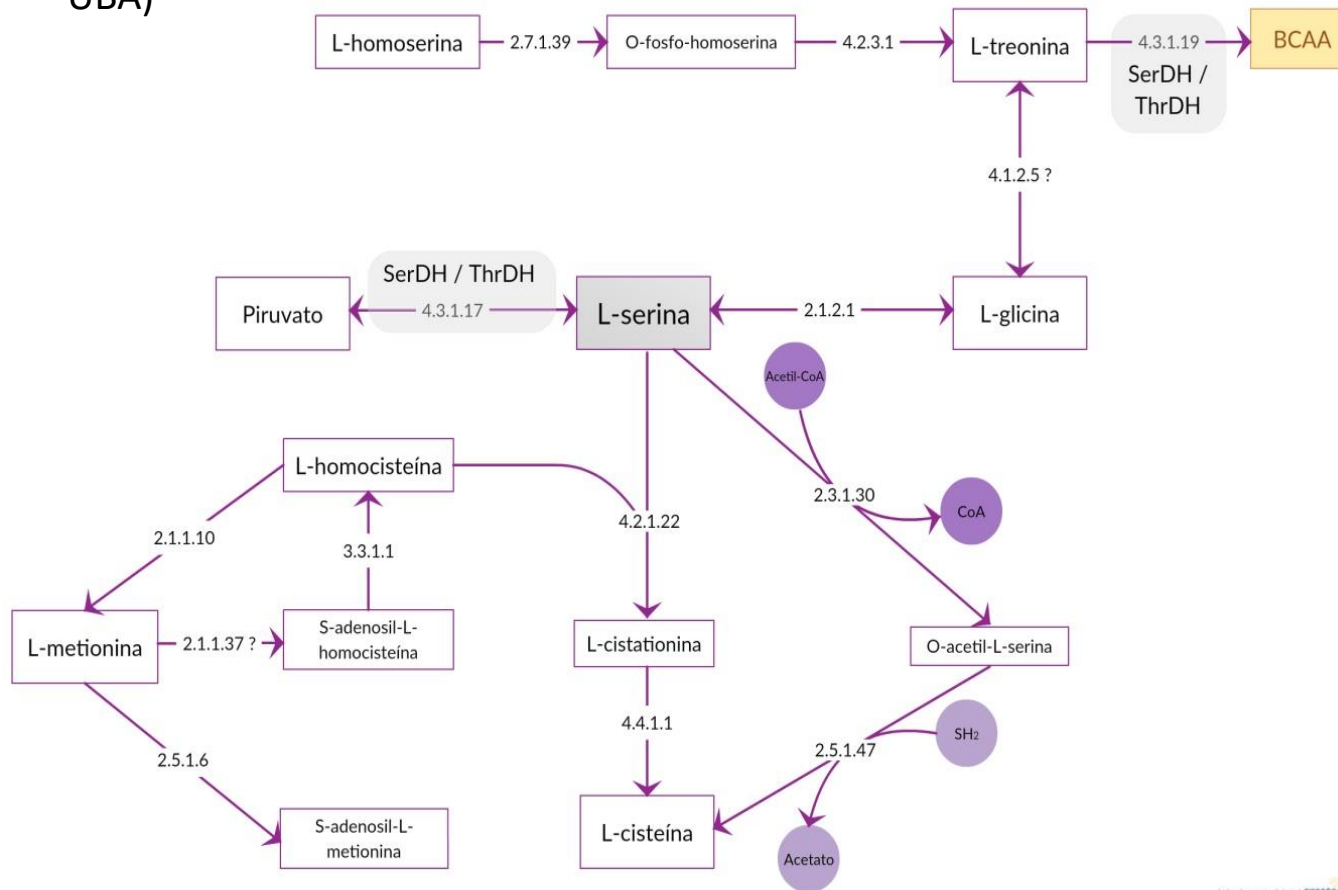
Metabolismo redox



Metabolismo redox

Existem uma miríada de metabólitos contendo –SH, que participam da resistência ao desbalanço redox...

Via da Trans-sulfuração reversa (Cristina Nowicki, Fac. Farmacia y Bioquímica – UBA)



Obrigado!