WIADOMOŚCI PARAZYTOLOGICZNE
T. 48 (1) 2002: 23–28

TOXOPLASMA GONDII – WEWNĄTRZKOMÓRKOWY PASOŻYT

HENRYKA DŁUGOŃSKA

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; E-mail: hdlugo@taxus.biol.uni.lodz.pl

ABSTRACT. ***Toxoplasma gondii*** **– intracellular parasite.** The article presents selected data concerning invasion and intracellular life of obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* in susceptible hosts.

Key words: intracellular parasitism, *Toxoplasma gondii.*

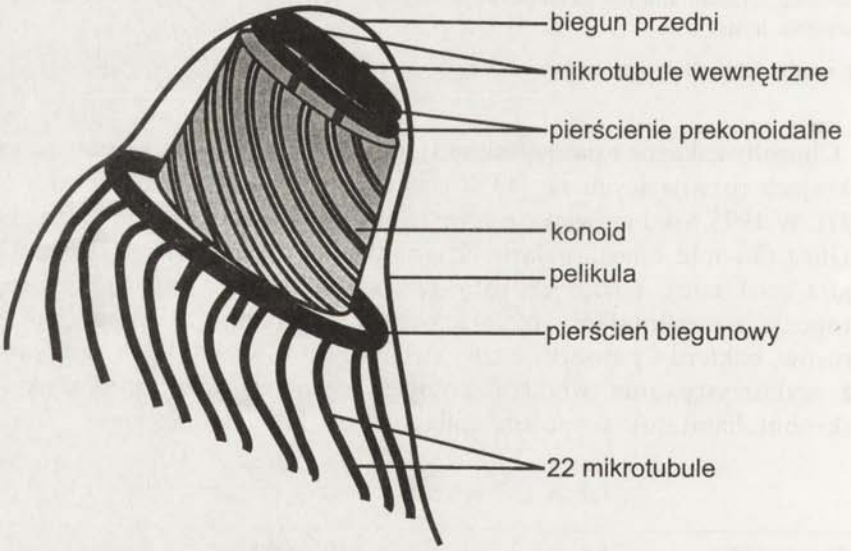
Choroby zakaźne i pasożytnicze stanowią nadal główną przyczynę zgonów w krajach rozwijających się (43% wszystkich zgonów, World Health Forum 1997). W 1995 roku największe śmiertelne żniwo w skali całego świata zebrała gruźlica (3,1 mln ofiar), malaria (2,1 mln), wzw B (1,1 mln), AIDS (> 1 mln) i odra (> 1 mln), a więc choroby powodowane przez wewnątrzkomórkowe patogeny, reprezentujące różne i odległe jednostki taksonomiczne świata wirusów, bakterii i pasożytów tzw. zwierzęcych (Tabela 1). Ich wspólną cechą jest wykorzystywanie wnętrza komórki żywiciela jako środowiska życia (mikroontohabitatu) w sposób obligatoryjny lub fakultatywny.

Tabela 1. Wewnątrzkomórkowe patogeny

Rodzaj patogenu	Zakres
Priony	Wszystkie
Wiroidy	Wszystkie (występują tylko u roślin)
Wirusy	Wszystkie
Bakterie	Niektóre np. *Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis*
Grzyby	Niektóre np. *Histoplasma capsulatum*
Pierwotniaki	Niektóre np. *Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum*

Ten szczególny tryb życia wydaje się być wyjątkowo korzystny biologicznie dla wewnątrzkomórkowych patogenów: chroni je przed czynnikami i mechanizmami odpornościowymi żywiciela, umożliwia swobodny dostęp do całej gamy wewnątrzkomórkowych metabolitów, utrudnia dotarcie chemioterapeutyków, zapewniając ostatecznie długotrwałe zasiedlenie danego żywiciela.

Bardzo ciekawym, chociaż trudnym, obiektem badań nad biologią wewnątrzkomórkowych patogenów wydaje się być *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908), pierwotniak należący do typu *Apicomplexa*. Szczególna przydatność toksoplazmy jako modelu badawczego wewnątrzkomórkowego pasożytnictwa wynika z szerokiego zakresu jej permisywności i stosunkowo dużej łatwości uzyskiwania mutantów, co umożliwia ustalenie molekularnych podstaw inwazji. Typ *Apicomplexa* charakteryzuje się spolaryzowaną budową komórki i obecnością kompleksu apikalnego (ciała biegunowego), odpowiedzialnego za penetrację pasożyta do komórki żywiciela. Kompleks apikalny stanowi złożoną kompozycję elementów cytoszkieletu (Rys. 1) i organelli wydzielniczych (mikroenem, inaczej toksoenem, roptrów i granul o dużej gęstości).



Rys. 1. Kompleks apikalny *Toxoplasma gondii* (bez organelli wydzielniczych)

Na samym szczycie bieguna przedniego znajdują się 2 pierścienie prekonoidalne, otaczające wierzchołek konoidu, który ma kształt wydrążonego walca, zbudowanego z 14 spiralnie skręconych elementów i zakończonego od strony bieguna tylnego pierścieniem biegunowym. Od tego pierścienia odchodzą w głąb komórki 22 subpelikularne mikrotubule, o długości 4–5 μm, lekko skręcone w kierunku przeciwnym do kierunku ruchu wskazówek zegara, podobnie, jak elementy konoidu. Dodatkowe 2 mikrotubule (400 nm długości) umocowane są na pierścieniach prekonoidalnych. Przechodzą one przez środek konoidu i kończą się tuż pod pierścieniem biegunowym. Prawdopodobnie one właśnie ukierunkowują mikroenemy i roptra tak, aby przesunęły się

przez konoid i wylały swą zawartość na przednim, „inwazyjnym" biegunie toksoplazmy. Kompleks 22 długich mikrotubul stabilizuje ciało pasożyta i odgrywa zasadniczą w jego ślizgowym ruchu, m.in. w czasie procesu penetracji (Pfefferkorn 1990, Black i Boothroyd 2000).

Pierwszym i koniecznym warunkiem wzbudzenia aktywności kompleksu apikalnego, motoru procesu penetracji, jest kontakt *T. gondii* z komórką żywiciela. Ponieważ zewnętrzne błony lipidowe, zarówno toksoplazmy, jak i żywiciela, mają ładunek ujemny, niezbędne są reakcje typu receptor-ligand, aby te siły odpychania przemóc. Bardzo szeroki wachlarz żywicieli (zwierząt endotermicznych i człowieka) oraz możliwość zasiedlania wszystkich komórek jądrzastych danego organizmu sugerują, że za kontakt komórki pasożyta z komórką żywiciela odpowiadają jakieś powszechnie występujące komponenty powierzchniowe. Ze strony pasożyta są to antygeny powierzchniowe rodziny SAG (surface antigens), wbudowane w błonę zewnętrzną za pomocą glikozylofosfatydyloinozytolu, na czele z głównym antygenem SAG1, antygenem wskaźnikowym postaci tachyzoitu. Należy przyjąć jednakże, że SAG1 to nie jedyna cząsteczka pasożyta zaangażowana w proces adhezji, ponieważ mutanty SAG1-ujemne dalej wykazują inwazyjność, chociaż inną niż typ dziki – penetrują szybciej, ale z mniejszą skutecznością (Black i Boothroyd 2000). Receptory żywiciela dla antygenów SAG są nieznane. Wykazano także zdolność wiązania się *T. gondii* z lamininą w macierzy zewnątrzkomórkowej; laminina może stanowić więc pomost pomiędzy pasożytem a receptorami dla lamininy na komórkach żywiciela. Sugeruje się również udział lektyn pasożyta w procesie adhezji, których ligandami byłyby proteoglikany siarczanowe komórek żywiciela (Carruthers i wsp. 2000). Niewątpliwie ekspresja ligandów adhezyjnych na komórkach żywiciela jest zależna od fazy cyklu komórkowego. Największą intensywność adhezji i penetracji zaobserwowano w czasie przejścia fazy G1 w fazę mid-S. Należy przy tym zauważyć, że proces penetracji zasadniczo różni się od procesu fagocytozy. Podczas penetracji komórka żywiciela pozostaje bierna (może być nawet lekko utrwalona glutaraldehydem), nie obserwuje się w niej ani kondensacji aktyny, ani sfałdowania błony zewnętrznej, ani fosforylacji tyrozyny (Sibley 1995, Dobrowolski i Sibley 1997). Pasożyty z typu Apicomplexa, takie, jak *Toxoplasma gondii* i *Plasmodium falciparum* wnikają do komórek żywiciela, zarówno fagocytarnych, jak i niefagocytarnych, poprzez aktywną penetrację. Jak dowcipnie zauważają Sibley i Andrews 2000, w obliczu dylematu: żyć szybko i ryzykownie albo wolno i bezpiecznie, inwazja komórek niefagocytujących wydaje się rozsądnym przystosowaniem, ponieważ oferują one spokojne i bezpieczne siedlisko, w porównaniu z fagocytami. Podczas inwazji toksoplazma „wślizguje się" w komórkę żywiciela w czasie 15–30 s. Podstawą jej ślizgowego ruchu jest motor aktyna-miozyna. Chociaż w konwencjonalnych preparatach elektronomikroskopowych nie wykryto mikrofilamentów aktynowych, to wykazano obecność samej aktyny, umiejscowionej głównie w rejonach bieguna przed-

niego. Opisano ostatnio białko wiążące aktynę, toksyfilinę, która prawdopodobnie bierze udział w wytworzeniu mikrofilamentów aktynowych, znajdujących się pod kompleksem 2 błon wewnętrznych pelikuli. Mają one kształt liter v, ułożonych jak klucz ptaków (> > > > >) i skierowanych do bieguna przedniego. Leżąca bliżej błon wewnętrznych lub tuż nad nimi miozyna wiąże się z przezbłonowym białkiem adhezyjnym, białkiem mikroenem MIC2 (inaczej TgMIC2), które zawiera oprócz domeny przezbłonowej także 6 domen adhezyjnych, trombospondyno-podobnych. Procesowi inwazji towarzyszy stopniowane i regulowane wydzielanie szerokiego wachlarza różnych rozpuszczalnych białek zmagazynowanych w organellach, takich jak: mikroenemy, roptra i granule o dużej gęstości (Carruthers 1999, Carruthers i wsp. 1999, Długońska i Dytnerska 1999, Black i Boothroyd 2000, Ferguson i wsp. 2000). Podczas gdy te ostatnie są rozmieszczone dość równomiernie w całej cytoplazmie, to mikroenemy i roptra są ściśle związane z kompleksem apikalnym. Białka mikroenem (MIC1-4, inaczej TgMIC1-4) włączają się we wstępny etap procesu penetracji, białka roptrów (ROP1-8) ułatwiają wytworzenie wakuoli pasożytniczej i jej połączenie z organellami wewnętrznymi komórki żywiciela, zaś białka granul o dużej gęstości (GRA1-8, NTP-azy = hydrolazy nukleozydotrifosforanowe) promują wewnątrzkomórkowe namnażanie pasożyta i jego zaopatrzenie w konieczne substancje odżywcze. Wszystkie białka wydzielnicze posiadają typową dla eukariotów sekwencję liderową, która kieruje je do siateczki śródplazmatycznej, a stamtąd do organelli wydzielniczych lub powierzchni komórki pasożyta (Carruthers i wsp. 1999). Egzocytoza białek mikroenem inicjuje wytworzenie pomiędzy komórką żywiciela i pasożyta „moving junction", enigmatycznej i krótkotrwałej (kilka sekund) struktury, zbudowanej tylko z dwuwarstwy lipidów błony zewnętrznej żywiciela. Nieznany dotąd mechanizm powoduje wybiócze niewłączanie w błonę powstającej wakuoli pasożytniczej białek przezbłonowych żywiciela (np. CD44, Mac1, kaweoliny) (Sibley i Andrews 2000), z tego powodu wykazuje ona początkowo niską gęstość elektronową. Potem stopniowo w dwuwarstwę lipidów są wbudowywane białka pasożyta, najpierw te pochodzące z roptrów (w trakcie inwazji), a następnie – z granul o dużej gęstości (10–20 min po inwazji) (Dubremetz 1998, Black i Boothroyd 2000). Błona wakuoli staje sitem molekularnym, przepuszczającym cząsteczki poniżej 1300 Da i zostaje od zewnątrz otoczona przez mitochondria oraz siateczkę śródplazmatyczną komórki żywiciela. Wewnątrz natomiast powstaje rurkowo-pęcherzykowa siatka, przypominająca spaghetti. Wakuola pasożytnicza w odróżnieniu od wakuoli fagocytarnej (fagosomu) nie ulega ani zakwaszeniu, ani zlaniu z lizosomami, stając się wyspecjalizowanym, wyodrębnionym i bezpiecznym dla pasożyta przedziałem komórkowym. Tam właśnie toksoplazma namnaża się przez wielokrotną endodiogenię. Z każdego macierzystego tachyzoitu powstają 2 tachyzoity potomne, siostrzane, a czas pełnego cyklu wynosi 6–7 godzin. Szybkość replikacji *T. gondii* zależy w dużej mierze od rodzaju komórki

żywiciela, np. szybkie namnażanie obserwowano w monocytach, komórkach dendrytycznych, fibroblastach, a zdecydowanie wolniejsze – w neutrofilach i limfocytach (Channon i wsp. 2000). Sygnał inicjujący gwałtowne uwolnienie potomnych tachyzoitów jest nieznany, ale wydaje się, że może to być spadek stężenia kationów Ca^{2+}. Komórka żywiciela ulega lizie, tachyzoity (kilka do kilkudziesięciu z 1 komórki) wydostają się do przestrzeni międzykomórkowych i szukają nowej komórki do zasiedlenia (Black i Boothroyd 2000).

Ściśle wewnątrzkomórkowy tryb życia *T. gondii* rodzi różne problemy, m.in. limituje skuteczną terapię. Leki docierające do wakuoli pasożytniczej z reguły uszkadzają też komórki żywiciela. Ciekawym wyjątkiem wydaje się być hydroksymocznik, który przenika do wakuoli i hamuje cykl rozwojowy pasożyta, nie naruszając komórek żywiciela (de Melo i wsp. 2000).

Nie każdy cykl replikacji *T. gondii* jest cyklem litycznym, tj. prowadzi do lizy komórki żywicielskiej. Pod wpływem różnych, chociaż słabo określonych, bodźców (czynników odpornościowych, leków itp.) szybko namnażające się, wysoko zjadliwe tachyzoity ulegają konwersji w wolno namnażające się, spoczynkowe bradyzoity, a błona wakuoli pasożytniczej – w ścianę cysty tkankowej (Gross i wsp. 1997). Jak się sądzi, zarażenie toksoplazmą nie kończy się eradykacją pasożyta. W formie przetrwalnikowej („drzemiących" bradyzoitów zamkniętych w cystach) utrzymuje się on do końca życia żywiciela. W organizmie żywiciela o sprawnym systemie odpornościowym pęknięcie cysty jest niegroźne, ponieważ uwolnione toksoplazmy ulegają szybkiej eliminacji z udziałem różnych mechanizmów odpornościowych, zarówno humoralnych, jak i komórkowych (Ferguson i wsp. 1989, Długońska 2000).

Przedstawione w pracy niektóre aspekty wewnątrzkomórkowego pasożytnictwa *T. gondii* wskazują, że ten szeroko rozpowszechniony pasożyt wykorzystuje bogaty zestaw precyzyjnych i wyrafinowanych metod pozwalających mu długotrwale zasiedlić organizm podatnego żywiciela.

LITERATURA

Black M.W., Boothroyd J.C. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 607–623.

Carruthers V.B. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International* 48: 1–10.

Carruthers V.B., Giddings O.K., Sibley L.D. 1999. Secretion of microenemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cellular Microbiology* 1: 225–235.

Carruthers V.B., Håkansson S., Giddings O.K., Sibley L.D. 2000. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infecion and Immunity* 65: 4005–4011.

Channon J.Y., Seguin R.M., Kasper L.H. 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii*. *Infecion and Immunity* 68: 4822–4826.

Długońska H. 2000. Odporność w zarażeniach wywoływanych przez *Toxoplasma gondii*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 54: 53–65.

Długońska H., Dytnerska K. 1999. Antygeny *Toxoplasma gondii*. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 473–480.

Dobrowolski J., Sibley L.D. 1997. The role of the cytoskeleton in host invasion by *Toxoplasma gondii*. *Behring Institute Mitteilungen* 99: 90–96.

Dubremetz J.-F. 1998. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Microbiology* 6: 27–30.

Ferguson D.J.P., Hutchison W.M., Pettersen E. 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitology Research* 75: 599–603.

Ferguson D.J.P., Brecht S., Soldati D. 2000. The micoeneme protein MIC4, or MIC4-like protein, is expressed within macrogamete and associated with oocyst wall formation in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 30: 1203–1209.

Gross U., Kempf M.C., Seeber F., Lüder C.G.K., Lugert R., Bohne W. 1997. Reactivation of chronic toxoplasmosis: Is there a link to strain-specific differences in the parasite? *Behring Institute Mitteilungen* 99: 97–106.

de Melo E.J.C., Mayerhoffer R.O., de Sousa W. 2000. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. *FEMS Microbiology Letters* 185: 79–82.

Pfefferkorn E.R. 1990. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. (Ed. D.J. Wyler) W. H. Freeman and Co., New York, 26–50.

Sibley L.D. 1995. Invasion of verterbrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cell Biology* 5: 129–132.

Sibley L.D., Andrews N.W. 2000. Cell invasion by un-palalatable parasites. *Traffic* 1: 100–106.

The world health report 1997. Conquering, suffering, enriching humanity. 1997. *World Health Forum* 18: 249–260.