

Apicomplexan Protozoonlara Model Olarak *Plasmodium spp.*'nin Eritrosit İnvazyonunun Moleküler Temelleri

The Molecular Mechanisms of Erythrocyte Invasion of *Plasmodium spp.* as a Model Organism of Apicomplexan Protozoa

İzzet ŞAHİN, Ozan YAMAN, Berna HAMAMCI, Ülfet ÇETİNKAYA

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Apikompleksan protozoonlar tıp ve tarım alanında önemli patojenlerin bulunduğu protozoon şubesi içinde yer almaktadırlar. Bu protozoonların apeksinde hücre invazyonu ve hücre içinde gelişmede önemli olan rhoptri, mikronem, conoid, apikal polar ring, dens granüller ve apikoplasttan ibaret tepe kompleksi organelleri bulunur. İnsan sağlığını direkt ve indirekt olarak olumsuz etkileyen önemli apikompleksan parazitler arasında *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia* ve *Theileria* sayılabilir. Apikompleksan parazitler substrata bağlı (substrat-dependent) kayma hareketi vasıtasıyla hareket ederler ve konak hücreye aktif olarak girerler. Bu parazitlerde kayma hareketi ve konak hücre invazyonu, aktomyosin-based system (Glydeosome) vasıtasıyla ortaya çıkar. Bu gücü ortaya çıkaran motor (myosin-motor), benzersiz bir çift membran tabakası olan plazma membranı (parazit plazma membranı, plazmalemma) ve iç membran kompleksi (inner membran kompleks, IMC) arasına gömülmüştür. Benzersiz aktomyosin motor, hem konak hücre invazyonunu hemde apikompleksan invaziv dönemin hareketini güçlendirir. Hücre invazyonunda esas olan sitoplazmik motor, transmembran köprüler ve yüzey ligantları başlıca apikompleksan patojenler arasında muhafazalı (conserved) durumundadır. Bu derleme'de, apikompleksan parazitlere bir model organizma olarak plasmodial merozoitlerin eritrositlere invazyonu ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34: 203-6)

Anahtar Sözcükler: Apikompleksan, merzoit, motor kompleks, motilite ve invazyon

Geliş Tarihi: 09.02.2010

Kabul Tarihi: 22.10.2010

ABSTRACT

Apicomplexan protozoa are a phylum of parasites that includes medically and agriculturally important pathogens. They are named for their cell apex which contains a number of organelles (rhoptri, micronemes, conoid, apical polar ring, dense granules and apicoplast), important for their invasion and development within host cells. Among important apicomplexan parasites that affect human health directly or indirectly are *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia*, and *Theileria*. Apicomplexan parasites move and actively enter host cells by substrate-dependent gliding motility. In these parasites, gliding motility and host cell invasion are driven by an actomyosin-based system (Glydeosome). A gliding motor machinery is embedded between the plasma membrane and inner membrane complex (IMC), a unique double membrane layer. A unique actomyosin motor powers both host cell invasion and locomotion of apicomplexan invasive stage. The cytoplasmic motor, a transmembrane bridge, and surface ligands essential for cell invasion are conserved among the main apicomplexan pathogens. In this review, erythrocyte invasion of Plasmodial merozoite, which is a model organism of apicomplexan parasites, has been reviewed in detail. (*Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34: 203-6)

Key Words: Apicomplexan, merozoite, motor complex, motility and invasion

Received: 09.02.2010

Accepted: 22.10.2010

16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-7 Kasım, 2009, Adana

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. İzzet Şahin, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Tel: +90 352 437 49 37 E-posta: izzetsahin@erciyes.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2010.15

Apikompleksan protozoonların hepsi hayvanlarda parazit olarak yaşamakta, insan ve tarım hayvanlarında hesaplanamayacak kadar büyük morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır.

Apikompleksan parazitler arasında;

- Malarya etkenleri *Plasmodium spp.*,
- Immunokompramize bireylerde önemli oportunistik patojen etken *Toxoplasma gondii*,
- Tavuk ve siğirlarda patojen olan *Eimeria spp.*,
- Afrika'da siğirların tick-borne paraziti *Theileria spp.*,
- Oportunistik zoonoz etkeni olan *Cryptosporidium* sayılıdır (1-4).

Apikompleksan protozoonlar; konak hücreye (hedef hücre, target cell) girme ve çıkma, biyolojik bariyerlerden geçme, konak dokularından göç etme, yüzey üzerinde hareket ve konak hücreyi sofistike biçimde manipüle etme gibi müstesna biyolojik harikalar yaratan olağanüstü hücrelerdir. Apikompleksan parazitler, hücre içine aktif olarak girebilen ve yalnızca konak hücre içinde gelişebilen ve çoğalabilen (zorunlu, obligator) intrasellüler parazitlerdir.

Apikompleksan parazitlerin zoitleri, konak dokusundan göç ederken ve konak hücreye aktif olarak internalize (invaze) olurken harekete ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla "glydeosome" (actinomyosin-powered gliding motility) sistemini kullanırlar (5, 6).

Glydeosome'un yapısal ve fonksiyonel komponentleri arasında;

- Motor kompleks; motor kompleks aktin ve myoA+MTIP (myosin-tail-domain interacting protein) + GAP/50 (gliding associated protein 45/50) olmak üzere iki komponentten ibarettir.
- Motor komplekse direkt (eritrosit binding protein -175, (EBA-175)) veya bir bağlayıcı protein (ankır) ile indirekt (trombospondin-related adhesive protein, (TRAP) olarak bağlanan transmembran adhezin kompleksler,
- F-aktin,
- Köprü molekülleri [aldolase, myosin-tail-domain interacting protein (MTIP), inner membrane complex proteinleri (IMCPs)...gibi] ve
- Proteazlar vardır (Şekil 1).

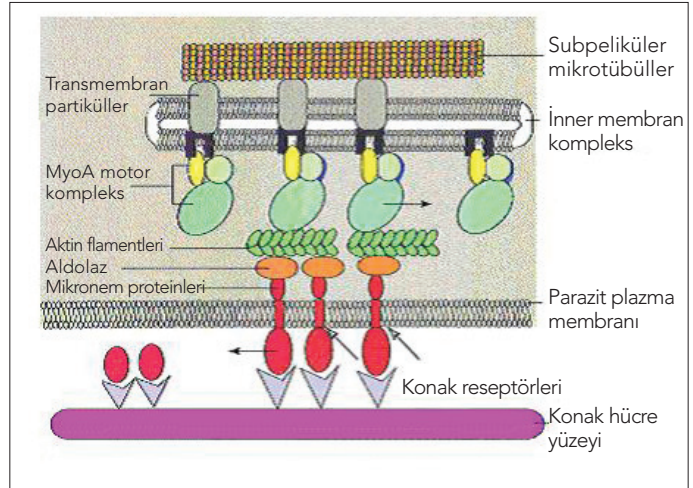
Parazit, kayma hareketi ("gliding motility") denilen bir tarzda hareket eder ve bunun benzersiz mekanizması; dış plazma membranı ve inner membrane complex (IMC) arasında yerleşen ve IMC'ye perçinlenen apikompleksan-spesifik motor kompleks (aktino-miyozin motor) ile güçlendirilir ve sağlanır. Motilite ve host cell invazyonda; sitoplazmik motor, transmembran köprüler ve yüzey ligantları temel rol oynamaktadır (7-9).

Apikompleksan parazitlerin konak hücre invazyonunda, parazit ve konak hücre arasında interaksyonu sağlayan apikal kompleks denilen benzersiz bir yapı bulunmaktadır. Konak hücreye invazyon (=host-cell invasion) ve konak hücre modifikasyonunda (host-cell modification) kritik öneme sahip olan bu organeller;

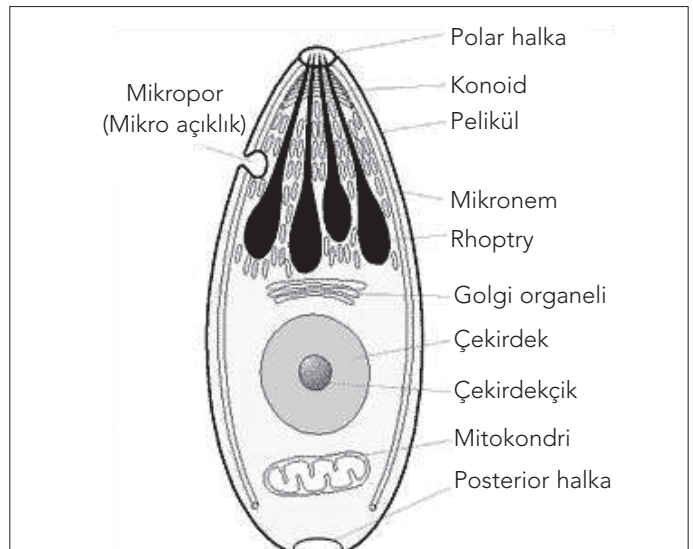
- Rhoptri,
- Mikronem,
- Conoid,

- Apikal polar ring (APR),
- Apikoplast,
- Exonem'den ibarettir (7, 10) (Şekil 2).
- Apikal organellerden rhoptry ve micronemler sekretuar organellerdir; motilite, konak hücreye yapışma (host cell adhesion), konak hücreye invazyon (host cell invasion) ve parazitoforoz vakuol'ün tesis edilmesinde gerekli ürünleri ihtiva ederler (11-14).
- Conoid; küçük, huni şeklinde yapılarıdır ve konak hücreye invazyonda mekanik rol oynadığı farzedilmektedir.
- Apikompleksanlar için benzersiz olan apikal polar ring (APR), bu hücrelerde mikrotübül organizasyon merkezi olarak görev yapar.

Apikompleksan protozoonlar içinde müstesna bir yeri olan *Plasmodium* parazitlerinin üç farklı invaziv dönemi tanımlanmıştır.



Şekil 1. Parazit, konak hücre ve glydeosome komponentleri www.tulane.edu/wiser/malaria/cmb.html'den



Şekil 2. Apikompleksan parazitlerin tepe kompleksi ve diğer organelleri www.biltek.tubitak.gov.tr/.../apicomplexa.gif'den

Bunların yaşam döngü dönemleri ve hedef olarak seçtikleri hücre tipleri farklı olsa da (örn. merozoitler eritrositleri, sporozoitler hepatositleri ve ookinetler vektör anopheles orta bağırsak epitel hücrelerini) her bir zoit benzer temel hücre morfolojisi ve biyolojisi özelliklerine sahiptir.

Bu temel benzerlik, apikal kompleks ve onunla ilgili benzersiz sekretuar organeller olan mikronem, rhoptri ve dens granüller ile belirginleşir.

Apicomplexan parazitlerde hareket ve invazyon sırasında sekretuar organellerin exositosisi (discharge) gerçekleşir; tam komponent takımına sahip zoitler için sekretuar organellerin sıralı salınmasının 4 kademesi vardır:

- Zoitin çıkışa hazırlanması için ekzonem salınması,
- Motilite ve invazyon için mikronem salınması (reoryantasyon ve tight junction formasyonu esnasında),
- PV (Parazitoforoza vakuol) formasyonu ve hücre enfeksiyonunun inşası için rhoptrilerin salınması,
- Post-invazyon döneminde PV ve konak hücrenin yeniden inşası için dens granül salınması.

Plasmodium spp.'nin kan dolaşımında invaze olduğu hücre tipi sadece eritrositlerle sınırlıdır. Bu invazyon; parazitin invaziv formu olan merozoitler üzerinde bulunan yüzey proteinleri (=ligantlar, parazit reseptörleri) ve konak eritrosit yüzeyindeki aynı kökten gelen (cognate) reseptörler arasında olan spesifik ligant-reseptör interaksiyonu vasıtasıyla belirlenmekte ve gerçekleşmektedir (15).

Eritrosit reseptörlerini spesifik olarak tanıyan ve bağlanan merozoit yüzey adhezinleri (adheziv ligantlar) arasında en önemlileri:

- Eritrocyte binding protein -175 (EBA-175)
- Duffy-binding protein (DBP)
- Reticulocyte-binding protein (RBP)
- Reticulocyte - binding homolog protein (Rh)
- Trombospondin-related adhesive protein (TRAP), merozoite trombospondin-related adhesive protein (MTRAP), *Plasmodium* trombospondin - related apical protein (PTRAMP) vardır.

Plasmodium parazitlerinin eritrositlere girebilmesi için, merozoitin eritrosit yüzey komponentlerini (=eritrosit reseptörleri) tanıması ve yapışması gereklidir.

Opsiyonel reseptörler arasında;

Glycophorinler (GlyA, GlyB...gibi)

(Bir multipass integral membran proteini ve anyon transportudur ve eritrositlerin spectrin-aktin submembran cytoskeletonu için yapışma fonksiyonuna sahiptir).

Band 3,

Retikülosit spesifik reseptör,

Sialik asit bulunur (15).

DeneySEL çalışmalar, canlı video ve EM çalışmaları ile invazyon sürecinde 4 farklı adımın bulunduğu ortaya konulmuştur.

- Başlangıç merozoit bağlanması (initial merozoite binding)
- Reoryantasyon ve mikronem ekzositozisi

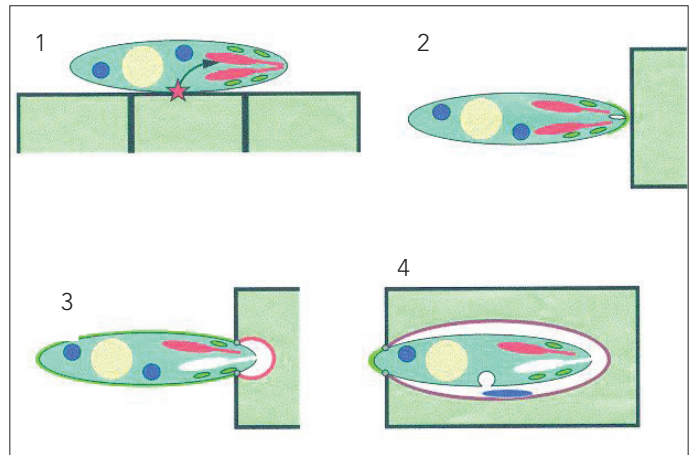
- Sıkı bağlanma formasyonu (tight junction formation)
- Giriş ve transformasyon (entry and transformation) (Şekil 3).

1. ADIM; Konak eritrositlerinden çıkışı takiben serbest merozoitler ile yeni eritrositler arasında merozoit yüzeyinin herhangi bir noktasında reversibl olarak düşük afiniteli başlangıç teması ve bağlanması gerçekleşir; yüzeyden apekte bir sinyal gönderilir. Bu bağlanmada, yüzlercesi içinde en iyi tanımlanan GPI- anchored protein de denilen merozoit yüzey proteini-1 (MSP-1) önemlidir ve eritrosit reseptörlerinden Band 3 ile bağlanır (15, 16).

2. ADIM; Parazit eritrosite bağlandıktan sonra kendisini, apikal ucunu eritrosit membranına sıkıca bağlayarak (juxtapose) reoryante eder. Merozoitin apikal ucuna lokalize olan Apikal membran antijen-1 (AMA-1) olarak bilinen bir transmembran protein ve High Molecular Weight Rhoptri (RHOPH) kompleksi bu reoryantasyona iştirak eder. Bu sırada hareketli bağlanma (moving junction) oluşturmada ve dolayısıyla invazyonda önemli adımlardan birisi olan, konak hücreye mikronem apikal bağlanması ve mikronem salınımı gerçekleşir (17, 18).

3. ADIM; Merozoit reoryantasyonu ve mikronem salınımını takiben parazit plazma membranında (PPM)'de bulunan multiple parazit ligantları ve konak hücre plazma membranında (CPM)'de bulunan eritrosit reseptörleri arasında sıkı bağlanma (tight junction, moving junction) olarak bilinen, yakın (membran-to-membran) teması ile gerçekleşen yüksek afiniteli irreversible temas ve bağlantı sağlanır. Ekzosite mikronemal materyal zoit yüzeyine yayılır ve hareketli bağlanmanın arkasından zoit membranı üzerine kaplanır (capped). Tayt janksiyon, giren zoitin etrafındaki yüzük şeklindeki zondur; konak hücre invazyonu esnasında motor kompleks aktivitesinin fokal noktasıdır (19-21).

4. ADIM; Janksiyon bölgesinde oluşan ve konak membranı ve parazit komponentlerinden oluşan parazitoforoza vakuol membranı (PVM) ile kuşatılmış olan parazitoforoza vakuol gittikçe geniş-



Şekil 3. Apikomplexan protozoonların invazyon basamakları: (1) Zoit konak hücre yüzeyi ile temas eder; sinyal yüzeyden tepeye iletilir. (2) sinyal reoryantasyona sebep olur (reoryantasyonu indükler), konak hücreye mikronem bağlanması olur, moving Junction (hareketli bağlanma) formasyonu gerçekleşir. (3) moving Junction arkaya doğru kayarken Rhoptri salınımı olur ve PV genişlemeye başlar. Rhoptri materyali PVM ile entegre olur. Ekzosite olan micronemal materyal zoit yüzeyine yayılır ve "moving junction" arkasına yayılır. (4) Vakuol genişlemeye devam eder, bunun lipidlerinin çoğu konak hücre plazmalemmasından temin edilir. Janksiyon parazitin arka ucuna ulaşır ve sonunda vakuol kapanır. Dens granüller vakuol yüzeyine salınır (22).

leyerek, janksiyon parazitin arka ucuna ulaştığında kapanır (23). Gliding motility ve invazyon sürecinde, motor kompleksin aktivasyonu ve fonksiyonel olabilmesinin (gliding motilite ve invazyonun gerçekleşebilmesinin) ön koşulu; bu tayt janksiyon formasyonunun ve tayt janksiyon köprülerinin oluşması ve güç üreten ve hücre invazyonunu gerçekleştiren miyozinin sürücü gücünü parazit hareketine transfer edebilmesi için motor kompleksin IMC membranlarına güvenli olarak bağlanması gerekir. Motor kompleksin miyozin komponenti (MyoA, MTIP, GAP/50) dış IMC membranlarına bağlanmaktadır. Bağlanma, burada bulunan bağlayıcı (anchoring) proteinler (IMPs, IMCPs) vasıtasıyla perçinlenen GAP/50 yoluyla sağlanmaktadır. Miyozin motorun MyoA-GAP/50 bağlantısı MTIP aracılığıyla sağlanmaktadır. Motor kompleksin (aktino-miyozin motor) temel fonksiyonlarını görebilmesi için parazit sitoskeletonuna bağlanmasının yanında, hedef hücre (target cell, host cell) ile de bağlantı kurması gerekir. Bu bağlantı; plazma membranı ve IMC arasında yer alan aktin filamentleri (IMC'de lokalize olan ve aktin polimerizasyonu ile oluşan) ve ektodomainleri ile subsrat ve konak hücrelere bağlanan plazma-membran adhesiv proteinlerin (TRAP ve diğer adhesinlerin) C-terminal kuyruklarının aldolase yardımıyla teması (aldolase-mediated contact) ile sağlanmaktadır (16, 24, 25).

SONUÇ

Transmembran adhezin -aktin filament kompleksinin, PPM'nin sıvı lipid tabakalarının (inner double membran, fosfolipid bilayer) intermembran alanı içinden miyozin motor yardımıyla çekilmek suretiyle gerçekleşen posterior lokasyonu parazitin ileriye doğru (eritrosit içine doğru) sürülerek ilerlemesini sağlar. Bu işlem 5-20 saniyede gerçekleşir ve invazyon tamamlanır.

Anlaşıldığı üzere parazitin ilerlemesi için, bağlayıcı proteinlerle oluşan komplekslerin bağlantılarının proteolitik proseslerle koparılması gerekmektedir. Burada, AMA-1, MSP-1 ile oluşan yüzey örtüsü (surface coat) "shedde" vasıtasıyla koparılmakta; micronemal adhesiv proteinlerin proteolitik olarak uzaklaştırılması da, membran çözülmesini kolaylaştıran bir yerleşik protease (çoğunlukla bir rhomboid proteaz) vasıtasıyla sağlanmaktadır (26-28).

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışmasının söz konusu olmadığını bildirmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Charleston WA. Toxoplasma and other protozoan infections of economic importance in New Zealand. New Zealand journal of zoology 1994; 21: 67-81.
- Hommel M and Gilles HM. Malaria. TopleyWilston's Microbiology and Microbial Infections 10 Edition. Parasitology (Eds) FEG Cox, Derek Wakelin, Stephen H. Gillespie and DD Despommier. ASM Press, 2005.
- Kaya G. An Overview of Classification of the Phylum Apicomplexa. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2001; 7: 223-8.
- Schmunis GA and Lopez-Antunano FJ. World-wide importance of parasites. Topley Wilston's Microbiology and Microbial Infections 10 Edition. Parasitology (Eds) FEG Cox, Derek Wakelin, Stephen H. Gillespie and DD Despommier. ASM Press, 2005.
- Kappe SHI, Buscaglia CA, Bergman LW, Coppens I, Nussenzweig V. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. Trend an Parasitology. 2004; 20: 13-6.
- Matuschewski K, Schuler H. Actin/Myosin-Based Gliding Motility in Apicomplexan Parasites. Edited by: Barbara A. Burleigh, Dominique Soldati-Faure. Molecular Mechanisms of Parasite Invasion Sub cellular Biochemistry, 2008; 47: 110-20.
- Mehlbom H. Cellular Organisation of Parasite Protozoa. Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. Ed by: Stephen H, Gillespie and Dickson D. Despommier ASM Press, 2005.
- Thompson J, Cooke RE, Moore S, Anderson LF, Janse CJ, Waters AP. PTRAMP; a conserved Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite protein. Molecular and Biochemical Parasitology. 2003; 134: 225-32.
- Toril M, Matsumoto Y, Kamboj KK, Maracic M, Guo SQ, Nussenzweig RS, et al. Association of microneme antigens of Plasmodium brasilianum merozoites with knobs and other parasite-induced structures in host erythrocytes. Infect Immun, 1989; 57: 596-601.
- Levine ND. Introduction to the Apicomplexa. ED. Lee JJ, Hutner SH and Bovee EC. An Illustrated Guide to the Protozoa Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, 1985.
- Caruthers VB, Tomley FM. Microneme Proteins in Apicomplexans. Edited by: Barbara A. Burleigh, Dominique Soldati-Fawre. Molecular Mechanisms of Parasite Invasion Subcellular Biochemistry, 2008; 47: 33-45.
- Kalpna L, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR, Wasting JM, et al. Characterisation of Plasmodium invasive organelles; an ookinete microneme proteome. Proteomics 2009; 9: 1142-51.
- Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. International Journal for Parasitology. 2001; 31: 1293-302.
- Tomley FM and Soldati DS. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. Trends in Parasitology. 2001; 17: 81-8.
- Duraisingh MT, Simone TD, Jennigs C, Refour P and Wei Wu C. Eritrosit invasion by Plasmodium falciparum: Multipil ligand-receptor interactions and phenotypic switching. Ed: Barbara A, Burleigh and Dominique Soldati Fawre. Landes Bioscience, 2008; 47: 46-57.
- Bullen HE, Tonkin CJ, O'Donnell RA, Tham WH, Papenfuss AT, Gould S, et al. A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. J. Biol. Chem. 2009; 284: 25353-63.
- Healer J, Crawford S, Ralph S, Fadden GM, Cowman AF. Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing Plasmodium falciparum Merozoites. Infection and Immunity. 2002; 70: 5751-8.
- Tanyuksel M. Hucrenin Molekuler Yapısı ve Hucre İci Sinyalizasyon Molekuler Parazitoloji. ED. Ozel M.A, Tanyuksel M, Eren H. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22 İzmir, 2009.
- Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. Trends in Parasitology, 2008; 24: 557-63.
- Cowman Af and Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell 2006; 124: 755-66.
- Wiser MF. Cellular and Molecular Biology of Plasmodium. Tulane University (c 1999), Last Modified on February 12. 2009. Şahin ve ark. 206 Eritrosit İlgalinin Moleküler Mekanizması: Plasmodium Modeli.
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, and Fourmaux MN. Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. 1998; 28: 1007-13.
- Sinavi AP. Biogenesis of and activities at the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane. Edited by: Barbara A. Burleigh, Dominique Soldati-Faure. Molecular Mechanisms of Parasite Invasion Sub cellular Biochemistry, 2008; 47: 155-64.
- Huxley AF. Mechanics and models of the myosin motor. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 2000; 355: 433-40.
- Morrisette NS and Sibley LD. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002; 66: 21-38.
- Dowse TJ, Koussis K, Blackman MJ and Soldati-Fawre D. Roles of Proteases during Invasion and Egress by Plasmodium and Toxoplasma. Edited by: Barbara A. Burleigh, Dominique Soldati-Fawre. Molecular Mechanisms of Parasite Invasion Sub, 2008; 47: 121-39.
- Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, O'Donnell RA, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Molecular identification of a malaria merozoite surface shedde. PLoS Pathogens is run by an international Editorial Board, headed by the Editor-in-Chief, Kasturi Haldar (University of Notre Dame, Notre Dame, IN, USA). 2005; 1: 241-51.
- Van der Blik AM, Koehler CM, 2003. A mitochondrial rhomboid protease. Developmental cell. 2003; 4: 769-70.