

## Inwazyjność i wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo *Toxoplasma gondii*<sup>1</sup>

Henryka Długońska

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

**ABSTRACT.** Invasiveness and intracellular parasitism of *Toxoplasma gondii*. The article focuses on selected aspects of *Toxoplasma gondii* penetration into host cells followed by the biogenesis of specialized host cell compartment, parasitophorous vacuole, in which the parasite resides.

**Key words:** intracellular parasitism, penetration, *Toxoplasma gondii*.

Typ *Apicomplexa* obejmuje ponad pięć tysięcy gatunków pasożytniczych pierwotniaków. Liczne spośród nich są patogenne dla ludzi (*Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*) i zwierząt (*Eimeria*, *Babesia*, *Theileria*). Do rodzaju *Toxoplasma* należy tylko jeden gatunek *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1908, opisany najpierw u północnoafrykańskiego gryzonia, *gundii* (*Ctenodactylus gundi*), a potem u człowieka i bardzo wielu gatunków endotermicznych kręgowców. Kosmopolityzm, wysoka częstość zarażenia populacji żywicieli oraz zdolność wnikania do wszystkich komórek jądrzastych sprawiają, że toksoplazma jest uważana za pasożyta, który odniósł znaczący sukces ekologiczny. Sukces ten jest wynikiem szczególnych cech biologicznych, związanych głównie ze zdolnością aktywnej penetracji i zasiedlania komórek żywicielskich z wytworzeniem bezpiecznej niszy, wakuoli pasożytniczej – nieulegającej fuzji z elementami systemu endosomalno-lizosomalnego, manipulowaniem procesem apoptozy oraz indukowaniem zmian reaktywności immunologicznej żywiciela, co prowadzi do wytworzenia stanu łagodnej koegzystencji *T. gondii* i zarażonego makroorganizmu.

### Ruch *T. gondii*

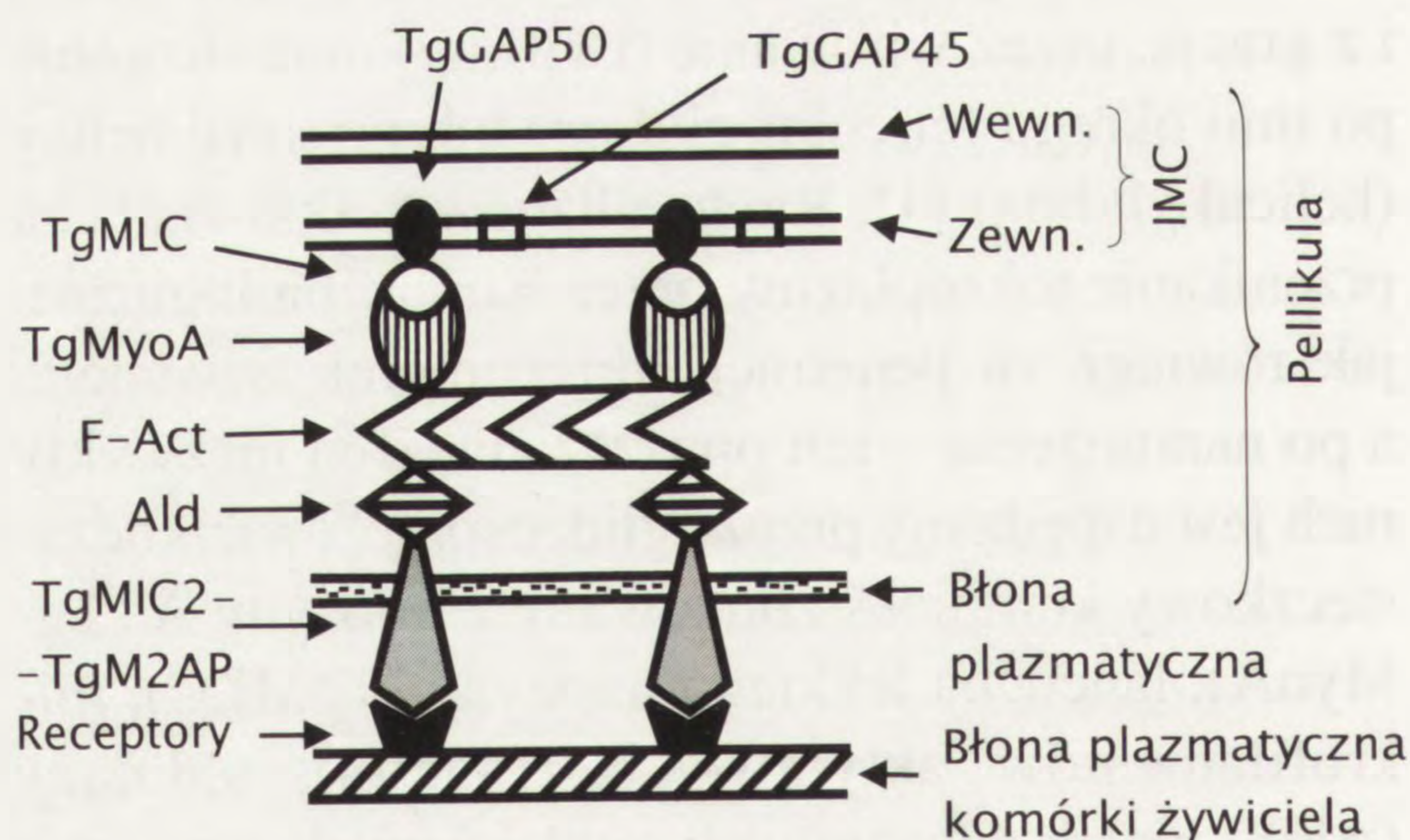
*Toxoplasma gondii* nie posiada ani typowych organelli lokomocyjnych, jak rzęski czy wici, ani zdolności do przemieszczania się na drodze pęz-

nia (ruchem ameboidalnym), a mimo to porusza się bardzo intensywnie, sprawnie (1-10  $\mu\text{m sek}^{-1}$ ) i z gracją, przez wirowanie (twirling) oraz ślizganie po linii okręgu (circular gliding) lub po torze helisy (helical gliding) [1]. Ruchy ślizgowe odpowiada za przenikanie toksoplazmy przez bariery biologiczne, jak również za penetrację do komórek żywiciela, a po namnożeniu – ich opuszczanie. Ten niezwykle ruch jest napędzany przez „glideosome”, wielkocząsteczkowy kompleks zbudowany z miozyny A (Tg-MyoA), łańcucha lekkiego miozyny (TgMLC), mikrofilamentów aktynowych (F-actin), aldolazy (Ald) i białek adhezyjnych wydzielanych przez mikronemy: TgMIC2 i TgM2AP [2, 3, 4]. Uproszczony schemat układu lokomotoryczno-penetracyjnego przedstawiono na Rys. 1.

Ruch umożliwia przenikanie przez pierwszą barierę anatomiczną (śluzówka przewodu pokarmowego), rozprzestrzenianie się w tkankach głęboko położonych, a potem przekraczanie innych niepermeabilnych barier biologicznych (bariera krew-mózg, bariera krew-siatkówka oka, łożysko), odgraniczających miejsca immunologicznie uprzywilejowane, czyli miejsca o małej reaktywności immunologicznej. Pokonanie barier biologicznych może odbywać się przez przenoszenie toksoplazmy wewnątrz leukocytów (konceptcja mechanizmu „konja trojańskiego”), drogą transcytozy i migracji pozakomórkowej. Ta ostatnia droga nie wiąże się z uszkodzeniem komórek żywiciela i nie indukuje reakcji

<sup>1</sup> Praca została dofinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji, projekt nr 2 PO4C 014 26.

zapalnej [5]. Fenotyp migracyjny szczepów toksoplazmy ściśle koreluje z ich zjadliwością. Gatunek *T. gondii* charakteryzuje się niezwykłą strukturą populacji, która obejmuje trzy linie klonalne (genotypy): I, II i III. Typ I obejmuje szczepy o ostrej zjadliwości dla myszy i często powodujące toksoplazmozę wrodzoną u ludzi. Cechą charakterystyczną szczepów typu I jest intensywna replikacja, gwałtowne rozszanie w organizmie z osiąganiem wysokich stężeń w tkankach, nawet przy niskim inokulum. Jak wykazali Barragan i Sibley [6], szczepy typu I wykazują silną, w porównaniu ze szczepami typu II i III, zdolność do migracji, wyrażającą się przechodzeniem w warunkach *ex vivo* przez jelito myszy i bezpośrednią penetracją do lamina propria i śródbłonna naczyń. Co więcej, pewna subpopulacja szczepów ma *in vitro* fenotyp LDM (long distance migration), czego nie stwierdzono wśród szczepów typu II i III. Podłoże genetyczne fenotypu migracyjnego nie jest bliżej określone. Przez krzyżowanie szczepów: zjadliwego typu I i niezjadliwego typu III uzyskano klony wykazujące związek



Rys. 1. Aparat ruchu ślizgowego i penetracji *Toxoplasma gondii*: TgGAP50, TgGAP45 – białka *T. gondii* związane z ruchem ślizgowym, TgMLC – łańcuch lekki miozyny *T. gondii*, TgMyoA – miozyna A *T. gondii*, F-Act – filamenty aktynowe, Ald – aldolaza, MIC2 kompleks białka 2 mikronem i białka związanego z białkiem 2, IMC – kompleks błon wewnętrznych

Fig. 1. Gliding motility and penetration apparatus of *Toxoplasma gondii*: TgGAP50, TgGAP45 – *T. gondii* gliding associated proteins, TgMLC – *T. gondii* myosin light chain, TgMyoA – *T. gondii* myosin A, F-Act – actin filaments, Ald – aldolase, TgMIC2-TgM2AP – *T. gondii* microneme protein 2-MIC2 associated protein, IMC – inner membrane complex: Wewn. – intracellular, Zewn. – extracellular, receptory – receptors, pelikula – pellicula, błona plazmatyczna – plasma membrane of *T. gondii*, błona zewnętrzna komórki żywiciela – host cell membrane

dwóch cech: zdolności do migracji i zjadliwości, a tę ostatnią mapuje się na chromosomie VII [5, 7]. Ruch ślizgowy prowadzący do długodystansowego i krótkodystansowego przemieszczania się *T. gondii* uwidoczono w warunkach *in vitro* przez wybarwienie „szlamu” ze zrzucanych powierzchniowych antygenów pasożyta przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych, np. anty-SAG1, głównemu antygenowi powierzchniowemu toksoplazmy [1, 5].

Lista białek związanych z ruchem ślizgowym obejmuje kilkanaście pozycji, a ich topologia została bardzo poglądowo przedstawiona w artykułach przeglądowych [4, 8]. Warto zwrócić uwagę, że w 2004 roku Gaskins i wsp. [9] dopisali do tej listy dwa nowe białka TgGAP45 i TgGAP50 (*T. gondii* gliding associated protein) sugerując, że transbłonowe białko TgGAP50 zakotwicza miozynę w kompleksie błon wewnętrznych pasożyta (IMC – inner membrane complex), a konkretnie w jego błonie zewnętrznej (outer membrane), stanowiąc receptor dla duetu białek: TgMyoA-TgMLC (miozyna A – łańcuch lekki miozyny) (Rys. 1). Jaka jest funkcja drugiego opisanego białka TgGAP45, nie wiadomo, ale wydaje się, że jest to białko o istotnej biologicznej roli, ponieważ nie udało się uzyskać transgenicznych toksoplazm ze zknokautowanym genem dla TgGAP45. Odkrycie białka TgGAP50 jako brakującego ogniwa w złożonej kompozycji elementów odpowiedzialnych za ruch ślizgowy ma szczególnie istotny walor poznawczy i otwiera nowe możliwości w poszukiwaniu takich leków, które blokują ruch pasożyta znoszący jego inwazyjność [10]. Z użyciem krioelektronomikroskopii stwierdzono wcześniej, że przez IMPs (intramembranous particles), tkwiące w błonach kompleksu IMC, pelikula łączy się z 22 podpellikularnymi mikrotubulami, tworząc rusztowanie, które utrzymuje kształt toksoplazmy [11].

### Penetracja do komórek żywiciela

Inaczej niż inne wewnątrzkomórkowe patogeny (wirusy, bakterie, pasożyty), które wykorzystują endocytozę lub fagocytozę do przedostania się do komórek makroorganizmu, *T. gondii* wnika w tempie błyskawicznym (10-30 s) do wszystkich, włączając fagocyty, jądrazystych komórek żywiciela, przy udziale aktywnego procesu zwanego penetracją (inwazją). Proces ten zasadniczo różni się od fagocytozy i zachodzi przy całkowitej bierności komórek makroorganizmu – nie obserwuje się ani sfaldowania ich błony zewnętrznej, ani kondensacji aktyny,

ani fosforylacji tyrozyny [12]. Aktywność penetrująca *T. gondii* oparta jest na ruchu ślizgowym po torze helisy, ale wymaga także udziału cząsteczek adhezyjnych pasożyta, które umożliwiają połączenie się z powierzchnią komórki żywiciela. Cząsteczki te (białka MIC) są wydzielane z mikronem, małych organelli o kształcie nasion kminku, na biegunie apikalnym pasożyta, a sygnałem do ich egzocytozy jest wzrost wewnątrzkomórkowej puli  $Ca^{2+}$  [13]. Szczególna rola przypada tu dwóm białkom mikronem TgMIC2 i TgM2AP (MIC2-associated protein), których domeny cytoplazmatyczne wiążą się z aldolazą (enzymem glikolitycznym rozkładającym fruktozo-1,6-bisfosforan), a ta z kolei stanowi pomost między nimi i filamentami aktynowymi. Translokacja tego kompleksu w kierunku od bieguna przedniego do tylnego, przy udziale miozyny, zapoczątkowuje „wsuwanie się” toksoplazmy do wnętrza komórki żywiciela. Białka mikronem są odcinane przy udziale proteaz serynowych romboidopodobnych (np. MPP1 – microneme protein protease 1), a błona zewnętrzna zlewa się ponad tylnym biegunem pasożyta, zamykając go w wakuoli pasożytniczej [14]. Podczas penetracji, pomiędzy atakującym pasożytem a wpukleniem komórki żywiciela tworzy się krótkotrwała i do dzisiaj enigmatyczna struktura „moving junction” [15, 16].

### Życie w wakuoli pasożytniczej

W przeciwieństwie do pasożytów z rodzaju *Leishmania*, które „zainwestowały” w strategię przetrwania w fagolizosomie, *T. gondii* rozwinęła perfekcyjnie kompleksowy system unikania wejścia w ten wyjątkowo nieprzyjazny biologicznie przedział komórkowy budując bezpieczną dla siebie wewnątrzkomórkową niszę w postaci wakuoli pasożytniczej [17]. Biogeneza wakuoli pasożytniczej, inicjowana przez drugą falę białek wydzielniczych pasożyta – białka roptrii (ROP), została ostatnio szczegółowo opisana i imponująco zilustrowana zdjęciami elektronomikroskopowymi przez de Souza [18]. Toksoplazma replikuje się w sposób synchroniczny co 6-8 godz., objętość wakuoli musi więc ulegać systematycznemu zwiększaniu, aby pomieścić 32-128 potomnych pasożytów [19]. Służą temu małe pęcherzyki satelitarne związane z błoną wakuoli i zawierające białka roptrii. Pęcherzyki te, nazwane ewakuolami, mogą się zlewać z błoną i powodować zwiększenie jej długości [20]. Istotną cechą błony wakuoli jest brak w niej typowych markerów błon pęcherzyków endocytarnych,

jak receptory dla transferyny, receptory dla mannozo-6-fosforanu oraz białka regulatorowe np. rab5, co sprawia, że wakuola nie jest rozpoznawana przez komórkową maszynę fuzji i pozostaje oddzielona od szlaków endo- i egzocytozy [21]. Ta biologicznie bardzo ważna oporność na endocytozę pojawia się już na samym początku procesu penetracji. Z błony powstającej wakuoli, przy udziale nieznanego mechanizmu, usuwane są błyskawicznie białka żywiciela, z wyjątkiem tych zakotwiczonych za pomocą reszt GPI (glikozylofosfatydyloinozytolu) [22]. Charakterystyczną cechą wakuoli jest wytworzenie w ciągu kilku godzin od inwazji bardzo silnie rozwiniętej siatki nanotubul łączących się z komórkami *T. gondii* i z błoną otaczającą wakuolę. Rola tej siatkowatej struktury, wypełniającej wolne przestrzenie między dzielącymi się przez endodiogenezę pasożytami, nie została dotychczas precyzyjnie określona, ale zwykle przyjmuje się, że służy ona wymianie metabolitów między toksoplazmami a cytozolem komórki żywiciela. Błona wakuoli jest sprzężona z siateczką śródplazmatyczną i mitochondriami komórki żywiciela, chociaż, jak ostatnio zaobserwowano, nie wszystkie mitochondria otaczają wakuolę [18]. Wytworzenie dojrzałej wakuoli wiąże się z wydzielaniem w sposób ciągły zawartości trzeciego typu organelli sekrecyjnych – granul o dużej gęstości [23]. Ten utrwalony od lat pogląd o ściśle sekwencyjnym wydzielaniu białek sekrecyjnych jest ostatnio korygowany. Wskazuje się m.in., że wydzielanie białek GRA może zaczynać się jeszcze przed wniknięciem toksoplazmy do komórek żywiciela. Wykazano, że opisane w 2005 roku białko GRA10 jest wydzielane jeszcze przed inwazją i wbudowywane w błonę zewnętrzną komórki żywiciela [24].

Obojętne pH wnętrza wakuoli oraz obecność inhibitorów proteaz sprawia, że wakuola nie jest środowiskiem degradacji makrocząsteczek. W wakuoli wykryto m.in. TgPI-1, inhibitor o szerokim spektrum działania, który blokuje aktywność trypsyny, chymotrypsyny i elastazy. Po wniknięciu do makroorganizmu drogą *per os*, inhibitory enzymów, uwolnione przez toksoplazmę do środowiska zewnętrznego podczas lizy komórek żywiciela, mogą chronić pasożyta przed enzymami trawiennymi przewodu pokarmowego [25].

Toksoplazma modyfikuje komórki żywiciela zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Wyrazem tego są zmiany organizacji cytoszkieletu, np. mikrotubule żywicielskie, równomierne rozmieszczone w cytoplazmie, po wniknięciu

toksoplazmy skupiają się wokół wakuoli pasożytniczej [18].

Z badań wykonanych *in vitro* w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ na ustalonych liniach mysich komórek wynika, że *T. gondii* moduluje ekspresję receptorów dla transferyny w błonie zewnętrznej komórek żywiciela. Zarażenie dużą dawką *T. gondii* BK powodowało po 18 godz. znaczne obniżenie ekspresji receptorów na makrofagach, ale nie na fibroblastach. Sugeruje to, że makrofagi zmniejszając pobieranie transferyny, a przez to ograniczając wewnątrzkomórkową pulę niezbędnego żelaza, mogą hamować replikację toksoplazmy; natomiast fibroblasty, powszechnie używane w laboratoriach do propagacji *in vitro* tego pasożyta, nie wykazują takiej aktywności [26]. W tym kontekście, ciekawa wydaje się zdolność *T. gondii* do wiązania białek transportujących żelazo [27, 28]. Trudno wprawdzie oczekiwać, że jeden osobnik penetrujący do komórki żywiciela, nawet w pełni obciążony takim białkiem, wniesie tyle żelaza, że zaspokoi ono zapotrzebowanie wszystkich potomnych osobników, ale biorąc pod uwagę obecność receptorów dla białek rodziny transferyn także na komórkach żywiciela, można założyć, że możliwe jest modulowanie interakcji pasożyt-żywiciel na drodze oddziaływań: transferyna jako ligand i jej receptory na komórkach żywiciela.

Zasiedlenie wakuoli pasożytniczej wiąże się też ze znacznymi zmianami fizjologii komórek żywiciela, polegającymi na modyfikowaniu stężenia jonów, aktywności niektórych enzymów (np. MAPK – mitogen-activated protein kinase), syntezy cytokin, szlaków sygnałowych oraz procesu apoptozy [29, 30]. Wielość interakcji toksoplazma-komórka żywiciela otwiera liczne możliwości poszukiwania nowych środków terapeutycznych.

## Podsumowanie

*Toxoplasma gondii* rozwinęła zdolność do długotrwałego przeżywania w organizmie licznych gatunków endotermicznych żywicieli, w wielu rodzajach komórkach, wykazując przy tym niewielką patogenność u osobników z prawidłową odpornością. Analiza relacji *T. gondii*-jej żywicieli wskazuje na podstawy sukcesu tego pierwotniaka. Jest to dynamiczny i ekspansywny pasożyt, który przy użyciu unikatowych strategii jest zdolny wnikać i zasiedlić komórki żywiciela, a manipulując wewnątrzkomórkowymi strukturami i szlakami wykreować bezpieczne dla siebie środowiska życia – wakuole pa-

sożytniczą. Po transformacji tachyzoitów w bradyzoity, wakuole przekształcają się w cysty tkankowe, które w żywych komórkach żywicielskich mogą przetrwać przez lata, a nawet dekady, stanowiąc stałe zagrożenie, które na szczęście staje się poważnym problemem tylko w przypadku obniżenia odporności żywiciela.

## Literatura

- [1] Sibley L.D. 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4: 581-586.
- [2] Opitz C., Soldati D. 2002. The glideosom: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology* 45: 597-604.
- [3] Kappe S.H.I., Buscaglia C.A., Bergman L.W., Coppens I., Nussenzweig V. 2004. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends in Parasitology* 20: 13-16.
- [4] Keeley A., Soldati D. 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology* 14: 528-532.
- [5] Barragan A., Sibley L.D. 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology* 11: 426-430.
- [6] Barragan A., Sibley L.D. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *Journal of Experimental Medicine* 195: 1625-1633.
- [7] Sibley L.D., Mordue D.G., Su C., Robben P.M., Howe D.K. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 357: 81-88.
- [8] Soldati D., Meissner M. 2004. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 32-40.
- [9] Gaskins E., Gilk S., DeVore N., Mann T., Ward G., Beckers C. 2004. Identification of the membrane receptor of class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology* 165: 383-393.
- [10] Carrey J. 2004. Parasite movement: crucial anchor revealed. *Drug Discovery Today* 9: 629-630.
- [11] Morrissette N.S., Murray J.M., Roos D.S. 1997. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science* 110: 35-42.
- [12] Dobrowolski J., Sibley L.D. 1997. The role of the cytoskeleton in host invasion by *Toxoplasma gondii*. *Behring Institut Mitteilungen* 99: 90-96.
- [13] Lovett J.L., Marchesini N., Moreno S.N., Sibley L.D. 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca<sup>2+</sup> release from (IP<sub>3</sub>) ryanodi-

- ne sensitive stores. *Journal of Biological Chemistry* 277: 25870-25786.
- [14] Dowse T.J., Soldati D. 2005. Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends in Parasitology* 21: 254-258.
- [15] Carruthers V.B., Giddings O.K., Sibley L.D. 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cellular Microbiology* 1: 225-235.
- [16] Brossier F., Jewett T.J., Lovett J.L., Sibley L.D. 2003. C-terminal processing of the toxoplasma protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6229-6234.
- [17] Denkers E.Y., Butcher B. 2005. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends in Parasitology* 21: 35-41.
- [18] de Souza W. 2005. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorus vacuole. *Histochemistry and Cell Biology* 123: 1-18.
- [19] Carruthers V.B. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica* 81: 111-122.
- [20] Hakansson S., Charron A.J., Sibley L.D. 2001. *Toxoplasma* evacuoles: a two step process of secretion and fusion forms the parasitophorus vacuole. *The EMBO Journal* 20: 3132-3144.
- [21] Mordue D.G., Hakansson S., Niesman I., Sibley L.D. 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental Parasitology* 92: 87-99.
- [22] Mordue D.G., Desai N., Dustin M., Sibley L.D. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *Journal of Experimental Medicine* 190: 1783-1792.
- [23] Mercier C., Adjogble K.D.Z., Däubener W., Cesbron-Delauw M.-F. 2005. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorus vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal for Parasitology* 35: 829-849.
- [24] Ahn H.-J., Kim S., Nam H.-W. 2005. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 614-620.
- [25] Morris M.T., Coppin A., Tomavo S., Carruthers V.B. 2002. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 45259-45266.
- [26] Dziadek B., Dytnerka K., Długońska H. 2004. The modulation of transferrin receptors level on mouse macrophages and fibroblasts by *Toxoplasma gondii*. *Polish Journal of Microbiology* 53 (suppl.): 75-80.
- [27] Tanaka T., Abe Y., Kim W. S., Xuan X., Nagasawa H., Igarashi I., Kumura H., Shimazaki K. 2003. The detection of bovine lactoferrin binding on *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65: 1377-1380.
- [28] Dziadek B., Dzitko K., Długonska H. 2005. *Toxoplasma gondii* binds human lactoferrin but not transferrin. *Experimental Parasitology* 110: 165-167.
- [29] Coppens I., Joiner K.A. 2001. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- [30] Długońska H. 2004. Molecular modifications of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Polish Journal of Microbiology* 53 (suppl.): 45-54.

Zaakceptowano 12 lipca 2005