

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Molekulární biologie a biochemie organismů

Katedra parazitologie



Vladimíra Najdrová

Buněčný transport proteinů a jeho úloha v patogenních procesech
Cellular protein transport and its role in pathogenesis

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 19. 8. 2011

Poděkování

Rády bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za poskytnutí literatury, cenných odborných rad a za čas, který mi věnoval.

Abstrakt

Předmětem této práce jsou procesy sekrece vybraných proteinů u několika významných parazitů člověka - *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.* a *Giardia intestinalis*. Uvedeny jsou zde proteiny, jak parazitární, tak i hostitelské a to především v souvislosti s hlavními infekčními procesy a ve spojitosti se sekreční dráhou. Sekrece proteinů do prostředí hostitele patří zejména pro intracelulární parazity mezi klíčové nástroje pro přežití a manipulaci s hostitelským organismem. Z uvedených informací vyplývá, že různí parazité k tomu využívají funkčně i evolučně odlišné strategie.

Klíčová slova

sekreční dráha, translokon, signální sekvence, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Giardia intestinalis*

Abstract

The main topic of this thesis are the protein secretion processes in several important human parasites – *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.* and *Giardia intestinalis*. Described here are the parasite's and the host proteins which participate in the pathogenic processes involving the protein secretion. As shown here, the protein secretion into the host environment is one of key tools serving the parasite to survive within and manipulate the host organism. Interestingly, different parasitic organisms use functionally and evolutionary distinct strategies to fulfill this aim.

Key words

secretory pathway, translocon, signal sequence, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Giardia intestinalis*

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Seznam použitých zkratek.....	2
3	Apicomplexa	3
3.1	Apikoplast	4
3.2	Export proteinů.....	7
3.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	8
3.4	<i>Plasmodium falciparum</i>	10
4	Kinetoplastida.....	14
4.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	14
4.2	<i>Leishmania</i>	16
5	<i>Giardia intestinalis</i>	20
6	Závěr.....	23
7	Seznam použité literatury	24

1 Úvod

Každý organismus ke svému životu potřebuje řadu proteinů. Většina z nich prochází tzv. sekreční dráhou, počínaje syntézou proteinu na volném ribozomu. Proteiny cílené do této dráhy obsahují na svém N-konci signální sekvenci, která je rozpoznána SRP (Signal recognition particle) partikulí. Ta směřuje protein na receptor pro SRP obsažený na membráně endoplasmatického retikula, který protein předá na translokon. Jedná se o ribonukleotidový komplex umístěný v membráně endoplasmatického retikula. Hlavní funkce translokonu je procesování proteinů do lumen i do membrány této organely. Vše je řízeno signálními či případně kotevními sekvencemi. V lumen endoplasmatického retikula je signální sekvence odštěpena tzv. signální peptidázou. Proteiny v endoplasmatickém retikulu podstupují řadu modifikací, které jsou nezbytné pro vstup do další složky sekreční dráhy – Golgiho aparátu. Jedná se především o vznik disulfidických můstků, specifická proteolytická štěpení, připojování karbohydrátů nebo také správné sbalení proteinů do sekundárních struktur. Pokud jsou proteiny ve správném uspořádání, jsou transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou především glykosylovány. Z nejbližší části Golgiho komplexu tzv. *trans* Golgi, jsou proteiny sekretovány na svá místa určení. Veškeré přenosy, jak mezi organelami, tak i k místu určení, jsou zprostředkovány vezikulárním transportem. Tuto cestu postupují proteiny, které jsou buď uvolněny mimo buňku, nebo umístěny na povrchu organismu, v jeho plasmatické membráně či v lysozomu.

Parazitické organismy využívají sekrece proteinů nejen k maskování před imunitním systémem hostitele ale i k získávání živin a manipulaci s metabolismem hostitele. Především u intracelulárních parazitů lze pozorovat unikátní mechanismy proteinové sekrece, které jsou využívány k infekci, přežívání a využití hostitelových biomolekul.

Předmětem této práce je shrnutí a porovnání základních poznatků týkajících se význačných infekčních procesů využívající různé aspekty transportu proteinů. Cílem této práce není předložit vyčerpávající informaci o biologii jednotlivých parazitů, ale spíše shrnout dosavadní poznatky o nejdůležitějších proteinech v interakcích parazit-hostitel.

V poslední kapitole je část věnována RNA interferenci u *Giardia intestinalis*, jako mechanismu regulace exprese povrchových molekul parazita. Toto téma bude předmětem mé diplomové práce.

2 Seznam použitých zkratk

CS	cirkumsporozoit protein
ER	endoplasmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
GPI	glykofosfatidylinositol
LPG	lipofosfoglykany
NLS	nuclear localization signal
PPG	proteofosfoglykany
PTEX	Plasmodium translocon of exported proteins
PV	parazitoformní vakuola
PVM	membrána parazitoformní vakuoly
RdRP	DNA dependentní RNA polymeráza
SP	signální peptid(sekvence)
SRP	signal recognition particule
TP	transitní peptid (sekvence)
VSP	variant-specific surface protein

3 Apicomplexa

Kmen *Apicomplexa* se řadí mezi jednobuněčná eukaryota, neboli protista, a spolu s dalšími kmeny - příkladem *Ciliophora* (nálevníci), *Dinozoa* (obrněnky), spadá do skupiny *Chromalveolata* (Adl et al., 2007). Tato skupina obsahuje převážně obligátně parazitické druhy, které způsobují řadu onemocnění u člověka i zvířat. Z lidských parazitóz je to především malárie (původce *Plasmodium falciparum*) a toxoplasmóza (původce *Toxoplasma gondii*). Oba tyto zástupci, stejně jako většina ze skupiny *Apicomplexa*, jsou vnitrobuněční parazité a k tomuto způsobu života výrazně přizpůsobili svou buněčnou strukturu. Kromě běžně se vyskytujících buněčných organel jako je jádro, endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát, se u zástupců této skupiny vyvinuli specializované organely, které jsou buď adaptací na parazitický způsob života uvnitř buňky, nebo evolučním pozůstatkem endosymbiózy. Nejznámější z těchto adaptací je v přední části těla důmyslná organela umožňující pronikání do hostitelských buněk – apikální komplex, jehož součástí jsou i lysozomům podobné rhoptrie či zásobní denzní granula. Typická je pro *Apicomplexa* i přítomnost sekundárního plastidu, tzv. apikoplastu,. Tato skupina však úplně postrádá peroxisomy, které jsou pro většinu ostatních eukaryot zcela esenciální (Schluter et al., 2006).

Tato kapitola je zaměřena především na funkci a význam apikoplastu a transport proteinů. Je omezena na dva nejvíce zkoumané zástupce, *Plasmodium falciparum* a *Toxoplasma gondii*, u kterých došlo k velkému rozvoji metod reverzní genetiky.

3.1 Apikoplast

Jedná se o sekundární plastid, který vznikl opakovanou endosymbiózou. Tedy pohlčením a udržením eukaryotického organismu, který již obsahoval primární plastid přímo odvozený z cyanobakterie. Apikoplast je proto obalen čtyřmi membránami. Nejvzdálenější membrána je analogem fagosomální membrány hostitelské buňky, druhá nejvzdálenější je původem z pohlčené řasy. Dvě vnitřní membrány odpovídají původem membránám chloroplastu, vznikly tedy z primárně pohlčené cyanobakterie (Wilson et al., 1996; Mullin et al., 2006).

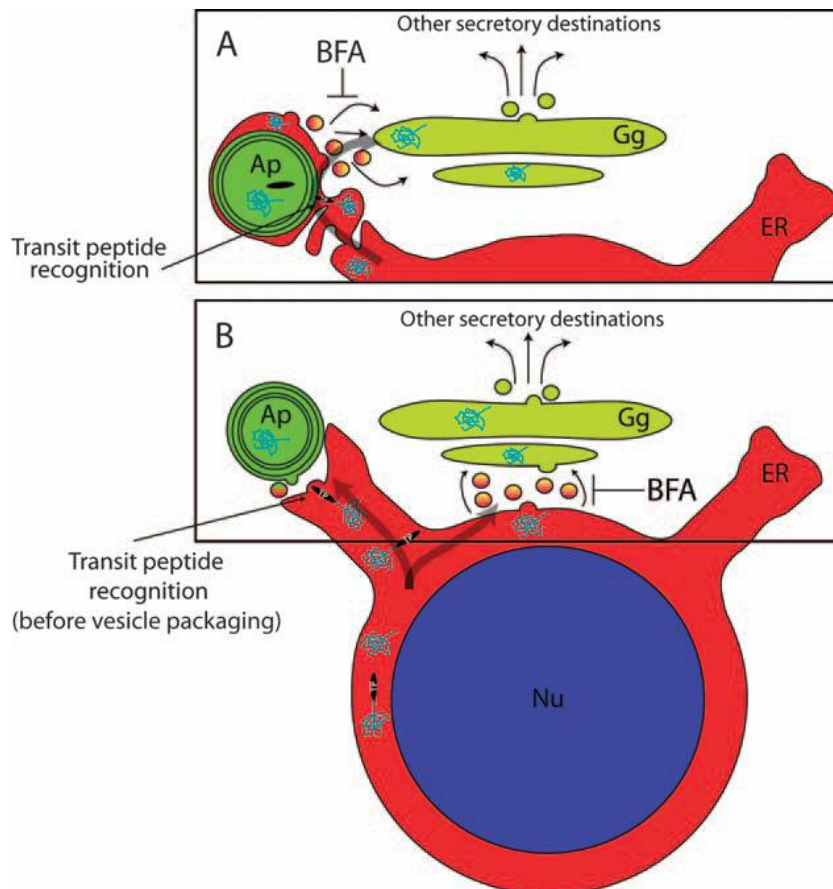
Přes obecnou shodu v počtu membrán i symbiotickém původu apikoplastu zůstávají spory ohledně fylogenetického zařazení sekundárně pohlčeného organismu. Řada vědců připisuje původ zelené řase. Příkladem může posloužit studie o laterálním genovém transferu genů pro cytochromoxidázu mapující původ apikoplastu do třídy řas *Chlorophyceae* (Funes et al., 2002). Avšak objev fotosyntetizující řasy *Chromera velia* potvrzuje původ spíše v červených řasách. Molekulární fylogenetická analýza jaderného genomu tohoto organismu prokázala, že *C. velia* je příbuznější kmenu *Apicomplexa* nežli fotosyntetizujícím zástupcům kmene *Dinoflagellata* (Obornik et al., 2011). *C. velia* se tímto stává výborným modelem nejen pro rozluštění původu *Apicomplexa*, ale také nástrojem pro vývoj a testování léků zaměřených proti parazitickým zástupcům apicomplex.

Cirkulární genom apikoplastu je svou velikostí 35kb v porovnání s genomy fotosyntetických plastidů velmi malý (Obornik et al., 2009; Wilson et al., 1996). Z genů apikoplastu byly nalezeny pouze dva, které se neúčastní základních procesů, jako je transkripce a translace. Jedná se o ClpC kódující molekulární chaperon a ORF470, jehož produkt je zapojen do biogeneze železo-sírných center (Ellis et al., 2001; Parsons et al., 2007). Je tedy zřejmé, že mnoho genů bylo v průběhu evoluce přesunuto do jádra (Martin and Herrmann, 1998). Nastává tedy otázka, jak se proteiny kódované v jádře dostanou až do apikoplastu, pokud musí na své cestě překonat čtyři membrány.

Proteiny cílené do apikoplastu obsahují na N-konci tzv. bipartitní sekvence, které se skládají z hydrofobního signálního peptidu (SP) pro endoplasmatické retikulum a transitního peptidu (TP), který slouží k překročení vnitřní membrány plastidu (Waller et al., 2000; Waller et al., 1998). Pro směřování do apikoplastu je na N-konci TP nezbytná přítomnost kladného náboje, a to bez nároku na specifické pořadí aminokyselin (Tonkin et al., 2006).

SP apikoplastového proteinu je rozeznán jako klasický signál pro kotranslační transport do ER přes Sec61 komplex. Dva modely popisují cestu apikoplastových proteinů přes ER (obr.1) V prvním modelu se předpokládá, že všechny proteiny určené pro sekreci, ať už do apikoplastu či do jiných kompartmentů buňky, přijdou do styku s PVM. Pouze ty, které obsahují TP jsou rozpoznány a importovány do apikoplastu (obr, model A). Druhý model navrhuje transport do apikoplastu jako boční větev v rámci brzkého endosomálního systému. Předpokládá tedy, že TP v proteinu pro apikoplast jsou rozpoznány již v rámci ER a transportovány ve váčcích přímo do apikoplastu (model B obr.) (Tonkin et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že z proteinů určených k sekreci je až polovina určena pro apikoplast, model A se jeví jako pravděpodobnější. Při uplatnění modelu B by bylo zapotřebí nových receptorů pro TP, schopných rozeznat a sbalit proteiny do váčků. Tento hypotetický receptor by musel rozeznat kolem pěti set proteinů (tolik je jich přibližně určeno do apikoplastu) včetně těch, které neobsahují klasickou bipartitní sekvenci (PfoTPT/TgAPT1) (Karnataki et al., 2007).



(Obr.1) Model cílení jádrem kódovaných proteinů určených do apikoplastu. Model A předpovídá uložení parazitoformní membrány apikoplastu v těsné blízkosti ER. Proteiny obsahující transiitní sekvenci jsou transportovány ve váčcích stejně jako proteiny mimo apikoplast. Na membráně apikoplastu jsou vycytávány ze sekretonické cesty proteiny obsahující transiitní sekvenci a vstupují do apikoplastu. Proteiny bez transiitní sekvence pokračují v váčcích dále v sekretonické cestě do GA. Model B vyžaduje odlišení proteinů určených do apikoplast od ostatních již v počátku sekreční cesty. (BFA) brefeldin A blokuje sekreci z ER do GA, ale transport proteinů z ER do apikoplastu nemá vliv, (Nu) jádro, (ER) endoplasmaické retikulum

V rámci periplastidového prostoru je SP odštěpena signální peptidázou, čímž dojde k odhalení transiitní sekvence. Ta je zodpovědná za následný transport až do lumen apikoplastu. Bylo navrženo několik modelů translokace proteinů přes periplastidovou membránu. Jako nejpravděpodobnější se jeví model, který připouští zachování původního ERAD (Endoplasmatic Reticulum Associated Protein degradation) dráhy z pohlcené řasy. Kvasinky a vyšší eukaryota využívají tento systém pro transport špatně sbalených proteinů z ER do cytosolu, kde jsou degradovány v proteasomu. Pro transport je pravděpodobně využíván kanál Sec61. Nezbytná je také ubiquitinace proteinu určeného pro degradaci. To zajišťuje komplex Cdc48p-Npl4p-Ufd1p, jedná se o tzv. ubiquitin vázající proteiny. V sekundárním plastidu byl tento systém pravděpodobně modifikován a je využíván k opačnému směru přenosu, tedy směrem do apikoplastu (Sommer et al., 2007). Skutečně v genomu nukleomorfu (pozůstatek jádra pohlcené řasy, umístěn v periplastidovém prostoru) skrytény *Guillardia theta*, byly identifikovány geny pro komponenty dráhy ERAD dráhy. Konkrétně se jedná o Der1p (Degradation in the ER protein 1), RING-finger ubiquitin ligázu Hrd1, zkrácený Udf1 a kofaktor CDC48 (Sommer et al., 2007). Tyto proteiny také obsahují signál, který je směruje do periplastidového prostoru apikoplastu, kde protein zřejmě DER1 tvoří vlastní kanál (Ye et al., 2004). pro přesun proteinů. V genomu apikomplex byly objeveny geny pro Udf1, CDC48 a pro protein podobný Der1.

Díky evolučnímu původu apikoplastu, se předpokládá, že obě vnitřní membrány organely obsahují obdobu plastidového transportu proteinů. Tedy, homolog Toc kanálu na vnější Tic kanálu ve vnitřní membráně. Sekvence genomu *P. falciparum* nepřinesla žádné výsledky svědčící o přítomnosti Toc homologu (McFadden and van Dooren, 2004) a prozatím ani u dalších zástupců kmene nebyl prokázán. Na druhé straně byla prokázána přítomnost dvou homologů Tic proteinů (Kalanon et al., 2009).

Homolog Tic22 u *P. falciparum* – PfTic22 byl prokázán jako protein asociující s vnitřní membránou apikoplastu. Na N-konci obsahuje bipartitní sekvenci pro směřování do apikoplastu (Kalanon et al., 2009). Transmembránový protein TgTic20 u *T.gondi* byl ověřen jako esenciální pro transport i celkovou životaschopnost apikoplastu (van Dooren et al., 2008).

3.2 Export proteinů

Apicomplexa obsahují klasické sekretonické dráhy proteinů přes ER a GA. Navíc však tyto parazité mají vyvinuty i další, jedinečné sekretonické dráhy a k tomu i určené organely, které jim umožňují transport proteinů na různá místa uvnitř či vně parazita a také do napadené hostitelské buňky. Sekrece proteinů do hostitelské buňky byla zatím pozorována jen u zástupců *Theileria*, *Toxoplasma* a *Plasmodium* (Ravindran and Boothroyd, 2008). Každý z nich si vyvinul jiné sekreční proteiny a mechanismy sekrece jakožto reakci na konkrétní prostředí, ve kterém se vyskytují. Co je však společné všem těmto zástupcům, je přítomnost tří specializovaných sekrečních organel. V apikální části parazita se jako součást apikálního komplexu nacházejí malé podlouhlé mikronémy a kyjovité rhoptrie. Spolu s nimi funkčně souvisejí v buňce rozptýlená denzní granula. Při interakci parazit-hostitel jako první svůj obsah uvolňují mikronémy. Proteiny v nich obsažené jsou určeny na povrch parazita, kde slouží nejspíše k usnadnění klouzavého pohybu a vzniku tzv. moving junction, neboli těsné interakci mezi plasmatickou membránou hostitele a povrchovými složkami parazita (Alexander et al., 2005). Spolu s mikronemálním proteinem AMA1 (apical membrane antigen 1), proteiny z rodiny RON (Rhoptry neck proteins), vytvářejí stabilní komplex v membráně parazita iniciující invazi (Alexander et al., 2005). I přes jisté rozdíly všechny tyto mechanismy mají jediný cíl, manipulaci s hostitelskou buňkou ku prospěchu parazita. Existence endosomálního a lysozomálního systému nebyla přímo potvrzena, avšak přítomnost homologu Rab5 u *T.gongi* (TgRab5) vedla k objevu brzkého endosomu (Robibaro et al., 2002).

Intracelulární parazité jsou po průniku do hostitelské buňky zapouzdřeny do PV ohraničené PVM, jejíž komponenty jsou původem jak z parazita, tak i hostitelské buňky (Suss-Toby et al., 1996). Biogeneze PV je u obou zástupců vyvolána především parazitem při jeho aktivní invazi, která je koordinována výše zmíněnými sekrečními organelami. *P. falciparum* je v rámci svého životního cyklu omezeno na vnik do hepatocytů a erytrocytů,

na rozdíl od *T. gondii*, která je schopna invadovat prakticky jakoukoli savčí buňku. Z tohoto důvodu se u těchto dvou příbuzných zástupců vyvinuly rozdílné PV. I když úvodní kroky tvorby PV jsou u obou zástupců podobné, zrání vakuol je odlišné z hlediska architektury a metabolismu a vede ke dvěma odlišným druhům parazitárního množení – endodygonie (*T. gondii*) versus schizogonie (*P. falciparum*). U obou zástupců však poskytují nejenom ochranu před hostitelskou buňkou, ale také rozhraní pro výměnu materiálu mezi hostitelem a parazitem.

3.3 *Toxoplasma gondii*

Klouzavý pohyb parazita je zajištěn poměrně složitým motorovým systémem, zahrnujícím jak myozinovou tak aktinovou složku, umístěným mezi plasmatickou membránou parazita a vnitřním párem membrán, do kterých je ukotven dvěma proteiny tzv. gliding-associated proteins (GAP) (Gaskins et al., 2004).

Vzniku pevného spojení mezi parazitem a hostitelskou buňkou předchází slabé mezibuněčné interakce zprostředkované povrchovými proteiny *T. gondii* tzv. SAG (GPI-anchored surface antigens) (Lekutis et al., 2001). Ty jsou kotveny v membráně fosfatidylinositolovou kotvou (GPI-anchor) (Tomavo et al., 1989; Nagel and Boothroyd, 1989). Pevná interakce povrchu *T. gondii* a plasmatické membrány je zprostředkována, jak bylo zmíněno výše, hlavně pomocí dvou proteinů – AMA1 a RON4. Postupnou invazí se posouvá moving junction od přední k/ke zadní části parazita, který se postupně uzavírá do vznikající PV (Alexander et al., 2005). V moving junction byly navíc lokalizovány další proteiny původem z rhoptrií – RON2 a RON5 s prozatím neurčenou bližší funkcí (Alexander et al., 2005) a jeden ROP (rhoptry proteins) protein – ROP2 (El et al., 2006). Při odhalení tří transmembránových domén u ROP2 byla navržena hypotéza, že tento protein je zakotven pomocí GPI-kotvy na hostitelské straně membrány a zprostředkovává spojení umožňující snadnější napojení následujících procesů invaze. Pro tuto teorii však dosud neexistuje experimentální podpora a zůstává tak jen ve stádiu spekulací (Carruthers and Boothroyd, 2007).

Proteomickou analýzou byly ROP proteiny rozděleny do několika rodin. Převážná část je určena do PV, ale některé obsahují jaderný lokalizační signál (NLS) a jsou tedy sekretovány přes PV do jádra infikované hostitelské buňky (Bradley et al., 2004). Proteiny z rodiny ROP-2 zprostředkovávají přidružení hostitelských organel k PVM, především ER a

mitochondrií (Sinai and Joiner, 2001). Za hlavní mediátor těchto interakcí byl prokázán samotný ROP2, přestože některé studie nasvědčují zapojení proteinů z denzních granul (GRA) Na N-konci (Sinai and Joiner, 2001), ROP2 byla identifikována 98 aminokyselin dlouhá sekvence podobná TP do mitochondriální matrix (Beckers et al., 1994). Tato sekvence obsahuje kladně nabitý amfipatický helix, velký počet hydroxylovaných a málo záporně nabitých aminokyselin (Neupert, 1997). Bylo ověřeno, že tato část proteinu vyčnívá do cytoplasmy hostitele, váže se do membrány mitochondrie a utváří tak pevné spojení (Sinai and Joiner, 2001). ROP2 proteiny jsou převládající antigeny v membráně parazitoformní vakuoly (Beckers et al., 1994). Zatím není známo molekulární pozadí vazby proteinu do mitochondriální membrány. Někteří autoři uvádí, že doména vystavená do cytoplasmy sdílí některé fyzikální funkce s cytochromem c lokalizovaným v mitochondrii, např. oblasti bohaté na prolin. Předpokládají tedy, že mechanismus translokace bude podobný (Lill et al., 1992). Jiní se zase přiklání k přítomnosti pevně sbalené domény v ROP2, která zajistí umístění do vnější membrány mitochondrie (Eilers and Schatz, 1986; Rassow et al., 1990). Jako nejpravděpodobnější se jeví mechanismus přímé penetrace. Délka vystaveného proteinu zhruba odpovídá tloušťce lipidické dvojvrstvy (Sinai and Joiner, 2001).

Po průchodu parazita dovnitř hostitelské buňky, dochází k výlevu obsahu denzních granul, modifikaci intravakuolárního prostoru a vzniku sítě membránových tubulů tzv. intravakuolární sítě (IN) (Sibley et al., 1995). Denzní granula obsahují vysoce specifické proteiny, které se podílejí na vzniku IN (Mercier et al., 2002). GRA2 protein iniciuje vznik lamelárních váček na zadním konci buňky, čímž dochází k následnému rozšiřování tubulů do vakuolárního prostoru. GRA6 protein působí nejspíše jako stabilizátor tohoto procesu (Mercier et al., 2002). GRA4 spolu s GRA2 a GRA6 tvoří spojitý komplex, který přes dvě amfipatické domény interaguje s IN (Mercier et al., 1998). Spolu s GRA2 se objevuje i GRA1. Ten je však během 30-60 minut po výlevu z denzních granulí volně rozpustný a s intravakuolární sítí interaguje pouze okrajově (Sibley et al., 1995).

V PV *T. gondii* jsou čtyři tzv. trachyzoiti jsou uspořádáni do tvaru rozety. Toto uspořádání nejspíše udržuje vnitřní nanotubulární síť (Magno et al., 2005). Vakuola je členěna do tří částí. Za první lze považovat dlouhý a tenký výběžek PVM do cytosolu hostitele. Druhá část se sestává z hostitelských tubulárních struktur invaginovaných spolu s PVM do PV – tzv. HOSTs (host organelle sequestering tubulo structures). Tyto kanálky pravděpodobně slouží pro příjem (endolysosomů) cholesterolu a dalších živin z hostitelského cytosolu do PV. Jednu z hlavních rolí zde hraje protein GRA7 (Coppens et al., 2006). Poslední částí je síť

nanotubiček zasahujících až do lumenu vakuoly, tzv. membranous nanotubular network (MNN) či intravacuolar network (IN) (Magno et al., 2005). Této síti byla připisována role v transportu živin do parazita a produktů (nebo spíše metabolitů) z vakuoly ven (Mercier et al., 2002). Více pravděpodobnější teorie popisuje tuto síť jako dynamickou strukturu rozvíjející se během pobytu parazita v PV až do maximálního rozložení, kdy každá z dceřiných buněk je obalena tubulární sítí (Magno et al., 2005).

3.4 *Plasmodium falciparum*

K nákaze dochází při sání infikovaného komára rodu *Anopheles*. Se slinami se do krve hostitele dostávají tzv. sporozoiti. Ti migrují do jater, kde infikují jaterní buňky – hepatocyty. Zde dochází k velkému pomnožení a změně v další vývojové stádium-merozoity. Po uvolnění z hepatocytů paraziti migrují do erytrocytů. V rámci červených krvinek merozoiti dozrávají, pomnožují se a poté lyzují buňku a opouštějí ji. Buď dochází k reinfekci dalších erytrocytů, nebo se merozoiti diferencují v pohlavní stádia, která jsou následně nasáta přenašeči.

Parazit vstupuje do hepatocytu, následně z něj vylézá a toto opakuje několikrát, dokud nezakotví v cílové buňce (Mota et al., 2001). Většina hepatocytů tuto invazi přežívá, u některých však dochází ke zničení. Je dosti pravděpodobné, že samotný opakovaný průnik je nutný pro správný vývoj sporozoitac (Mota et al., 2002). O samotném průniku do jaterních buněk není bohužel moc známo. Zajímavé výsledky však přinesly pokusy na zástupci *Plasmodium berghei*. Každá buňka napadená intracelulárním parazitem se přirozeně brání spuštěním buněčné smrti. Testování různých spouštěčů apoptózy v časově odlišném působení prokázaly schopnost *P.berghei* manipulovat s dráhami spouštějící buněčnou smrt (van de Sand et al., 2005). V cytoplasmě a na povrchu plasmatické membrány hepatocytu byl lokalizován tzv. circumsporozoite protein (CS). Tento protein je transportován do cytoplasmy pomocí stejného signálu, který je využíván merozoity k exportu proteinů do erytrocytu a obsahuje NLS (nuclear localization signal) pro cílení do jádra hepatocytu (Singh et al., 2007). Pravděpodobná funkce CS je podpora růstu a vývoje *P. falciparum* v hepatocytu. Zároveň byla také prokázána jeho vysoká imunogenita. Sporozoit v hepatocytu roste do velkého schizonta, množí se a diferencuje do 10 000 až 40 000 merozoitů. Ti poté napadají červené krvinky (van de Sand et al., 2005).

Hlavním nástrojem merozoita jak uspět uvnitř červené krvinky, úspěšně růst a množit se, je schopnost exportovat přibližně 200-300 proteinů (což činí řádově 5% kódujícího genomu) do cytosolu hostitelské buňky (de Koning-Ward et al., 2009). Neinfikovaný běžný erythrocyt není schopen importovat rozpustné látky ani syntetizovat proteiny nebo lipidy. Avšak membrána napadeného erythrocytu se přibližně 12-15 hodin po invazi stává propustnou pro různé rozpustné substráty potřebné pro parazita. Další ze změn, ke které dochází, je vznik výčnělků na membráně erythrocytu, které obsahují hlavní virulentní agens - membránový protein PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (Baruch et al., 1995; Su et al., 1995).

Touto modifikací je způsobena adherence erythrocytů k cévnímu endotelu, čímž se parazit chrání před fagocytózou a splavením do sleziny. Další zajímavou vlastností je schopnost ovlivňovat expresi tohoto proteinu a tím měnit povrchové antigeny, čímž se vyhýbá detekci imunitním systémem. K variaci povrchových antigenů využívá *P. falciparum* i další nedávno objevené membránové proteiny – STEVOR (subtelomeric variable open reading frame), RIFIN (repetitive interspersed family) a SURFIN (Cheng et al., 1998; Winter et al., 2005). Spolu s proteinem PfEMP1 byl ve výčnělcích lokalizován ještě protein bohatý na histidin tzv. KAHRP (knob associated histidine-rich protein), který se váže k erythrocytárnímu cytoskeletu, zvyšuje rigiditu buňky a také odolnost proti proudění krve (Pei et al., 2007). Bylo dokázáno, že samotný PfEMP1 bez asociace s výběžky obsahujícími KAHRP, neposkytuje dostatečnou přilnavost, která by odolala průtoku krve (Crabb et al., 1997). V rámci erythrocytární cytoplasmy byly objeveny další dvě modifikace sloužící k přežití parazita. Jedná se o výběžky PVM do cytosolu pojmenované jako (i) tubulovesikulární síť- TVN (tubulovesicular network), která slouží pro sekreční procesy, ale také k získávání živin, a (ii) Maurerovi měchýřky (Atkinson et al., 1988; Lanzer et al., 2006). Obě tyto struktury pocházejí z PVM a podílejí se na třídění a transportu proteinů. Je tedy jasné, že export proteinů parazita vyvolává nejen změny ve struktuře hostitelské buňky, ale navozuje také vznik nových sekrečních drah. Transportní a elektrofyziologické vlastnosti těchto změn byly relativně prozkoumány, ale molekulární podstata stále čeká na objasnění.

Exportní proteiny určené do cytosolu erythrocytu či na jeho povrch musí překonat dvě membrány – plasmatickou membránu parazita a PVM. Mechanismus exportu přes tyto membrány není zcela objasněn, ale je jisté, že proteiny určené pro export musí vstoupit do sekreční dráhy (Wickham et al., 2001). To je zajištěno N-terminální hydrofobní signální sekvencí pro ER, která je dostačující pro transport do plasmatické membrány parazita a lumen

PV, ale již ne za PVM (Wickham et al., 2001). Pro další export za PVM či plasmatickou membránu erytrocytu je zapotřebí další sekvence. Na N-terminálním konci proteinů byla objevena sekvence pěti konzervovaných aminokyselin. V pozici jedna se nachází kladně nabitá hydrofobní aminokyselina (Arg, Lys), v pozici tři hydrofobní aminokyselina (Leu, Ile) a v pozici pět méně striktně konzervovaná aminokyselina (převážně Asp, Glu, Gln) (Marti et al., 2004). V pozicích dvě a čtyři je složení aminokyselin náhodné. Tento motiv, ve zkráceném zápisu R/KxLxE/Q/D, byl pojmenován PEXEL z anglického Plasmodium exported element (Marti et al., 2004) či VTS z vacuolar transport signal (Hiller et al., 2004). Umístění PEXEL motivu v rámci proteinu se v různých publikacích liší. Někteří autoři ji umísťují šedesát aminokyselin od signální sekvence (Marti et al., 2004; Hiller et al., 2004), jiní přibližně v rozmezí dvaceti až třiceti aminokyselin od signální sekvence (de Koning-Ward et al., 2009) PEXEL motiv je konzervován i v rámci dalších druhů (Sargeant et al., 2006; Hiller et al., 2004).

Dlouhou dobu bylo záhadou, jak proteiny procházejí přes PVM. Po objevu PEXEL motivu byla předpokládána přítomnost nějakého póru (Marti et al., 2004; Hiller et al., 2004). Translokace přes PVM vyžaduje energii a to ve formě ATP (Ansorge et al., 1996) a proteiny musejí být v nesbalené formě (Gehde et al., 2009). Teprve nedávno byl objeven translokon v membráně paraziforní vakuoly pro export proteinů, označen zkratkou PTEX z anglického Plasmodium translocon of exported proteins (de Koning-Ward et al., 2009). Prozatím bylo identifikováno pět částí tohoto komplexu: heat shock protein 101 (HSP101), PTEX150, EXP2, PTEX88 a TRX2 (de Koning-Ward et al., 2009). Dle modelu navrženým Haase & de Koning-Ward hlavní pór translokonu je tvořen EXP2, který asociuje s hexametrickou kruhovou strukturou tvořenou HSP101. Při rozeznání PEXEL motivu některými komponentami translokonu (blíže zatím nespecifikováno) je protein naveden na N-terminální část HSP101, kde je rozbalen. HSP101 plní tedy funkci chaperonu se schopností hydrolyzovat ATP. Protein je vtažen přes hexamerní kanál až do póru a transportován skrze PVM. TRX2 má pravděpodobně v tomto procesu regulační roli, zatímco funkce PTEX150 a PTEX88 je stále nepotvrzena. Vypadá to, že PTEX150 je pevně vázán k hexamernímu kanálu. PTEX88 spolu s TRX2 pravděpodobně slouží jako regulační podjednotky (de Koning-Ward et al., 2009; Crabb et al., 2010). Ty pravděpodobně slouží jako podpůrné nebo receptorové molekuly a/nebo přenášejí protein na HSP101 (de Koning-Ward et al., 2009).

Identifikace SP a PEXEL motivu výrazně usnadnila sestavení exportomu plasmodia. Většina genů pro předpokládané i známé exportované proteiny je uložena v subtelomerické

oblasti, kde se také nacházejí geny pro transformaci infikovaných erytrocytů (de Koning-Ward et al., 2009). Byly však nalezeny i proteiny které neobsahují PEXEL motivy (Marti et al., 2004), což ukazuje, že ne všechny proteiny lze přiřadit do předpokládaného exportu. Nejlépe popsané PEXEL-negativní proteiny (PNEP) v plasmodiu jsou například proteiny Maurerových váčků, SBP-1, MAHRP-1 a tzv. ring-exported proteiny 1 and 2 (REX1 and REX2) (Haase et al., 2009). PEXEL motiv je procesován asparagovou proteázou plasmepsinem V (Boddey et al., 2010) za konservovaným leucinem a nově vzniklý konec xE/Q/D je N-acetylován (Chang et al., 2008; Boddey et al., 2009). Vše probíhá v rámci ER parazita. Substituce aminokyselin v nově odhaleném konci polypeptidu prokázaly větší náchylnost transportu těchto proteinů do PV než přes PVM, což dokazuje, že samotné procesování není dostačující pro transport přes PVM (Boddey et al., 2009). Nabízí se však otázka, jak jsou v ER rozpoznány proteiny určené k sekreci přes PVM od proteinů určených do PV. Byly navrženy tři modely: (i) tzv. barcode, (ii) chaperonový a (iii) regionální model (Crabb et al., 2010). (i) navrhuje, že proteiny jsou dopraveny k membráně klasickou sekretorickou cestou endomembránového systému. Poté co protein dorazí k translokonu, je jeho nově odhalený acetylovaný motiv xE/Q/D rozpoznán některou ze složek PTEX a nesbalený protein je přenesen přes translokon do cytosolu hostitele. Základním problémem tohoto modelu je však otázka, jak dokáže translokon rozpoznat tak krátký motiv jako je xE/Q/D. (ii) štěpení motivu na N-konci je v úzké spolupráci s navázáním chaperonu či malé doposud neobjevené molekuly, na nově odhalený motiv. Tím je protein „označen“ a může být sekretován do PV. (iii) hned po štěpení jsou proteiny směřovány do těsné blízkosti membrány pod PTEX. Proteiny rozpoznané pro sekreci jsou pravděpodobně uloženy ve specifických váčcích a následně exportovány přes PTEX (Crabb et al., 2010).

4 Kinetoplastida

Jedná se o jednobuněčné obligátně parazitické prvoky se dvěma rody význačných lidských parazitů – *Trypanosoma* a *Leishmania*. Jednotlivými znaky této třídy je přítomnost velkého počtu vývojových stádií, formy s jedním bičíkem tvořících u některých zástupců undulující membránu a v neposlední řadě přítomnost modifikované mitochondriální DNA tzv. kinetoplastu, který dal název celé třídě.

Kapitola je zaměřena především na zástupce trypanosom – *Trypanosoma cruzi* (původce Chagasovy choroby) a na některé zajímavé mechanismy transportu proteinů u *Leishmania spp* (původce leishmaniózy).

4.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi má jeden z nejsložitějších životních cyklů. Prvoci jsou přenášeni plošticemi podčeledi Triatominae, které jsou nakaženy krevními stádií, konkrétně epimastigoty. Epimastigot migruje do střeva, kde adhezuje na stěnu. Tato adherence vypadá, že je nezbytná pro následnou přeměnu neinfekčního epimastigota na infekční stádium metacyklického trypomastigota. Metacykličtí trypomastigoti jsou přenášeny z vektora do hostitelského savce. Zde se nejprve vyskytují jako trypomastigoti v krevním oběhu hostitele a lze je definovat jako dvě formy- kulaté spheromastigoty a epimastigoty. Bezprostředně po vstupu do hostitele napadá trypomastigot nejbližší buňky, nejčastěji tedy makrofágy, fibroblasty a epitelové buňky v případě průniku přes kůži. Uvnitř napadené buňky tvoří vakuolu, ve které dochází k četným morfologickým změnám a přeměně na kulaté stádium s krátkým bičíkem – amastigota. Při této přeměně dochází k rozrušení vakuoly a uvolnění již amastigotních stádií do cytosolu hostitele.

První adheze a následní průnik parazita dovnitř buňky jsou zprostředkovány molekulami obsaženými jak na povrchu parazita, tak i na povrchu infikované hostitelské buňky. Nejčastěji se předpokládá model parazitárních ligandů a hostitelských receptorů (Magdesian et al., 2001). Povrch parazita se liší v závislosti na druhu, ale také stádium životního cyklu. Na povrchu trypomastigů jsou hlavními zprostředkovateli interakce glykoproteiny, většinou zakotvené pomocí GPI kotev v membráně. Většina z nich se řadí ke skupině gp85/trans-sialidáz. Jde především o gp85, gp82, TSA-1 proteiny a trans-sialidázu. Skupina je pojmenována po prvním objeveném proteinu gp85 o přibližné velikosti 85 kDa, který byl také označen Tc85 (Abuin et al., 1989). Tyto proteiny jsou schopny se vázat na různé receptory

např. na povrchový cytokeratin18 (Magdesian et al., 2001) či na složky extracelulární matrix např. fibronectin (Ouaisi et al., 1986).

Gp82 je produkován pouze na povrchu metacyklických trypomastigotů (Araya et al., 1994), u nichž tvoří hlavní povrchový protein a u kterého byla prokázána vysoká imunogenita (Teixeira and Yoshida, 1986). Gp82 je schopen vyvolat v buňce vápníkem zprostředkovanou signální kaskádu, do které jsou zapojeny také fosfolipáza C a IP3 (Favoreto S Jr et al., 1998). Gp82 také figuruje jako signální receptor pro protein tyrosinovou fosforylaci. Obě schopnosti manipulace se signálními kaskádami tvoří nezbytné kroky pro invazi do hostitelské buňky (Favoreto S Jr et al., 1998).

Trans-sialidáza je sekretována na povrch trypomastigotů, kde je zakotvena GPI kotvou. Na N-konci je lokalizováno její katalytické místo a C-konec obsahuje 12 aminokyselin dlouhou repetici (SAPA). Trans-sialidáza zprostředkovává import hostitelské kyseliny sialové do parazita, který ji není schopen syntetizovat (Previato et al., 1985). Při porovnání tryptomastigotů obsahujících trans-sialidázu (TS+) a postrádajících tento protein (TS-), bylo prokázáno, že populace TS+ je infekčnější (Pereira et al., 1996). Molekulární podstata významu tohoto procesu pro invazi parazita, nebyla doposud objasněna, přestože je zřejmé, že hraje klíčovou roli v patogenezi.

Jako další infekční agens, podílející se nejen na invazi, ale také do jisté míry na ochraně parazita, jsou různé proteasy. V endolysosomálním systému, ale také na povrchu epimastigotů, byla lokalizována lysosomální cysteinová protéza, pojmenovaná „cruzipain“ (Cazzulo et al., 1990). Tento enzym štěpí za nízkého pH (pH 5,0) a je schopen štěpit např. hemoglobin, bovinní serumalbumin či vysokomolekulární kininogen na krátké kininy, které se váží k receptoru bradykininu a spouštějí uvolnění vápníku přes IP3 (inositol trisphosphate) (Scharfstein et al., 2000). Z řad serinových proteáz byla určena Tc80 proteáza (prolyloligopeptidáza), která je důležitá při průniku parazita extracelulární matrix, neboť bylo zjištěno, že hydrolyzuje lidský fibronectin a kolageny typu I a IV (Santana et al., 1997). V cytosolu tryptomastigotů byla lokalizována serin-endopeptidáza pojmenovaná oligopeptidáza B a pravděpodobně se podílí na přechodném zvyšování koncentrace vápníku (Burleigh et al., 1997).

K samotnému průniku do hostitelské buňky využívá parazit několik mechanismů. Mezi základní a nejčastěji používanou cestu patří fagocytóza (Vieira et al., 2002). Mimo ni parazit vstupuje do hostitele také pomocí endocytózy či invaginací plasmatické membrány (Schenkman and Mortara, 1992). U nefagocytujících buněk parazit využívá splývání

s lysozomem či invaginací plasmatické membrány pomocí nahromaděného PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate), následně však váčky obsahující parazita také splývají s lysozomy. Fúze s lysozomy je nezbytná pro udržení parazita uvnitř hostitele, ale také pro jeho vývoj (Andrade and Andrews, 2004).

Se všemi těmito procesy pravděpodobně souvisí dočasné zvýšení koncentrace vápníku, jak v hostitelské tak i parazitní buňce při jejich první interakci (Wilkowsky et al., 1996). Pokud byl nárůst hladiny vápníků pokusně blokován (tapsigarginem), došlo ke snížení schopnosti invaze. Tento dočasný nárůst je připisován reorganizaci aktiniových vláken (Rodriguez et al., 1995), kdy depolarizace aktinu v parazitární buňce vede ke zvýšení schopnosti invaze (Low et al., 1992). Jedna z předpokládaných možností průniku parazita, pravděpodobně přímo přes plasmatickou membránu je umožněna aktinem (Woolsey and Burleigh, 2004). Při vstupu parazita do buňky je aktivována signální kaskáda přes tyrosinkinázy (Vieira et al., 1994). Tento proces byl zatím prokázán pouze u klasických fagocytujících buněk.

Ať je samotný mechanismus vstupu do parazita jakýkoli, je jisté, že parazit je po vstupu do buňky zabalen do parazitoformní vakuoly, podobně jako většina intracelulárních parazitů. Přeměna promastigota v amastigota je doprovázena rozpadem membrány PV. Amastigot je uvolněn do cytosolu hostitele, kde se začíná dělit. Tento proces je nejčastěji označován jako lýze parazitoformní vakuoly a únik parazita do cytosolu. Trypomastigot uvolňuje do vakuoly trans-sialidázu, která odstraňuje zbytky kyseliny sialové z povrchu membrány, čímž se stává citlivější k působení tzv. Tc-TOX (homolog faktoru 9 lidského komplementu) (Andrews and Whitlow, 1989). Působením TcTOX dochází ke vzniku pórů v membráně PV jejímu a následnému rozpadu (Andrews et al., 1990). Tuto teorii podporují i pokusy na CHO (Glycosylation mutants of Chinese hamster cells) buňkách, u kterých byla dokázána vyšší citlivost k lýzi při nepřítomnosti sialových zbytků (Ciavaglia et al., 1993).

4.2 *Leishmania*

Přenašeči leishmanií jsou flebotomové, v jejichž trávicím traktu se vyvíjejí tzv. metacykličtí promastigoti. Jedná se o bičíkaté infekční stádium, které se při sání přenašeče dostává do těla, kde je fagocytováno hostitelskými makrofágy. Rychle se diferencuje v bezbičíkatou intracelulární formu – amastigota. Při pohlcení makrofágy je parazit uzavřen ve fagozomu, který splývá spolu s hostitelským lysozomem a vzniká tzv. fagolysozom, obdoba parazitoformní vakuoly. V rámci fagolysozomu se parazit

pomnožuje binárním dělením a poté je schopen rozšiřovat se do dalších buněk. Napadá především další makrofágy a jiné fagocytující buňky nebo tzv. neprofesionální fagocytující buňky jako jsou např. dendritické buňky či fibroblasty (Kima, 2007a). O výběru napadené tkáně je rozhodováno v závislosti na druhu *Leishmania spp.* Druhy leishmanií lze dělit pouze na základě molekulárně biologické detekce, poněvadž morfologicky jsou těžko odlišitelné.

Na druhu závisí i odlišná struktura fagolysozomu. Skupina *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* and *L. pifanoi*) se vyvíjí v jedné velké společné vakuole, kterou rozšiřují někdy až do zaplnění celé buňky. Naproti tomu skupina *Leishmania donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* and *L. chagasi*) tvoří jednotlivé vakuoly pro vznikající dceřiné buňky (Kima, 2007a).

Schopny infikovat hostitele jsou obě stádia, jak promastigoti, tak i amastigoti (Kima, 2007b). Za jednu z hlavních agens infekce u promastigotů je považován jeho glykokalyx, tvořený vysoce glykosylovanými lipidy zakotvenými v membráně GPI kotvou tzv. lipofosfoglykany (LPG). Četnost výskytu GPI v membráně parazita, ať již volných či vázaných proteiny, je dosti netypické (Denny et al., 2000). Dlouhá fosfoglykanová kostra makromolekuly, upevněná v membráně, je vysoce polymorfní a liší se dle druhu a vývojového stádia. Glykokalyx je nezbytný jak pro infekci přenašeče, tak také v rámci napadeného hostitele. LPG slouží pravděpodobně jako ligandy ve střevě flebotoma, ale také pro receptory makrofága. Navíc v hostiteli může sloužit jako ochrana před kaskádou komplementu a extracelulárními hydrolázami. Pod vrstvou glykokalyxu se nacházejí další proteiny vázané GPI a proteofosfoglykany (PPGs). PPG spolu s chitinázami ovlivňují přenašeče při sání a usnadňují přenos parazita do hostitele (Rogers et al., 2008).

Povrch amastigota obsahuje minimální množství povrchových proteinů, čímž je naprosto ojedinělý v rámci Trypanosomatidae. Nebyly nalezeny žádné proteiny ani jiné makromolekuly kotvené do membrány. Membrána však vykazuje vysoký obsah volných GPI a přítomnost glykosfingolipidů původem z hostitele. To nejspíše svědčí o důmyslné obraně před proteolýzou. Nepřítomnost vlastních proteinů na povrchu parazita lze považovat na druh úniku před imunitním systémem.

Při pohlcování promastigota makrofágem, byla prokázána role opsonizace (usnadnění fagocytózy navázáním specifické látky na antigen). První interakce s makrofágem je zprostředkována pomocí Fc receptorů a komplementu (Guy and Belosevic, 1993; Kima et al., 2000). Vede k uvolňování protizánětlivých látek z makrofága jako např. IL-10 (Kane and

Mosser, 2001). Navíc u různých druhů bylo prokázáno i zapojení Rab1, který je nezbytný pro fagocytózu zprostředkovanou Fc receptory.

Další ze složek, které hrají významnou roli při interakci parazita a makrofágy, jsou fosfatidylseriny (PS). Nejspíše podle různé density vystavených PS na povrchu parazita, donutí hostitele přes vazbu na PS receptory obsažené na makrofázích, vylučovat různé látky – např. protizánětlivé IL-10 či TGF β (Fadok et al., 2000). Bližší manipulace s fagocytujícími buňkami není plně známa, ale je jisté, že parazit modifikuje a nutí hostitelské buňky k sekreci různých látek. Vše je založeno na interakci odlišných ligandů a receptorů.

V rámci makrofága je parazit uložen ve zralých fagolysosomech, kde odolává kyselému prostředí i útoku lysozomálních enzymů. Pro manipulaci s odpovědí imunitního systému hostitele si vyvinuly cysteinové nebo metaloproteázy (Santarem et al., 2007). Amastigoti sekretují také nukleázu, která jim zajišťuje přísun purinů z hostitelských nukleových kyselin (Joshi and Dwyer, 2007). Do cytoplazmy sekretované proteiny pak slouží jako manipulace se signálními dráhami hostitele. Vylučované chitinázy zvyšují virulenci v makrofágách a při kožních leishmaniózách (Joshi et al., 2005).

Pro povrchovou metaloproteázu Gp63 (glycoprotein 63) nebyla přesná funkce zatím objasněna. Byly nalezeny dvě formy tohoto proteinu, jedna forma je přímo vylučována vně parazita, druhá je kotvena k povrchu GPI kotvou, kde může dojít k jejímu následnému odštěpení (Ellis et al., 2002; McGwire et al., 2002). Možnou funkcí Gp63 v přenašečích je ochrana a získávání živin (Kulkarni et al., 2006a; Santos et al., 2006).

Trypanosomatida obecně využívají k sekreci proteinů klasické sekretorické cesty zahrnující ER, GA a pravděpodobně i transport pomocí váčků z GA. Povrchové proteiny, jako např. Gp63 amastigotů, obsahují klasickou signální sekvenci, díky níž vstupují do sekreční dráhy (Kulkarni et al., 2006b). Na druhé straně pro proteiny uvolňované ven parazita zapojení do klasické sekreční dráhy zatím potvrzeno nebylo. Navíc byly identifikovány proteiny bez signální sekvence, které se nezapojují do klasické sekretonické dráhy a stejně jsou vylučovány. Jedná se například o růstové faktory, cytokiny a další molekuly s důležitou signalizační funkcí (Prudovsky et al., 2008). Tato cesta či způsob exprese proteinů byla pojmenován jako „nonclassical secretion“ (volně přeloženo jako atypická sekrece) a byla již popsána i u jiných eukaryot. U Trypanosomatidae byl podrobně popsán pouze jeden protein procházející touto cestou a to hydrofilní acylovaný povrchový protein *L.major* - HASPs (hydrophilic acylated surface protein B). Tento protein postrádá signální sekvenci, GPI kotvu i membránovou doménu, ale přesto je cílen na povrch (Pimenta et al., 1994). Na N-konci

HASP byla lokalizována doména obsahující palmitoylaci a myristylaci pro než je nezbytná přítomnost glycinu v pozici 2 a cysteinu v pozici 5. Prvních 18 aminokyselin z N-konce je dostačujících pro cílení proteinu k plasmatické membráně, neboli N-myristilace/palmitoylace je dostačující k cílení k membráně (Morales et al., 1998). Mutace v palmitoylaci vedla k nahromadění proteinu v organele, která byla barvitelná barvivem specifickým pro GA, což by naznačovala spojitost s exocytickou cestou transportu (Bijlmakers et al., 1997). Navíc tato část proteinu je dosti podobná SH4 doménám, které se jako součásti SRC proteinů účastní řady signalizačních a regulačních kaskád (Tournaviti et al., 2009a). SH4 doména u SRC proteinů zajišťuje jejich kotvení do membrány, což je určeno jejich posttranskripční lipidovou modifikací. K SH4 doméně jsou připojeny zbytky myristátu a palmitátu, přičemž oba jsou nezbytné pro zakotvení do membrány. Bylo prokázáno, že myristylace probíhá nejspíše kotranslačně v perinukleárním prostoru. Zde by také mohlo probíhat vložení do intracelulární či endosomální membrány. Odstranění palmitoylu způsobilo hromadění proteinu v perinukleárním prostoru, kde bylo detekováno látkami specificky vázajícími GA. Na základě zjištění, že SH4 doména je v pozici 6 fosforylována na treoninu, byla publikována teorie, že SH4 protein kyvadlově migruje mezi perinukleárním prostorem a GA. Celý proces je zřejmě řízen fosforylací a defosforylací (Tournaviti et al., 2009b) a také pomocí dvou proteinů – kaspázy 1 a GRASP (Golgi reassembly stacking protein).

5 *Giardia intestinalis*

Tento jednobuněčný eukaryotický parazit z říše protist se dle společných znaků řadí do skupiny Excavata a kmene Fornicata. Pro Excavata je klasická přítomnost břišní rýhy a s ní asociovaného cytoskeletu. *Giardia* je zástupcem řádu Diplomonadida, pro které je typický zdvojený karyomastigont a přítomnost vysoce redukovaných mitochondrií tzv. mitosomů. *G. intestinalis* je původcem lidské giardiózy, v rámci životního cyklu lze vysledovat dvě základní stádia. Infekční cysty a tzv. trofozoity. K nákaze dochází při požití cyst, které excystují v trávicím traktu hostitele a vzniklí trofozoiti se usazují v tenkém střevě. Pomocí speciálně vyvinutého orgánu tzv. přísavného disku žijí přichyceni na endotelu střeva. Zde se pomnožují a způsobují hlavní symptomy nemoci. Z těla spolu se stolicí odcházejí cysty, které slouží k napadání dalších hostitelů.

Při snaze určit rodové či druhové dělení giardií bylo popsáno mnoho druhů, někteří autoři totiž předpokládali specifický druh pro každého hostitele. Až s postupem času a modernizací přístupů se ukázalo, že toto členění je zavádějící. Ani dodnes však není dělení zcela ukončeno. Zástupci parazitující u člověka, lze je rozdělit do dvou až tří základních skupin, které lze považovat za odlišné genotypy, ale spíše se ujal pojmenování asambláž. Lidské giardie se dělí na hlavní asambláže A a B. Někdy se však ještě asambláž A dělí na A1 a A2 s procentuálními rozdíly v genotypch (Homan et al., 1992).

Při průběhu nákazy, která neléčená může trvat i měsíce, bylo pozorováno určité selhání zásahu imunitního systému. Příčinou může být schopnost *G. intestinalis* unikat imunitnímu systému pomocí obměny proteinů vystavených po celém povrchu parazita. Jedná se o tzv. VSP – variant-specific surface proteiny, které jsou hlavními antigeny pro rozpoznání imunitním systémem hostitele. V genomu *G. intestinalis* bylo nalezeno přibližně 190 variant, ale vždy pouze jeden protein je exprimován na povrchu trofozoita (Nash et al., 1988; Adam et al., 1988; Morrison et al., 2007). Občasná přítomnost dvou proteinů je vysvětlována jako přechodná forma při výměně povrchové struktury, která je podstatou antigenní variability *G. intestinalis* (Nash et al., 2001a).

VSP byly identifikovány jako proteiny bohaté na cystein s často se vyskytujícím motivem CxxC (Nash et al., 2001b; Nash, 1997). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 30-200kDa. Na N-konci byl objeven 14-17 aminokyselin dlouhý signální peptid, který pravděpodobně cílí VSP na povrch parazita (Lujan et al., 1995; Nash, 1997). C-konec, zakončený motivem CRGKA, pravděpodobně zůstává zapuštěn v cytoplasmě. V membráně je protein pravděpodobně zakotven pomocí hydrofobní domény proteinu, která se nachází

vedle motivu CRGKA (Mowatt et al., 1991). Zatímco C-koncová část proteinu je společná pro jednotlivé VSP, části exponovaná do prostředí se významně liší zastoupení repetice v jednotlivých proteinech VSP (Yang and Adam, 1994).

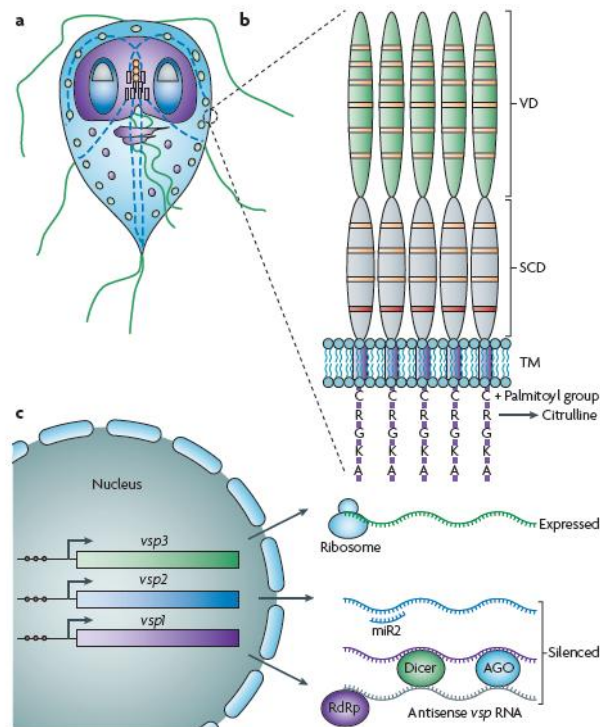
G.intestinalis svůj povrchový protein, který je vystaven po celém povrchu včetně bičičků, obměňuje každých 6 až 13 generací (Nash et al., 1990). Molekulární mechanismus tohoto přepínání však nebyl doposud objasněn. Z genomu *G.intestinalis* lze vyvodit, že i geny pro VSP, stejně jako většina ostatních genů, neobsahují žádné introny a 5' nepředkládané konce příslušných mRNA jsou velmi krátké a neobsahují žádné konzervované sekvence. Pouze na 3' konci byl v nepřekládané oblasti mRNA objeven vysoce konzervovaný motiv o neznámé funkci (Yang and Adam, 1994).

G.intestinalis přepisuje hromadně všechny své geny pro VSP, avšak mRNA odpovídající přepisované DNA (sense mRNA) byla nalezena jen pro protein exprimovaný na povrchu parazita. Navíc byly nalezeny fragmenty či části přepisovaných mRNA. Jedno z možných vysvětlení pozorovaných výsledků je degradace pomocí posttranskripčního umlčování genů – PTGS (post-transcriptional gene silencing) (Prucca et al., 2008). Posttranskripční umlčování genů nebo také RNA interference je založena na rozeznání a interakci umlčovaného genu s dvoušroubovicovou molekulou RNA (dsRNA), která je ke genu komplementární (Fire et al., 1998; Fagard et al., 2000). Následné posttranskripční štěpení RNA-dependentní RNásoou DICER na 21-25 nukleotidů dlouhé tzv. siRNA, znemožní translaci a vznik produktu (Bernstein et al., 2001). Tyto krátké molekuly RNA, označované siRNA, jsou vtaženy do komplexu RISC (RNA induced silencing komplex), kde slouží podobně jako předloha pro rozeznání dalších produktů umlčovaného genu (Obr.2) (Hammond et al., 2000). Tento komplex je aktivován vazbou ATP (Nykanen et al., 2001).

U *G.intestinalis* byl identifikován homologii gen pro RdRP. Produktem je 155,257 Da velký protein sdílející z většiny homologii s eukaryotickými RdRP. Analýza sekvence prokázala, že součástí tohoto proteinu je ribosomal protein S2 signature-1 motif, která se pravděpodobně podílí na vazbě mRNA (Green-Willms et al., 1998). Protein ale postrádá signální peptid i transmembránovou doménu. (Prucca et al., 2008). Využitím označení HA-tagem byl RdRP určen, že asociuje s ribozomy na cytosolické straně endoplasmatického retikula (Prucca et al., 2008).

Dicer složka byla v *G. intestinalis* prokázána již dříve (Macrae et al., 2006). Byla však upřesněna jeho lokalizace v cytoplasmě a také fakt, že je aktivní v průběhu celého životního cyklu *G.intestinalis*. Experimentálním uspáním exprese genu pro dicer se autorům podařilo

uvolnit regulaci exprese různých VSP a na povrchu takto upravených giardií se objevily různé povrchové antigeny (Prucca et al., 2008). Získaný kmen navíc posloužil k vytvoření účinné anti-giardiové vakcíny.



Arnkaev et al. 2010

(Obr.2) Antigenní variace u *G.intestinalis*: a, trofozoit b, VSP: CXXC motiv (oranžově), GGKY motiv (červeně), VD- variabilní doména – nejčastěji obměňovaná část VSP c, post-transkripční úprava RNA interferencí

6 Závěr

Tato práce je základním shrnutím dosavadních poznatků o schopnosti využití, manipulace a modifikace proteinových drah u vybraných parazitů. Pojednává o vybraných buněčných procesech u *T. gondii*, *P. falciparum*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp. a *G.intestinalis* se zaměřením na procesy nezbytné pro infekci a přežití parazita. Přes veškeré pokroky moderní technologie a bližšího určení jednotlivých proteinů, v některých případech i dílčích procesů, jsou molekulární mechanismy stále nejasné.

Navzdory odlišnostem mezi druhy či rody, může odhalení a pochopení nástrojů a podstaty původu patogenity vést k obecně platným teoriím s širokým využitím. V neposlední řadě k vyvinutí účinných vakcín a léků proti velmi závažným parazitárním chorobám.

7 Seznam použité literatury

Abuin,G., Colli,W., de,S.W., and Alves,M.J. (1989). A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 229-237.

Adam,R.D., Aggarwal,A., Lal,A.A., de La Cruz,V.F., McCutchan,T., and Nash,T.E. (1988). Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J. Exp. Med.* 167, 109-118.

Adl,S.M., Leander,B.S., Simpson,A.G., Archibald,J.M., Anderson,O.R., Bass,D., Bowser,S.S., Brugerolle,G., Farmer,M.A., Karpov,S., Kolisko,M., Lane,C.E., Lodge,D.J., Mann,D.G., Meisterfeld,R., Mendoza,L., Moestrup,O., Mozley-Standridge,S.E., Smirnov,A.V., and Spiegel,F. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* 56, 684-689.

Alexander,D.L., Mital,J., Ward,G.E., Bradley,P., and Boothroyd,J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17.

Andrade,L.O. and Andrews,N.W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J. Exp. Med.* 200, 1135-1143.

Andrews,N.W., Abrams,C.K., Slatin,S.L., and Griffiths,G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61, 1277-1287.

Andrews,N.W. and Whitlow,M.B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 249-256.

Ansorge,I., Benting,J., Bhakdi,S., and Lingelbach,K. (1996). Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem. J.* 315 (Pt 1), 307-314.

Araya,J.E., Cano,M.I., Yoshida,N., and da Silveira,J.F. (1994). Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 161-169.

Atkinson,C.T., Aikawa,M., Perry,G., Fujino,T., Bennett,V., Davidson,E.A., and Howard,R.J. (1988). Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 45, 192-199.

Baruch,D.I., Pasloske,B.L., Singh,H.B., Bi,X., Ma,X.C., Feldman,M., Taraschi,T.F., and Howard,R.J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82, 77-87.

Beckers,C.J., Dubremetz,J.F., Mercereau-Puijalon,O., and Joiner,K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 127, 947-961.

- Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bijlmakers,M.J., Isobe-Nakamura,M., Ruddock,L.J., and Marsh,M. (1997). Intrinsic signals in the unique domain target p56(lck) to the plasma membrane independently of CD4. *J. Cell Biol.* 137, 1029-1040.
- Boddey,J.A., Hodder,A.N., Gunther,S., Gilson,P.R., Patsiouras,H., Kapp,E.A., Pearce,J.A., de Koning-Ward,T.F., Simpson,R.J., Crabb,B.S., and Cowman,A.F. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature* 463, 627-631.
- Boddey,J.A., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Cowman,A.F. (2009). Role of the Plasmodium export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic.* 10, 285-299.
- Bradley,P.J., Li,N., and Boothroyd,J.C. (2004). A GFP-based motif-trap reveals a novel mechanism of targeting for the Toxoplasma ROP4 protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 111-120.
- Burleigh,B.A., Caler,E.V., Webster,P., and Andrews,N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 136, 609-620.
- Carruthers,V. and Boothroyd,J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 83-89.
- Cazzulo,J.J., Cazzulo Franke,M.C., Martinez,J., and Franke de Cazzulo,B.M. (1990). Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi. *Biochim. Biophys. Acta* 1037, 186-191.
- Chang,H.H., Falick,A.M., Carlton,P.M., Sedat,J.W., DeRisi,J.L., and Marletta,M.A. (2008). N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 107-115.
- Cheng,Q., Cloonan,N., Fischer,K., Thompson,J., Waine,G., Lanzer,M., and Saul,A. (1998). stevor and rif are Plasmodium falciparum multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 161-176.
- Ciavaglia,M.C., de Carvalho,T.U., and de,S.W. (1993). Interaction of Trypanosoma cruzi with cells with altered glycosylation patterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 718-721.
- Coppens,I., Dunn,J.D., Romano,J.D., Pypaert,M., Zhang,H., Boothroyd,J.C., and Joiner,K.A. (2006). Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261-274.
- Crabb,B.S., Cooke,B.M., Reeder,J.C., Waller,R.F., Caruana,S.R., Davern,K.M., Wickham,M.E., Brown,G.V., Coppel,R.L., and Cowman,A.F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 89, 287-296.

- Crabb,B.S., de Koning-Ward,T.F., and Gilson,P.R. (2010). Protein export in Plasmodium parasites: from the endoplasmic reticulum to the vacuolar export machine. *Int. J. Parasitol.* *40*, 509-513.
- de Koning-Ward,T.F., Gilson,P.R., Boddey,J.A., Rug,M., Smith,B.J., Papenfuss,A.T., Sanders,P.R., Lundie,R.J., Maier,A.G., Cowman,A.F., and Crabb,B.S. (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* *459*, 945-949.
- Denny,P.W., Gokool,S., Russell,D.G., Field,M.C., and Smith,D.F. (2000). Acylation-dependent protein export in Leishmania. *J. Biol. Chem.* *275*, 11017-11025.
- Eilers,M. and Schatz,G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* *322*, 228-232.
- El,H.H., Demey,E., Poncet,J., Lebrun,M., Wu,B., Galeotti,N., Fourmaux,M.N., Mercereau-Puijalon,O., Vial,H., Labesse,G., and Dubremetz,J.F. (2006). The ROP2 family of Toxoplasma gondii rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics.* *6*, 5773-5784.
- Ellis,K.E., Clough,B., Saldanha,J.W., and Wilson,R.J. (2001). Nifs and Sufs in malaria. *Mol. Microbiol.* *41*, 973-981.
- Ellis,M., Sharma,D.K., Hilley,J.D., Coombs,G.H., and Mottram,J.C. (2002). Processing and trafficking of Leishmania mexicana GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring. *J. Biol. Chem.* *277*, 27968-27974.
- Fadok,V.A., Bratton,D.L., Rose,D.M., Pearson,A., Ezekewitz,R.A., and Henson,P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85-90.
- Fagard,M., Boutet,S., Morel,J.B., Bellini,C., and Vaucheret,H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 11650-11654.
- Favoreto S Jr, Dorta,M.L., and Yoshida,N. (1998). Trypanosoma cruzi 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp. Parasitol.* *89*, 188-194.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* *391*, 806-811.
- Funes,S., Davidson,E., Reyes-Prieto,A., Magallon,S., Herion,P., King,M.P., and Gonzalez-Halphen,D. (2002). A green algal apicoplast ancestor. *Science* *298*, 2155.
- Gaskins,E., Gilk,S., DeVore,N., Mann,T., Ward,G., and Beckers,C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in Toxoplasma gondii. *J. Cell Biol.* *165*, 383-393.
- Gehde,N., Hinrichs,C., Montilla,I., Charpian,S., Lingelbach,K., and Przyborski,J.M. (2009). Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of Plasmodium falciparum. *Mol. Microbiol.* *71*, 613-628.

Green-Willms,N.S., Fox,T.D., and Costanzo,M.C. (1998). Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol. Cell Biol.* *18*, 1826-1834.

Guy,R.A. and Belosevic,M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into macrophages. *Infect. Immun.* *61*, 1553-1558.

Haase,S., Herrmann,S., Gruring,C., Heiber,A., Jansen,P.W., Langer,C., Treeck,M., Cabrera,A., Bruns,C., Struck,N.S., Kono,M., Engelberg,K., Ruch,U., Stunnenberg,H.G., Gilberger,T.W., and Spielmann,T. (2009). Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts protein REX2. *Mol. Microbiol.* *71*, 1003-1017.

Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* *404*, 293-296.

Hiller,N.L., Bhattacharjee,S., van,O.C., Liolios,K., Harrison,T., Lopez-Estrano,C., and Haldar,K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* *306*, 1934-1937.

Homan,W.L., van Enckevort,F.H., Limper,L., van Eys,G.J., Schoone,G.J., Kasprzak,W., Majewska,A.C., and van,K.F. (1992). Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol. Res.* *78*, 316-323.

Joshi,M.B. and Dwyer,D.M. (2007). Molecular and functional analyses of a novel class I secretory nuclease from the human pathogen, *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* *282*, 10079-10095.

Joshi,M.B., Rogers,M.E., Shakarian,A.M., Yamage,M., Al-Harhi,S.A., Bates,P.A., and Dwyer,D.M. (2005). Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of *LmexCht1*: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* *280*, 3847-3861.

Kalanon,M., Tonkin,C.J., and McFadden,G.I. (2009). Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* *8*, 1146-1154.

Kane,M.M. and Mosser,D.M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* *166*, 1141-1147.

Karnataki,A., Derocher,A., Coppens,I., Nash,C., Feagin,J.E., and Parsons,M. (2007). Cell cycle-regulated vesicular trafficking of *Toxoplasma* APT1, a protein localized to multiple apicoplast membranes. *Mol. Microbiol.* *63*, 1653-1668.

Kima,P.E. (2007a). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* *37*, 1087-1096.

Kima,P.E. (2007b). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* *37*, 1087-1096.

Kima,P.E., Constant,S.L., Hannum,L., Colmenares,M., Lee,K.S., Haberman,A.M., Shlomchik,M.J., and McMahon-Pratt,D. (2000). Internalization of *Leishmania mexicana*

complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* *191*, 1063-1068.

Kulkarni,M.M., McMaster,W.R., Kamysz,E., Kamysz,W., Engman,D.M., and McGwire,B.S. (2006a). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.* *62*, 1484-1497.

Kulkarni,M.M., McMaster,W.R., Kamysz,E., Kamysz,W., Engman,D.M., and McGwire,B.S. (2006b). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.* *62*, 1484-1497.

Lanzer,M., Wickert,H., Krohne,G., Vincensini,L., and Braun,B.C. (2006). Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* *36*, 23-36.

Lekutis,C., Ferguson,D.J., Grigg,M.E., Camps,M., and Boothroyd,J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* *31*, 1285-1292.

Lill,R., Stuart,R.A., Drygas,M.E., Nargang,F.E., and Neupert,W. (1992). Import of cytochrome c heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space. *EMBO J.* *11*, 449-456.

Low,H.P., Paulin,J.J., and Keith,C.H. (1992). *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. *J. Protozool.* *39*, 463-470.

Lujan,H.D., Mowatt,M.R., Wu,J.J., Lu,Y., Lees,A., Chance,M.R., and Nash,T.E. (1995). Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* *270*, 13807-13813.

Macrae,I.J., Zhou,K., Li,F., Repic,A., Brooks,A.N., Cande,W.Z., Adams,P.D., and Doudna,J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195-198.

Magdesian,M.H., Giordano,R., Ulrich,H., Juliano,M.A., Juliano,L., Schumacher,R.I., Colli,W., and Alves,M.J. (2001). Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 19382-19389.

Magno,R.C., Lemgruber,L., Vommaro,R.C., De,S.W., and Attias,M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* *67*, 45-52.

Marti,M., Good,R.T., Rug,M., Knuepfer,E., and Cowman,A.F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* *306*, 1930-1933.

Martin,W. and Herrmann,R.G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* *118*, 9-17.

McFadden,G.I. and van Dooren,G.G. (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol.* *14*, R514-R516.

- McGwire,B.S., O'Connell,W.A., Chang,K.P., and Engman,D.M. (2002). Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J. Biol. Chem.* *277*, 8802-8809.
- Mercier,C., Dubremetz,J.F., Rauscher,B., Lecordier,L., Sibley,L.D., and Cesbron-Delauw,M.F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2397-2409.
- Mercier,C., Howe,D.K., Mordue,D., Lingnau,M., and Sibley,L.D. (1998). Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.* *66*, 4176-4182.
- Morales,J., Fishburn,C.S., Wilson,P.T., and Bourne,H.R. (1998). Plasma membrane localization of G alpha z requires two signals. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1-14.
- Morrison,H.G., McArthur,A.G., Gillin,F.D., Aley,S.B., Adam,R.D., Olsen,G.J., Best,A.A., Cande,W.Z., Chen,F., Cipriano,M.J., Davids,B.J., Dawson,S.C., Elmendorf,H.G., Hehl,A.B., Holder,M.E., Huse,S.M., Kim,U.U., Lasek-Nesselquist,E., Manning,G., Nigam,A., Nixon,J.E., Palm,D., Passamaneck,N.E., Prabhu,A., Reich,C.I., Reiner,D.S., Samuelson,J., Svard,S.G., and Sogin,M.L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* *317*, 1921-1926.
- Mota,M.M., Hafalla,J.C., and Rodriguez,A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat. Med.* *8*, 1318-1322.
- Mota,M.M., Pradel,G., Vanderberg,J.P., Hafalla,J.C., Frevort,U., Nussenzweig,R.S., Nussenzweig,V., and Rodriguez,A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* *291*, 141-144.
- Mowatt,M.R., Aggarwal,A., and Nash,T.E. (1991). Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *49*, 215-227.
- Mullin,K.A., Lim,L., Ralph,S.A., Spurck,T.P., Handman,E., and McFadden,G.I. (2006). Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 9572-9577.
- Nagel,S.D. and Boothroyd,J.C. (1989). The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* *264*, 5569-5574.
- Nash,T.E. (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *352*, 1369-1375.
- Nash,T.E., Aggarwal,A., Adam,R.D., Conrad,J.T., and Merritt,J.W., Jr. (1988). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* *141*, 636-641.
- Nash,T.E., Banks,S.M., Alling,D.W., Merritt,J.W., Jr., and Conrad,J.T. (1990). Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* *71*, 415-421.
- Nash,T.E., Lujan,H.T., Mowatt,M.R., and Conrad,J.T. (2001a). Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* *69*, 1922-1923.

- Nash,T.E., Lujan,H.T., Mowatt,M.R., and Conrad,J.T. (2001b). Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* *69*, 1922-1923.
- Neupert,W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 863-917.
- Nykanen,A., Haley,B., and Zamore,P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* *107*, 309-321.
- Obornik,M., Janouskovec,J., Chrudimsky,T., and Lukes,J. (2009). Evolution of the apicoplast and its hosts: from heterotrophy to autotrophy and back again. *Int. J. Parasitol.* *39*, 1-12.
- Obornik,M., Vancova,M., Lai,D.H., Janouskovec,J., Keeling,P.J., and Lukes,J. (2011). Morphology and ultrastructure of multiple life cycle stages of the photosynthetic relative of apicomplexa, *Chromera velia*. *Protist.* *162*, 115-130.
- Ouaissi,M.A., Cornette,J., Afchain,D., Capron,A., Gras-Masse,H., and Tartar,A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* *234*, 603-607.
- Parsons,M., Karnataki,A., Feagin,J.E., and DeRocher,A. (2007). Protein trafficking to the apicoplast: deciphering the apicomplexan solution to secondary endosymbiosis. *Eukaryot. Cell* *6*, 1081-1088.
- Pei,X., Guo,X., Coppel,R., Mohandas,N., and An,X. (2007). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) destabilizes erythrocyte membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* *282*, 26754-26758.
- Pereira,M.E., Zhang,K., Gong,Y., Herrera,E.M., and Ming,M. (1996). Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect. Immun.* *64*, 3884-3892.
- Pimenta,P.F., Pinto da,S.P., Rangarajan,D., Smith,D.F., and Sacks,D.L. (1994). *Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. *Exp. Parasitol.* *79*, 468-479.
- Previato,J.O., Andrade,A.F., Pessolani,M.C., and Mendonca-Previato,L. (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* *16*, 85-96.
- Prucca,C.G., Slavin,I., Quiroga,R., Elias,E.V., Rivero,F.D., Saura,A., Carranza,P.G., and Lujan,H.D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* *456*, 750-754.
- Prudovsky,I., Tarantini,F., Landriscina,M., Neivandt,D., Soldi,R., Kirov,A., Small,D., Kathir,K.M., Rajalingam,D., and Kumar,T.K. (2008). Secretion without Golgi. *J. Cell Biochem.* *103*, 1327-1343.
- Rassow,J., Hartl,F.U., Guiard,B., Pfanner,N., and Neupert,W. (1990). Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.* *275*, 190-194.
- Ravindran,S. and Boothroyd,J.C. (2008). Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic.* *9*, 647-656.

- Robibaro,B., Stedman,T.T., Coppens,I., Ngo,H.M., Pypaert,M., Bivona,T., Nam,H.W., and Joiner,K.A. (2002). Toxoplasma gondii Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell Microbiol.* 4, 139-152.
- Rodriguez,A., Rioult,M.G., Ora,A., and Andrews,N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* 129, 1263-1273.
- Rogers,M.E., Hajmova,M., Joshi,M.B., Sadlova,J., Dwyer,D.M., Volf,P., and Bates,P.A. (2008). Leishmania chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol.* 10, 1363-1372.
- Santana,J.M., Grellier,P., Schrevel,J., and Teixeira,A.R. (1997). A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem. J.* 325 (Pt 1), 129-137.
- Santarem,N., Silvestre,R., Tavares,J., Silva,M., Cabral,S., Maciel,J., and Cordeiro-da-Silva,A. (2007). Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007, 85154.
- Santos,A.L., Branquinha,M.H., and D'Avila-Levy,C.M. (2006). The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 687-714.
- Sargeant,T.J., Marti,M., Caler,E., Carlton,J.M., Simpson,K., Speed,T.P., and Cowman,A.F. (2006). Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol.* 7, R12.
- Scharfstein,J., Schmitz,V., Morandi,V., Capella,M.M., Lima,A.P., Morrot,A., Juliano,L., and Muller-Esterl,W. (2000). Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.* 192, 1289-1300.
- Schenkman,S. and Mortara,R.A. (1992). HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by Trypanosoma cruzi trypomastigotes. *J. Cell Sci.* 101 (Pt 4), 895-905.
- Schluter,A., Fourcade,S., Ripp,R., Mandel,J.L., Poch,O., and Pujol,A. (2006). The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Mol. Biol. Evol.* 23, 838-845.
- Sibley,L.D., Niesman,I.R., Parmley,S.F., and Cesbron-Delauw,M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by Toxoplasma gondii. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4), 1669-1677.
- Sinai,A.P. and Joiner,K.A. (2001). The Toxoplasma gondii protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Biol.* 154, 95-108.
- Singh,A.P., Buscaglia,C.A., Wang,Q., Levay,A., Nussenzweig,D.R., Walker,J.R., Winzeler,E.A., Fujii,H., Fontoura,B.M., and Nussenzweig,V. (2007). Plasmodium circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell* 131, 492-504.

- Sommer,M.S., Gould,S.B., Lehmann,P., Gruber,A., Przyborski,J.M., and Maier,U.G. (2007). Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol. Biol. Evol.* *24*, 918-928.
- Su,X.Z., Heatwole,V.M., Wertheimer,S.P., Guinet,F., Herrfeldt,J.A., Peterson,D.S., Ravetch,J.A., and Wellems,T.E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* *82*, 89-100.
- Suss-Toby,E., Zimmerberg,J., and Ward,G.E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 8413-8418.
- Teixeira,M.M. and Yoshida,N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* *18*, 271-282.
- Tomavo,S., Schwarz,R.T., and Dubremetz,J.F. (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell Biol.* *9*, 4576-4580.
- Tonkin,C.J., Kalanon,M., and McFadden,G.I. (2008). Protein targeting to the malaria parasite plastid. *Traffic.* *9*, 166-175.
- Tonkin,C.J., Struck,N.S., Mullin,K.A., Stimmler,L.M., and McFadden,G.I. (2006). Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* *61*, 614-630.
- Tournaviti,S., Pietro,E.S., Terjung,S., Schafmeier,T., Wegehingel,S., Ritzerfeld,J., Schulz,J., Smith,D.F., Pepperkok,R., and Nickel,W. (2009a). Reversible phosphorylation as a molecular switch to regulate plasma membrane targeting of acylated SH4 domain proteins. *Traffic.* *10*, 1047-1060.
- Tournaviti,S., Pietro,E.S., Terjung,S., Schafmeier,T., Wegehingel,S., Ritzerfeld,J., Schulz,J., Smith,D.F., Pepperkok,R., and Nickel,W. (2009b). Reversible phosphorylation as a molecular switch to regulate plasma membrane targeting of acylated SH4 domain proteins. *Traffic.* *10*, 1047-1060.
- van de Sand,C., Horstmann,S., Schmidt,A., Sturm,A., Bolte,S., Krueger,A., Lutgehetmann,M., Pollok,J.M., Libert,C., and Heussler,V.T. (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol. Microbiol.* *58*, 731-742.
- van Dooren,G.G., Tomova,C., Agrawal,S., Humbel,B.M., and Striepen,B. (2008). *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 13574-13579.
- Vieira,M., Dutra,J.M., Carvalho,T.M., Cunha-e-Silva NL, Souto-Padron,T., and Souza,W. (2002). Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* *118*, 491-500.

- Vieira,M.C., de Carvalho,T.U., and de,S.W. (1994). Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by Trypanosoma cruzi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 967-971.
- Waller,R.F., Keeling,P.J., Donald,R.G., Striepen,B., Handman,E., Lang-Unnasch,N., Cowman,A.F., Besra,G.S., Roos,D.S., and McFadden,G.I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12352-12357.
- Waller,R.F., Reed,M.B., Cowman,A.F., and McFadden,G.I. (2000). Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway. *EMBO J.* 19, 1794-1802.
- Wickham,M.E., Rug,M., Ralph,S.A., Klonis,N., McFadden,G.I., Tilley,L., and Cowman,A.F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *EMBO J.* 20, 5636-5649.
- Wilkowsky,S.E., Wainszelbaum,M.J., and Isola,E.L. (1996). Trypanosoma cruzi: participation of intracellular Ca²⁺ during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 386-389.
- Wilson,R.J., Denny,P.W., Preiser,P.R., Rangachari,K., Roberts,K., Roy,A., Whyte,A., Strath,M., Moore,D.J., Moore,P.W., and Williamson,D.H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J. Mol. Biol.* 261, 155-172.
- Winter,G., Kawai,S., Haeggstrom,M., Kaneko,O., von,E.A., Kawazu,S., Palm,D., Fernandez,V., and Wahlgren,M. (2005). SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* 201, 1853-1863.
- Woolsey,A.M. and Burleigh,B.A. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of Trypanosoma cruzi and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol.* 6, 829-838.
- Yang,Y. and Adam,R.D. (1994). Allele-specific expression of a variant-specific surface protein (VSP) of Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res.* 22, 2102-2108.
- Ye,Y., Shibata,Y., Yun,C., Ron,D., and Rapoport,T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.