

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

PROTEOM *TOXOPLASMA GONDII*

HENRYKA DŁUGOŃSKA I KATARZYNA DYTNERSKA

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

ABSTRACT. *Toxoplasma gondii* proteom. The article presents data concerning methods of proteomics and main achievements of studies on *Toxoplasma gondii* proteom.

Key words: antigens, proteom, proteomics, *Toxoplasma gondii*.

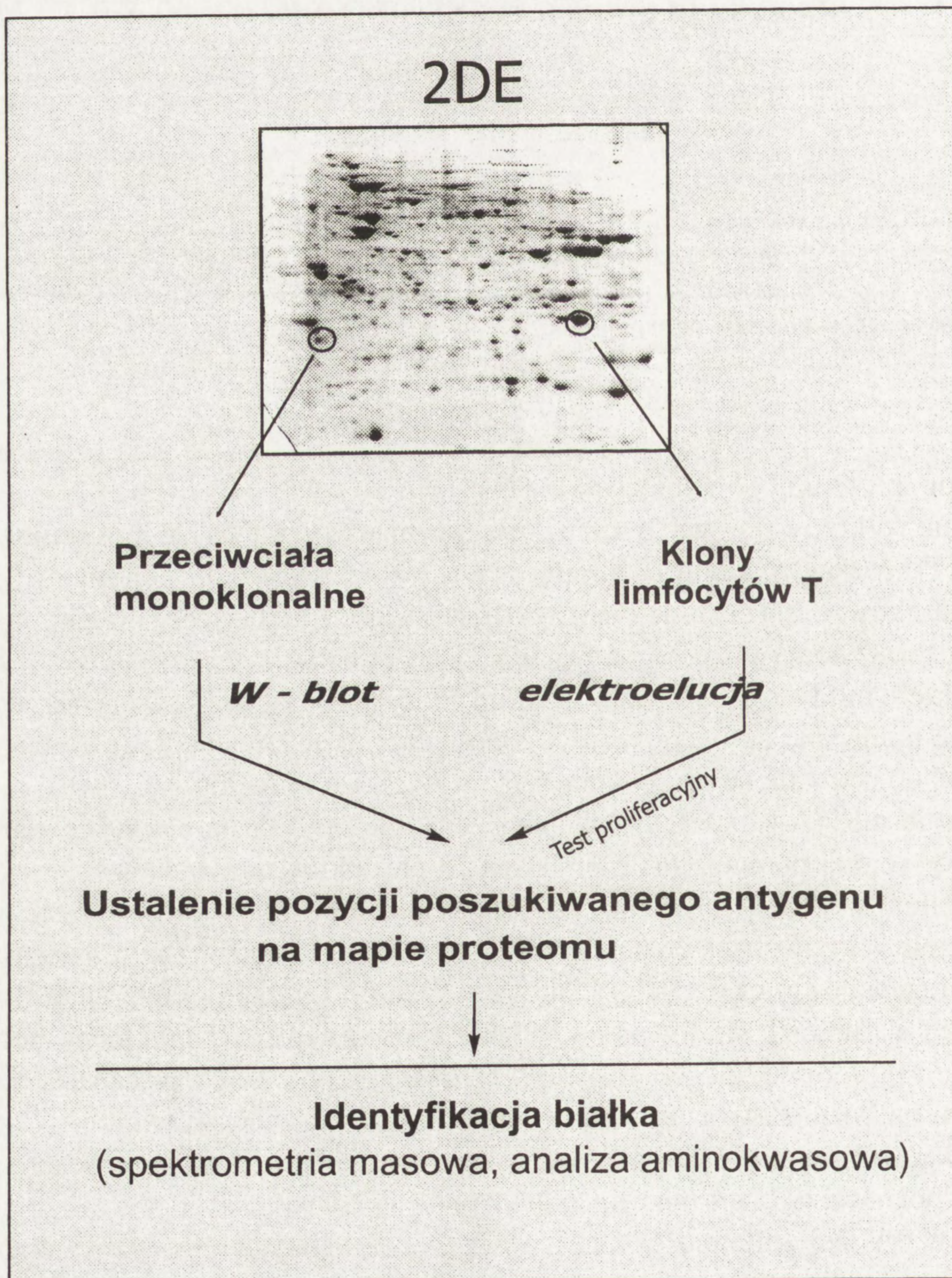
PROTEOMIKA

Termin „proteom” pojawił się w 1995 r. jako dopełnienie pojęcia genom i nieoczekiwanie wykreował nową, bardzo dynamicznie rozwijającą się dyscyplinę – proteomikę. Po rozszyfrowaniu i opublikowaniu pełnej sekwencji genomu kilkudziesięciu gatunków, z ludzkim na czele, okazało się, że funkcja wielu białek kodowanych przez te genomy pozostaje nieznana. Geny i genomika przestały być już ostatnim krzykiem mody, nadszedł czas transkryptomiki i proteomiki, których celem jest określenie miejsca i czasu aktywności genów oraz identyfikacja kodowanych przez nie białek, co pozwala na otrzymanie zintegrowanego obrazu procesów w komórce na poziomie mRNA i białek. Sekwencja DNA genomu dostarcza tylko statycznej mapy genetycznej potencjalnych białkowych produktów wraz z ich przewidywalnym udziałem w szlakach metabolicznych. Więcej informacji o tym, co się rzeczywiście dzieje w komórkach dostarcza transkryptom i proteom, czyli pula cząsteczek mRNA oraz białek ulegających ekspresji w danym punkcie cyklu komórkowego i w danych warunkach środowiskowych, a zatem mówimy o funkcjonalnym transkryptomie i proteomie, nie zaś o kompletnym transkryptomie i proteomie, przewidywalnym na bazie statycznego genomu (Ezzell 2000). Ogromne zainteresowanie proteomiką, wyrażające się m.in. powstaniem czasopisma „Proteomics”, ma nie tylko walor poznawczy, związany np. z badaniem ekspresji białek u szczepów drobnoustrojów o dużej zmienności fenotypowej, w zmieniających się warunkach środowiska i pod wpływem manipulacji genetycznych (Cordwell i wsp. 2001). Badania z zakresu proteomiki mają wymiar praktyczny: jest to poszukiwanie antygenów

szczepionkowych, diagnostycznych, białek-markerów nowotworzenia i białek docelowych dla projektowanych leków.

Niestety proteomika, w odróżnieniu od genomiki, nie dysponuje metodą, która byłaby odpowiednikiem PCR, stąd przygotowanie próby badanej i czułość zastosowanej techniki ma zasadnicze znaczenie, szczególnie w przypadku białek o niskiej ekspresji (10–1000 kopii na komórkę).

Badania nad proteomem są prowadzone rutynowo przy użyciu dwuwymiarowej elektroforezy (2-DE) i spektrometrii masowej (MS). Pierwszy etap dwuwymiarowej



Rys.1. Identyfikacja antygenów *Toxoplasma gondii* metodą dwuwymiarowej elektroforezy(2-DE) i immunoblotu lub blotu z użyciem swoistych klonów limfocytów T (T-cell blot).

elektroforezy to rozdział mieszaniny białek pod względem ich punktu izoelektrycznego, pI (ogniskowanie izoelektryczne), a drugi – rozdział zogniskowanych białek wg ich masy relatywnej, Mr (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym). W wyniku dwuetapowego rozdziału powstają w żelu plamy białkowe, utworzone przez pojedyncze białka. Około 1/4 puli plam białkowych to białka modyfikowane (potranslacyjnie i proteolitycznie), a zatem to samo białko można znaleźć w różnych miejscach 2D-żelu (Blackstock i Weir 1999).

Rozdzielone metodą 2-DE białka można wybarwiać pozytywowo (błękitem Coomassiego, metodą srebrową) lub negatywowo (np. metodą imidazolowo-cynkową) otrzymując mapy proteomu. Białko o określonej lokalizacji w żelu poddaje się trawieniu enzymatycznemu (zwykle trypsyną), a otrzymane peptydy bada się wybraną metodą spektrometrii masowej MALDI (matrix-assisted laser desorption ionisation): MALDI-MS, MALDI-PSD, LC-ESI-MS/MS. Przeszukanie bazy danych (*T. gondii* EST, expressed sequence tag) pozwala niekiedy stwierdzić, że jest to znane, opisane już białko, a jeśli nie, otrzymane fragmenty peptydowe poddaje degradacji wg Edmana, co prowadzi do określenia częściowej sekwencji aminokwasów badanego białka i na jej bazie częściowej sekwencji cDNA. Dopiero sklonowanie kodującego cDNA, a potem jego sekwencjonowanie umożliwia oznaczenie pełnej sekwencji aminokwasowej (Długońska i Dytnerska 2000, Reichmann i wsp. 2002).

Niewątpliwie znacznie korzystniejszą sytuację mamy wówczas, gdy dysponujemy albo przeciwciałami (najlepiej monoklonalnymi) albo swoistymi klonami limfocytów T rozpoznającymi dane białko (np. białko pasożyta), które umożliwiają precyzyjną jego lokalizację na mapie proteomu oraz ukierunkowanie identyfikacji, bez konieczności ekstensywnego badania całego proteomu (Rys.1).

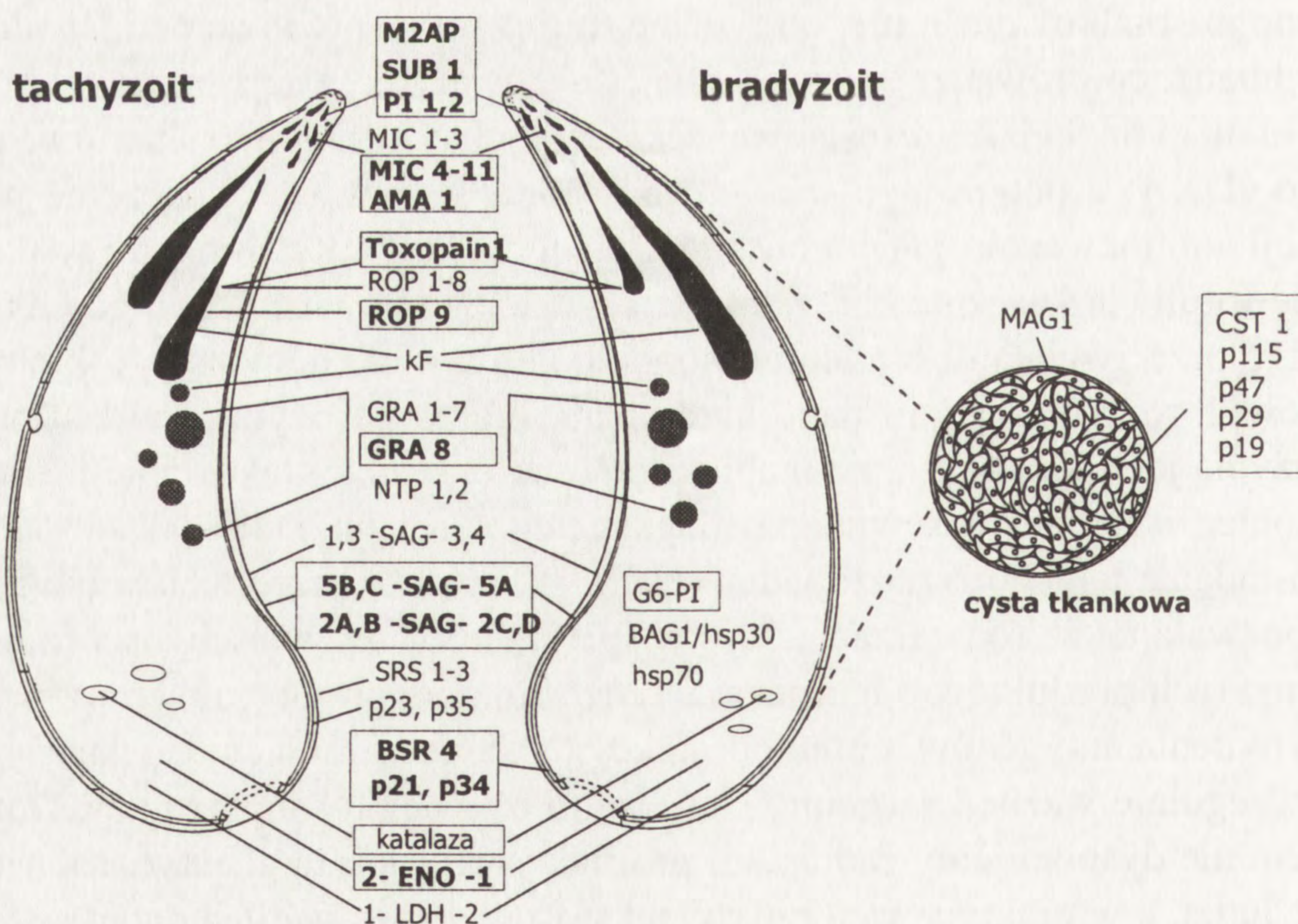
Posiadanie takich narzędzi badawczych, jak swoiste przeciwciała lub/i limfocyty T pozwala także rozszerzać zakres eksperymentów na właściwości immunoprotekcyjne tych produktów odporności *in vivo* (immunoprotekcja bierna), prowadząc do wyłonienia antygenów immunoprotekcyjnych, co w zarażeniach pasożytniczych ma szczególnie ważne znaczenie. Dotyczy to również toksoplazmozy. Dotychczas bowiem nie dysponujemy żadną, ani profilaktyczną, ani terapeutyczną, szczepionką dla ludzi, a w praktyce weterynaryjnej stosowana jest jedyna dotąd szczepionka komercyjna „Toxovax”, konwencjonalna, złożona z atenuowanych tachyzoitów, a przeznaczona dla owiec (Wędrychowicz 2000). Niedostatki znajomości proteomu *T. gondii* uwidaczniają się też w diagnostyce, w której z całą pewnością przydałyby się nowe antygeny diagnostyczne, pozwalające np. zróżnicować fazę zarażenia.

PROTEOM *TOXOPLASMA GONDII*

Białka *T. gondii* zlokalizowane są w błonie zewnętrznej, cytosolu i organellach sekrecyjnych: mikronemach, roptriach i granulach o dużej gęstości elektronomikroskopowej. Antygeny organelli sekrecyjnych są uwalniane do wakuoli pasożytniczej

i cysty tkankowej, a stamtąd do płynów ustrojowych (*in vivo*) lub podłoża hodowlanego (*in vitro*). Tę grupę antygenów, głównie produktów granul o dużej gęstości, określa się mianem ESA (excreted/secreted antigens). Stosunkowa łatwość namnażania tachyzoitów toksoplazmy w warunkach *in vivo* i *in vitro* powoduje, iż znakomita większość informacji z zakresu proteomu *T. gondii* dotyczy tego właśnie stadium rozwojowego. Słabo poznana jest struktura antygenowa bradyzoitów, a bardzo niewiele wiadomo o antygenach sporozoitów.

Zarys struktury proteomu *Toxoplasma gondii*, poznanej przy użyciu różnych metod, przedstawia nasz poprzedni artykuł „Antygeny *Toxoplasma gondii*” (Długońska i Dytneńska 1999). Od tego czasu opisano nowe białka, które zostały teraz wbudowane w schemat przedstawiający kompozycję białkową 2 podstawowych stadium rozwojowych: tachyzoitu i bradyzoitu (Rys. 2). Ponieważ często antygeny te mają swoje odpowiedniki u innych *Apicomplexa*, często przed ich symbolem wpro-



Rys.2. Struktura białkowa *Toxoplasma gondii* (proteom tachyzoitu, bradyzoitu i cysty tkankowej); w ramkach zaznaczono te białka, których nie zawierał wcześniej opublikowany schemat (Długońska i Dytneńska 1999). AMA 1 – błonowy antygen apikalny 1; BAG/hsp30 – antygen bradyzoitów 1/białko szoku termicznego 30 kDa; BSR 4 – białko rekombinantowe swoiste dla bradyzoitów; CST 1 – białko ściany cysty tkankowej; ENO 1 i 2 – enolaza 1 i 2; G6-PI – izomeraza glukozy 6-fosforanowa; GRA 1–8 – białka granul o dużej gęstości; hsp – białko szoku termicznego 70 kDa; katalaza – enzym występujący w peroksysomach; kF – kwaśna fosfataza; LDH 1 i 2 – dehydrogenaza mleczanowa 1 i 2; MAG 1 – białko macierzy cyst 1; MIC 1–11 – białko mikronem; M2AP – białko związane z MIC 2; NTP 1 i 2 – hydrolaza nukleozydotrifosforanowa 1 i 2; PI 1 i 2 – inhibitor proteazy; p19, p21, p23, p29, p34, p47, p115 – białko 19, 21, 23, 29, 34, 47, lub 115 kDa; ROP 1–9 – białka roptrii; SAG 1–4 – antygeny powierzchniowe; SRS 1–3 – antygeny spokrewnione z SAG; SUB 1 – białko subtylizynopodobne; Toxopain 1 – katepsyna B – proteinaza cysteinowa

wadza się dodatkowe oznaczenie Tg (*T. gondii*), np. TgMIC1 tj. białko mikronem *T. gondii*.

Należy podkreślić, że paleta antygenów, zwłaszcza sekrecyjnych, *Toxoplasma gondii* uległa znacznemu rozszerzeniu. W ostatnich latach opisano białka mikronem od MIC4 do MIC11 (Hoff i wsp. 2001, Soldati i wsp. 2001, Tomley i Soldati 2001, Meissner i wsp. 2002) i AMA-1 (Hehl i wsp. 2000). Ponieważ w trakcie konwersji tachyzoitów w bradyzoity żadne organelle sekrecyjne nie zanikają, można przypuszczać, że skład wydzielanych przez nie białek, m.in. białek mikronem, jest zbliżony u obu postaci rozwojowych (Weiss i Kim 2000). Antygen MIC4 wykryto nieoczekiwanie w formach cyklu płciowego toksoplazmy: w merozoitach, makrogametach, a potem w ścianie oocyst (Ferguson i wsp. 2000). Antygen MIC5 to wcześniej opisany antygen H4 (Johnson i Illana 1991). Na mapie antygenów ESA znajduje się w pobliżu białka GRA1 (Długońska i wsp. 2001). Interesujący jest fakt, że białko AMA-1 jest u *Plasmodium* spp. umiejscowione w roptriach, podczas gdy u *Toxoplasma gondii* – w mikronemach. Prócz tego wykryto w mikronemach białko TgM2AP, fizycznie związane z TgMIC2. Nowo opisane białko TgM2AP jest wysoko konserwatywne i można je znaleźć u innych *Apicomplexa*: *Neospora caninum* i *Eimeria tenella* (Rabenau i wsp. 2001). Prawdopodobnie odgrywa ono kluczową rolę w inwazji. Białka mikronem są ściśle związane nie tylko fizycznie, ale i funkcjonalnie. Zniszczenie przezbłonowego białka MIC6 powoduje całkowitą redystrybucję dwóch rozpuszczalnych białek mikronem MIC1 oraz MIC4 i skierowanie ich na fałszywą drogę, do granul o dużej gęstości, a potem do wakuoli pasożytniczej (Tomley i Soldati 2001). W mikronemach opisano też proteazę serynową, TgSUB1, inaczej subtylizynę, homolog innych subtylizyn u *Apicomplexa* i niektórych bakterii. Fizjologiczny substrat (y) dla subtylizyny toksoplazmy nie jest znany, ale przypuszcza się, że TgSUB1 może brać udział nie tylko w trawieniu (processing) białek mikronem, ale także białek powierzchniowych pasożyta i żywiciela (Miller i wsp. 2001). Obok subtylizyny znaleziono w mikronemach także 2 naturalne inhibitory proteinaz: TgPI-1 i TgPI-2. Sądzi się, że chronią one samego pasożyta przed enzymami proteolitycznymi w jelicie cienkim lub działaniem komplementu żywiciela (Carruthers 2002).

Reichmann i wsp. (2002), korzystając z nowego podejścia metodycznego, tj. stosując elektroforezę dwuwymiarową i spektrometrię masową, wykryli nowy antygen roptrii, ROP9 (p36) rozpoznawany przez swoisty, ustabilizowany klon limfocytów 3Tx19. Jest on zlokalizowany na mapie proteomu tachyzoitów obok dehydrogenazy mleczanowej, izoformy LDH1, wykrywanej przez inny swoisty klon limfocytów 3Tx15 (Reichmann i wsp. 2001). Białko ROP9 ulega ogniskowaniu w pI 5,9 i 6,5. Oba te antygeny, tj. LDH1 i ROP9 są typowymi markerami postaci tachyzoitu. W roptriach wykryto także enzym z grupy proteinaz serynowych, katepsynę B (*Toxopain-1*), która przekształcając białka roptrii z formy prebiałek w białka dojrzałe jest kluczowym komponentem procesu inwazji (Que i wsp. 2002).

W 2000 r. Carey i wsp. dopisali do listy białek rodziny GRA antygen GRA8, o Mr38 kDa, o wysokiej zawartości proliny (24%), z N-terminalną sekwencją sygnałową typową dla białek wydzielniczych i z domeną przezbłonową. GRA8 jest związany z błoną wakuoli pasożytniczej.

Poszukując markerów konwersji tachyzoitów w bradyzoity Tomavo opisał w 2001 roku 2 izoformy β -enolazy: ENO1 występującą u bradyzoitów i ENO2 – u tachyzoitów. Zmienne, zależne od stadium rozwojowego, występowanie izoform tego enzymu glikolitycznego sugeruje istotne zmiany w metabolizmie węglowodanów podczas konwersji (Lüder i wsp. 2001). Do nowo opisanych białek enzymatycznych należy też katalaza (63 kDa), marker peroksysomów, wysoko konserwatywne białko wykazujące dużą homologię z katalazą innych eukariotów (Kaasch i Joiner 2000). W transkryptomie *T. gondii* wykryto też dwie izoformy syntazy fosfatydyloinozytolowej (PIS), występujące rozdzielnie i będące swoistymi markerami tachyzoitu bądź bradyzoitu, nie udało się natomiast wykazać obecności samej syntazy, ponieważ niepowodzeniem zakończyły się próby otrzymania swoistych przeciwciał przeciwko temu białku, posiadającemu liczne domeny przezbłonowe (Tomavo 2001), stąd też brak tego enzymu na Rys.2.

Korzystając z bazy danych *Toxoplasma* EST uzyskano rekombinantowe białko należące do białek wstrząsu termicznego rodziny hsp90. Na podstawie czasu pojawiania się swoistych przeciwciał można przypuszczać, że podobnie jak opisane wcześniej antygeny hsp30 i hsp70, antygen hsp90 dołączy najprawdopodobniej do grupy markerów bradyzoitów (Rojas i wsp. 2000).

Do białek powierzchniowych, pelikularnych, dołączył ostatnio antygen SAG5 (Boothroyd i wsp. 1998). Locus SAG5 ulega transkrypcji u tachyzoitów i bradyzoitów, metodą immunoblotu wykryto u tachyzoitów antygeny SAG5B i SAG5C, a u bradyzoitów SAG5A. Należą one do rodziny antygenów SAG1, oprócz SAG1, SAG3, SRS1-4 i BSR4, tworząc grupę antygenów o dużej homologii. Obecność SAG2A i SAG2B wykazano u tachyzoitów, a SAG2C i SAG2D u bradyzoitów. Tę rodzinę antygenów cechuje znacznie mniejsze wzajemne pokrewieństwo oraz zdecydowanie różne wielkości ramki odczytu ORF (Lekutis i wsp. 2001, Spano i wsp. 2002).

W 2001 r. Zhang i wsp. scharakteryzowali wstępnie nowy antygen cyst tkankowych *T. gondii*, zawierających formy przetrwalne, bradyzoity. Jest to wysokocząsteczkowa (Mr 116 kDa) glikoproteina, zlokalizowana w ścianie cysty. Reszty cukrowe tego antygeny reagują z lektyną *Dolichos bifloris*. Ze względu na ważną biologiczną rolę ściany cyst, jako czynnika odpowiedzialnego za utrzymywanie stanu przewlekłej infekcji, ten nowo opisany antygen może być potencjalnie użyteczny w planowanych strategiach terapeutycznych, mających na celu eliminowanie zarażeń latentnych.

Cohen i wsp. (2002), korzystając z metody dwuwymiarowej elektroforezy do analizy ekspresji białek tachyzoitów *T. gondii* RH, wykazali, że przy użyciu gradientów pH 4–7 i 6–11 podczas ogniskowania izoelektrycznego można uzyskać łącznie ponad 1000 plam białkowych. Zastosowanie wielu gradientów o wąskim

przedziale pozwoli prawdopodobnie uzyskać 3000–4000 polipeptydów. Możliwości ich identyfikacji metodą spektrometrii masowej i bioinformatyki zależą bezpośrednio od zakresu bazy danych EST *T. gondii* i baz białkowych innych organizmów. W niektórych przypadkach, kilka białek wydaje się być kodowanymi przez jeden gen, co wskazywałoby na modyfikacje potranslacyjne i/lub na alternatywne składanie genu (splicing).

W świetle przedstawionych danych wydaje się, że dynamicznie rozwijająca się obecnie proteomika, dostarczając parazytologom nowych, skutecznych narzędzi badawczych, otwiera szerokie perspektywy poznania toksoplazmy, a jest to konieczne, bo wywoływana przez nią choroba jest w dalszym ciągu wyzwaniem (Lüder i wsp. 2001).

LITERATURA

- Blackstock W.P., Weir M.P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TIBTECH* 17: 121–127.
- Boothroyd J.C., Hehl A., Knoll L.J., Manger I.D. 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *International Journal for Parasitology* 28: 3–9.
- Carrey K.L., Donahue C.G., Ward G.G. 2000. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105: 25–37.
- Carruthers V.B., Giddings O., Sibley L.D. 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cellular Microbiology* 1: 225–235.
- Carruthers V.B. 2002. <http://www.jhsph.edu/mmi/faculty/carruthers/carruthers.html>
- Cohen A.M., Rumpel K., Coombs G.H., Wastling J.M. 2002. Characterization of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 2: 39–51.
- Cordwell S.J., Nouwens A.S., Walsh B.J. 2001. Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics* 1: 461–472.
- Długońska H., Dytnerka K. 1999. Antygeny *Toxoplasma gondii*. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 473–480.
- Długońska H., Dytnerka K. 2000. Identyfikacja antygenów *Toxoplasma gondii* rozpoznawanych przez swoiste limfocyty T. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 455–458.
- Długońska H., Dytnerka K., Reichmann G., Stachelhaus S., Fischer H.-G. 2001. Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. *Parasitology Research* 87: 634–637.
- Ezzell C. 2000. Co dalej z ludzkim genomem? *Świat Nauki* 10: 64–69.
- Ferguson D.J.P., Brecht S., Soldati D. 2000. The microneme 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.
- Hehl A.B., Lekutis C., Grigg M.E., Bardley P.J., Dubremetz J.-F., Ortega-Baria E., Boothroyd J.C. 2000. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infection and Immunity* 68: 7078–7086.
- Hoff E.F., Cook S.H., Sherman G.D., Harper J.M., Ferguson D.J.P., Dubremetz J.-F. 2001. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, Tg-MIC10. *Experimental Parasitology* 97: 77–88.
- Johnson A.M., Illana S. 1991. Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene* 99: 127–132.

- Kaasch A.J., Joiner K.A. 2000. Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 1112–1118.
- Lekutis C., Ferguson D.J.P., Grigg M.E., Camps M., Boothroyd J.C. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International Journal for Parasitology* 31: 1285–1292.
- Lüder C.G.K., Bohne W., Soldati D. 2001. Toxoplasmosis: a persisting challenge. *Trends in Parasitology* 17: 460–463.
- Meissner M., Reiss M., Viebig N., Carruthers V.B., Toursel C., Tomavo S., Aijoka J.W., Soldati D. 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EFG-like domains and function as escorts. *Journal of Cellular Science* 115: 563–574.
- Miller S.A., Binder E.M., Blackman M.J., Carruthers V.B., Kim K. 2001. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelle of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 4541–4548.
- Que X., Ngo H., Gray M., Liu Q., Engel J., Brinen L., Ghosh P., Joiner K.A., Reed S.L. 2002. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, Toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *JBC papers in press*, online 8 May 2002.
- Rabenau K.E., Sohrabi A., Tripathy A., Reitter C., Ajioka J.W., Tomley F.M., Carruthers V.B. 2001. TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with adhesive protein TgMIC2. *Molecular Microbiology* 41: 537–547.
- Reichmann G., Długońska H., Hiszczyńska-Sawicka E., Fischer H. 2001. Tachyzoite – specific isoform of *Toxoplasma gondii* lactate dehydrogenase is target antigen of murine CD4+ T-cell clone. *Microbes and Infection* 3: 779–787.
- Reichmann G., Długońska H., Fischer H.-G. 2002. Characterization of TgROP9, a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119: 43–54.
- Rojas P.A., Martin V., Nigro M., Echeverria P.C., Guarnera E.A., Pszeny V., Angel S.O. 2000. Expression of cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity. *FEMS Microbiology Letters* 190: 209–213.
- Soldati D., Dubremetz J.-F., Lebrun M. 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 31: 1293–1302.
- Spano F., Ricci I., Di Cristina M., Possenti A., Tinti M., Dendouga N., Tomavo S., Crisanti A. 2002. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to SAG1 family of surface antigens. *International Journal for Parasitology* 32: 121–131.
- Tomavo S. 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *International Journal for Parasitology* 31: 1023–1031.
- Tomley F.M., Soldati D.S. 2001. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology* 17: 81–88.
- Wędrychowicz H. 2000. Nowe rodzaje szczepionek przeciw pasożytniczych. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 21–27.
- Weiss L.M., Kim K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 5: D391–405.
- Zhang Y.W., Halonen S.K., Ma Y.F., Wittner M., Weiss L.M. 2001. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infection and Immunity* 69: 501–507.