

Received: 2007.09.17
Accepted: 2007.11.21
Published: 2007.12.03

Glikoforyny ludzkich erytrocytów jako receptory dla zarodźca sierpowego malarii (*Plasmodium falciparum*)

Glycophorins of human erythrocytes as receptors for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Ewa Jaśkiewicz

Laboratorium Immunochemii Glikokoniugatów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Inwazja ludzkich erytrocytów przez zarodźca sierpowego (*Plasmodium falciparum*) jest przyczyną malarii, na którą zapada corocznie 300–500 milionów ludzi, głównie mieszkańców subsaharyjskich regionów Afryki oraz Indochin. Spośród czterech gatunków zarodźca, właśnie *Plasmodium falciparum* jest odpowiedzialne za najpoważniejszą postać choroby związaną ze zgonem ponad 2 milionów osób w ciągu roku, głównie dzieci w wieku do lat pięciu. Ze względu na skalę problemu, poznanie molekularnych podstaw procesu inwazji pasożytów ma priorytetowe znaczenie dla opracowania skutecznych metod leczenia oraz prewencji malarii. Proces inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca malarii jest wynikiem kaskady interakcji pomiędzy pasożytem a krwią czerwoną. Poznano wiele ligandów ekspresjonowanych przez komórki zarodźca, biorących udział w tym procesie, w tym białka należące do rodziny DBL. Stwierdzono, że receptorami dla przynajmniej dwóch ligandów *Plasmodium falciparum* z rodziny DBL: antygeny EBA-175 oraz EBA-140 (BAEBL), są sjałoglikoproteiny erytrocytów ludzkich – glikoforyny A, B i C. Wykazano, że antygen EBA-175 wiąże się do glikoforyny A, a w wiązaniu biorą udział reszty kwasu sjałowego O-glikozydowych łańcuchów cukrowych znajdujących się w klastrach, których konformacja zależy od struktury łańcucha polipeptydowego GPA. Funkcję glikoforyny A może przejąć druga pod względem ilościowym glikoforyna B. Podobnie, jak w przypadku glikoforyny A, wiązanie *Plasmodium falciparum* jest zależne od reszt kwasu sjałowego, lecz bierze w nim udział inny, niepoznany jeszcze, ligand merozoitów. Występująca na erytrocytach, w najmniejszej ilości, glikoforyna C, jest receptorem dla homologicznego do EBA-175 liganda BAEBL. Stwierdzono, że w wiązaniu antygeny BAEBL do glikoforyny C biorą udział reszty kwasu sjałowego O- i N-glikozydowych łańcuchów cukrowych, a także reszty aminokwasowe łańcucha polipeptydowego glikoforyny. Struktura miejsca receptorowego na glikoforynie C wymaga jednakże dalszego wyjaśnienia.

Słowa kluczowe:

glikoforyny ludzkich erytrocytów • zarodziec sierpowy malarii (*Plasmodium falciparum*) • oddziaływanie ligand-receptor

Summary

Malaria causes an estimated 300–500 million clinical cases in sub-Saharan Africa and Indochina. The most severe form of malaria is caused by *Plasmodium falciparum*, a parasite responsible for the death of 2 million children annually. Understanding the molecular basis of the parasite's invasion process is important for the development of new drugs and vaccines. Invasion of erythrocytes by the malaria parasite is a multistep process involving several specific interactions between the parasite's ligands and receptors on red blood cells. It was shown that glycophorins A, B,

and C, sialoglycoproteins of human erythrocytes, act as receptors for *Plasmodium falciparum* ligands of the DBL family: EBA-175 and EBA-140 antigens. The binding specificity of EBA-175 is determined by the presence of sialic acid residues of the O-linked oligosaccharide chain clusters of glycophorin A and the amino-acid sequence, which contribute to their proper conformation. Glycophorin B, the next in terms of amount, can take on the role of glycophorin A as the receptor, but the glycophorin B- and sialic acid-dependent invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* involves a different parasite ligand. The third, and minor, glycophorin C appears to be the receptor for the antigen BAEBL, a paralogue of EBA-175. The binding of BAEBL to glycophorin C is dependent on the sialic acid residues of the O- and N-linked oligosaccharide chains and a peptide as well. It seems that the correct receptor site on glycophorin C needs to be elucidated in detail.

Key words: human erythrocyte glycophorins • *Plasmodium falciparum* malaria parasite • ligand-receptor interactions

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11515.pdf

Word count: 3276

Tables: –

Figures: 1

References: 37

Adres autorki: dr hab. Ewa Jaśkiewicz, Laboratorium Immunochemii Glikokoniugatów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: jaskiew@iitd.pan.wroc.pl

WPROWADZENIE

Zakażenie ludzkich erytrocytów zarodźcem sierpowym (*Plasmodium falciparum*) jest przyczyną malarii, na którą zapada corocznie 300–500 milionów ludzi, głównie mieszkańców subsaharyjskich regionów Afryki oraz Indochin, i która powoduje zgon w ciągu roku ponad 2 milionów osób, przede wszystkim dzieci w wieku do lat pięciu. Spośród czterech gatunków zarodźca, właśnie *Plasmodium falciparum* jest odpowiedzialne za najpoważniejszą postać choroby charakteryzującą się kwasicą metaboliczną, zaburzeniami oddechowymi, oraz objawami mózgowymi, w tym śpiączką i drgawkami, co niezwykle prowadzi do śmierci [23,28]. Ze względu na skalę problemu, poznanie molekularnych podstaw procesu inwazji pasożytów ma priorytetowe znaczenie dla opracowania efektywnych metod leczenia oraz prewencji malarii, w tym przygotowania skutecznych szczepionek, które mają na celu wywołanie odpowiedzi immunologicznej ustroju, zapewniającej blokadę inwazji oraz likwidację pasożytów we krwi. Na razie jednak, mimo wysiłków, wysoce skuteczna szczepionka przeciw malarii jest niestety wciąż kwestią przyszłości.

Źródłem zakażenia ludzi malarią są zarażone samice komara widliszka (*Anopheles spp.*) które w czasie ssania krwi wprowadzają ze swoich gruczołów ślinowych zarodźce w postaci sporozoitów [6,11]. Podczas 1–3 tygodni rozwoju w komórkach wątroby, sporozoity przekształcają się w postać schizonta, który dojrzewając dzieli się dając początek merozoitom. W wyniku rozpadu dojrzałych schizontów następuje uwolnienie do krwiobiegu ogromnej liczby merozoitów, które następnie wnikają do erytrocytów, będących miejscem ich dalszego rozwoju. Objawy kliniczne malarii (gorączka, dreszcze) są bezpośrednio związane z jednoczesnym rozpadem zakażonych erytrocytów i kolejnym uwalnianiem merozoitów, występującym w odstę-

pach jedno- lub dwudniowych. Po przejściu kilku opisanych wyżej podziałów część merozoitów daje początek formom płciowym – gametocytom, które muszą ponownie przedostać się do przewodu pokarmowego komara widliszka, aby ukończyć swój cykl życiowy.

Złożony i wciąż mało poznany proces inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca malarii jest wynikiem kaskady swoistych interakcji pomiędzy pasożytem a krwinką czerwoną. Można wyróżnić cztery główne etapy tego procesu: swoiste przyłączenie merozoitu do erytrocytu określonego gatunku, reorientacja jednokomórkowego zarodźca, polegająca na ustawieniu się końcem odpowiedzialnym za wnikanie, utworzenie ścisłego i nieodwracalnego wiązania pomiędzy merozoitem a erytrocytem, i ostatecznie wniknięcie zarodźca do krwinki z wytworzeniem wakuoli, która jest miejscem jego dalszego rozwoju [6,11].

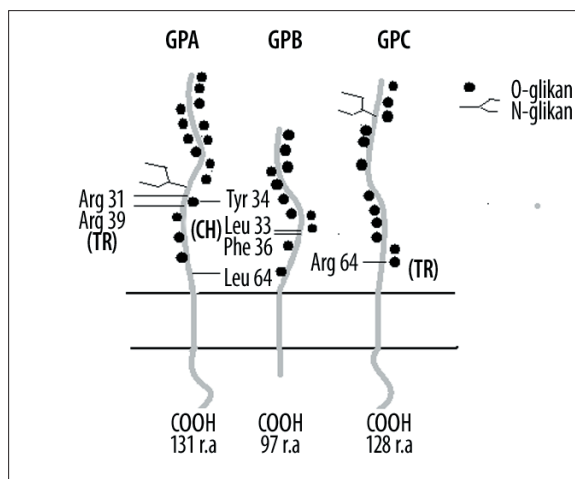
Zidentyfikowano wiele ligandów ekspresjonowanych przez komórki zarodźca, które biorą udział w poszczególnych etapach. Należy tutaj wymienić między innymi: białka powierzchniowe merozoitów (membrane surface proteins: MSP – 1, 2, 4, 5, 8 i 10) związane z błoną komórkową poprzez kotwicę glikozylo-fosfatidyloinozytolową (GPI), które odpowiadają za wstępne rozpoznanie i odwracalne wiązanie merozoitów do swoistych gatunkowo erytrocytów, AMA-1 (apical membrane antigen), biorący udział w reorientacji części apikalnej komórki zarodźca w kierunku erytrocytu, oraz białka zaangażowane w tworzenie ścisłego kontaktu między dwoma komórkami [6, 11]. Ostatnie z wymienionych ligandów można zaliczyć do dwóch rodzin: RBL (reticulocyte-binding-like) oraz EBL (erythrocyte-binding-like) lub inaczej DBL (Duffy-binding-like), ze względu na podobieństwo do poznanego najwcześniej liganda zarodźca ruchliwego (*Plasmodium vivax*), wiążące się do antygeny Duffy na erytrocytach ludzkich [2,6,11].

W genomie *Plasmodium falciparum*, który nie wiąże się do antygeny Duffy, zidentyfikowano sześć sekwencji homologicznych genu *eb1*, kodujących białka będące paralogami liganda wiążącego antygen Duffy (DBL), o nazwach: EBA-175, EBA-140 (BAEBL), EBA-181 (JESEBL), EBA-165 (PEBL), MAEBL oraz EBL-1 [1]. Geny *eb1* ewoluowały prawdopodobnie od jednego przodka i zachowały podobną strukturę eksonów i intronów, a wszystkie białka rodziny DBL mają homologiczną strukturę domenową. Trzy pierwsze z wymienionych ligandów zostały scharakteryzowane pod względem funkcjonalnym w oparciu o ich zdolność do wiązania się do erytrocytów ludzkich.

GLIKOFORYNA A JAKO RECEPTOR DLA LIGANDA EBA-175 *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Najwcześniej i najlepiej poznanym ligandem z rodziny DBL *Plasmodium falciparum* jest białko EBA-175 [2,5,33]. Gen kodujący EBA-175 składa się z czterech eksonów, z których pierwszy koduje N-końcowy fragment zewnątrz błonowy, drugi domenę transbłonową, a trzeci i czwarty kodują fragment cytoplazmatyczny łańcucha polipeptydowego EBA-175, składającego się z 1435 reszt aminokwasowych (r.a.) [31]. W obrębie N-końcowego fragmentu białka można wyróżnić dwa regiony (RII oraz RVI) zawierające dużą liczbę konserwatywnych reszt cysteiny. Charakterystyczną cechą liganda EBA-175 *Plasmodium falciparum*, w odróżnieniu od *Plasmodium vivax*, jest obecność dwóch homologicznych domen F1 (r.a. 8-282) i F2 (r.a. 297-603) składających się na Region II. Stosując rekombinacyjne formy EBA-175, zawierające poszczególne regiony (I-VI) łańcucha polipeptydowego liganda, ekspresjonowane na komórkach COS7, Sim i wsp. [32] ustalili, że za wiązanie do erytrocytów jest odpowiedzialny Region II składający się z 616 r.a. Ponadto stwierdzono, że spośród dwóch homologicznych domen F1 i F2, jedynie domena F2 ma zdolność wiązania erytrocytów analogiczną do Regionu II, oraz pełnego liganda EBA-175. W cytowanej pracy autorzy nie tylko zidentyfikowali miejsce wiążące na ligandzie EBA-175 *Plasmodium falciparum*, ale również scharakteryzowali miejsce receptorowe na glikoforynie A ludzkich erytrocytów, która jak wykazali, jest wyłącznym receptorem dla liganda EBA-175.

Przesłanki sugerujące, że sjaloglikoproteiny (glikoforyny) erytrocytów (ryc. 1) mogą być receptorami dla *Plasmodium falciparum* były znane już wcześniej [5,26]. Świadczył o tym brak wiązania EBA-175 do erytrocytów traktowanych neuraminidazą, usuwającą $\alpha(2,3)$ kwas sjalowy z oligosacharydowych łańcuchów cukrowych glikoforyn, oraz do wariantowych erytrocytów M^aM^b niemających dwóch glikoforyn A i B (GPA i GPB), które są dwiema głównymi sjaloglikoproteinami ludzkich erytrocytów. Łańcuchy polipeptydowe GPA i GPB, zawierają odpowiednio 131 oraz 97 reszt aminokwasowych (ryc. 1) i są kodowane przez dwa odrębne geny [29], składające się odpowiednio z sześciu oraz czterech eksonów [30]. Trzy spośród czterech eksonów kodujących GPB są identyczne do eksonów kodujących GPA, co sprawia, że obie glikoforyny mają dużą homologię sekwencji aminokwasowej oraz analogiczną strukturę domenową. N-końcowy fragment domeny zewnątrz błonowej, obejmujący r.a. 1-26 jest identyczny w obu glikoforynach. Polimorfizm reszt aminokwasowych GPA w pozycji 1 (Ser/Leu) i 5 (Gly/Glu) oraz GPB w po-



Ryc. 1. Struktura glikoforyn A, B i C wraz z miejscami glikozylacji, zaznaczono miejsca trawienia trypsyną (TR) i chymotrypsyną (CH) [17]

zycji 29 (Met/Thr) jest podstawą rozróżnienia antygenów grupowych krwi M i N oraz S i s [17]. Z resztami seryny i treoniny GPA i GPB jest związanych odpowiednio 16 i 11 łańcuchów cukrowych (ryc. 1) [4, 36]. Wszystkie łańcuchy GPB są O-glikozydowymi sjalotetrasacharydami o strukturze NeuAc $\alpha(2,3)$ Gal β 1,3 [NeuAc $\alpha(2,6)$]GalNAc [17]. GPA zawiera, oprócz 15 łańcuchów O-glikozydowych, również jeden łańcuch N-glikozydowy typu złożonego, związany z resztą Asn26 [17].

Jednoznaczna identyfikacja GPA jako receptora dla liganda EBA-175 *Plasmodium falciparum* została przeprowadzona przez wspomnianych wcześniej autorów [32] na podstawie wiązania rekombinacyjnego Regionu II EBA-175, ekspresjonowanego na komórkach COS7, do wariantowych erytrocytów (S-s-U-u-) niezawierających GPB, oraz braku wiązania tego regionu do wariantowych erytrocytów En(a-), niemających GPA. Do dalszej szczegółowej charakterystyki miejsca receptorowego na GPA wykorzystano trypsynowe (MT1 1-31, 1-39) i chymotrypsynowe (MCH1 1-64, MCH2 1-34, MCH3 35-64) fragmenty zewnątrz błonowego regionu GPA. Stwierdzono, że wiązanie rekombinacyjnego EBA-175 do erytrocytów było hamowane jedynie przez peptyd chymotrypsynowy MCH1 obejmujący r.a. 1-64 i zawierający 15 O-glikozydowych sjalotetrasacharydów. Mieszanina peptydów trypsynowych MT1, zawierających 11 z 15 łańcuchów cukrowych, oraz chymotrypsynowych MCH2 i MCH3, zawierających wszystkie łańcuchy cukrowe nie wykazywała aktywności hamującej, co świadczyło o tym, że nie tylko reszty kwasu sjalowego łańcuchów cukrowych GPA biorą udział w wiązaniu EBA-175, lecz istotna jest również nienaruszona struktura łańcucha polipeptydowego. Na znaczenie r.a. 1-64 GPA w wiązaniu liganda EBA-175 wskazywało również to, że GPB zawierająca 11 identycznych z GPA łańcuchów oligosacharydowych oraz 26 identycznych, początkowych reszt aminokwasowych nie hamowała wiązania EBA-175 do erytrocytów. Stosując N-glikanazę wykluczono ponadto udział N-glikozydowego łańcucha cukrowego GPA w wiązaniu EBA-175. Podsumowując, Sim i wsp. w 1994 r. jako pierwsi zdefiniowali GPA, jako receptor dla liganda EBA-175 *Plasmodium falciparum*, ustalając, że w wiązaniu

biorą udział reszty $\alpha(2,3)$ kwasu sjałowego O-glikozydowych łańcuchów cukrowych, znajdujących się w klastrach, których konformacja zależy od struktury łańcucha polipeptydowego GPA. Dalsze badania wspomnianej grupy, z zastosowaniem testu ELISA oraz cytofluorymetrii przepływową (FACS), wykazały jednak, że antygen EBA-175 może wiązać również odsjałowaną GPA z udziałem innego fragmentu łańcucha polipeptydowego należącego do Regionów III i IV, obejmującego 21 r.a. (1076-1096) [13]. Szczególnie peptyd obejmujący 12 r.a. (1085-96) wykazywał najsilniejsze wiązanie do GPA oraz najwyższą zdolność blokowania inwazji erytrocytów. Zdolność antygenu EBA-175 do wiązania odsjałowanej GPA została potwierdzona również w późniejszych badaniach grupy pod kierunkiem Cowmana [10].

Najnowszym osiągnięciem grupy badawczej, również z udziałem Sim, było uzyskanie w 2005 r. struktury krystalicznej Regionu II liganda EBA-175 z dokładnością do 2,3 Å, która pozwoliła na wyjaśnienie molekularnych podstaw interakcji miejsca wiążącego antygenu EBA-175 z O-glikozydowymi łańcuchami cukrowymi GPA [35]. Ustalono, że Region II może krystalizować w postaci monomeru lub homodimeru utworzonego przez dwie cząsteczki ułożone względem siebie przeciwnolegle, które tworzą strukturę „uściśniętych dłoni”. Domeny F1 każdego z monomerów oddziałują z domenami F2 drugiego monomeru Regionu II. W cząsteczce homodimeru tworzą się dwa kanały, które przebijają białko na wylot. Powierzchnia każdego z kanałów jest w większości utworzona przez reszty aminokwasowe domeny F2, co potwierdza jej decydujący udział w miejscu wiążącym antygenu EBA-175. Otrzymano również strukturę krystaliczną homodimeru Regionu II w obecności receptora, którego rolę pełniły cząsteczki sjał $\alpha(2,3)$ laktozy. Ustalono, że na cząsteczce dimeru przypada sześć miejsc wiążących sacharydy, przy czym cztery z nich są umiejscowione wewnątrz dwóch kanałów. Dwa pozostałe znajdują się we wgłębieniu na powierzchni cząsteczki homodimeru. W wiązaniu każdego glikanu biorą udział oba monomery Regionu II, co oznacza, że dimeryzacja jest warunkiem koniecznym do związania receptora. Modelowanie komputerowe miejsc wiążących homodimeru Regionu II potwierdziło, że O-glikozydowe sjałotetrasacharydy GPA mogą być wiązane, podobnie jak sjał $\alpha(2,3)$ laktoza. Na postawie analizy mutacyjnej ustalono, że wszystkie sześć potencjalnych miejsc wiążących uczestniczy w wiązaniu łańcuchów cukrowych GPA. Stwierdzenie, że Region II liganda EBA-175 krystalizuje z sześcioma cząsteczkami sjałolaktozy w postaci homodimeru, pozwoliło to na zaproponowanie przypuszczalnego modelu wiązania GPA przez antygen EBA-175 *Plasmodium falciparum*. Według tego scenariusza wiązanie Regionu II do GPA, na powierzchni erytrocytów, indukuje dimeryzację EBA-175 wokół dimeru GPA. Dimeryzacja antygenu EBA-175 jest zatem następstwem związania receptora, przy czym łańcuchy polipeptydowe dimeru GPA mogą być zamykane wewnątrz kanałów homodimeru Regionu II lub tylko „dostarczać” O-glikozydowych łańcuchów cukrowych owijając się wokół miejsc wiążących. Omówione powyżej wyniki badań, są jedynymi, które w sposób molekularny przedstawiają proces wzajemnej interakcji liganda i receptora leżący u podstaw inwazji erytrocytów przez zarodźca sierpowego z udziałem EBA-175 i GPA. Są one niezwykle istotne nie tylko w kontekście poznawczym, ale i praktycznym,

zmierzającym do otrzymania skutecznych leków – inhibitorów działających na zasadzie blokowania procesu wiązania merozoitów do krwinek czerwonych.

GPA stanowi główną, lecz nie jedyną drogę inwazji erytrocytów z udziałem glikoforyn. Jej funkcję może przejąć druga, pod względem ilościowym, sjałoglikoproteina erytrocytów – GPB, mająca homologię sekwencji aminokwasowej oraz identyczną strukturę łańcuchów O-glikozydowych jak GPA [9,12,27]. Podobnie jak w przypadku GPA, wiązanie *Plasmodium falciparum* przez GPB jest zależne od reszt kwasu sjałowego, lecz nie bierze w nim udziału antygen EBA-175, lecz inny, niepoznany jeszcze, ligand merozoitów [9,32]. Przypuszcza się, że każdy z sześciu wspomnianych wcześniej ligandów rodziny DBL ma własną swoistość i wiąże się z różnymi receptorami na erytrocytach.

GLIKOFORYNA C JAKO RECEPTOR DLA LIGANDA EBA-140 *PLASMODIUM FALCIPARUM*

W błonie ludzkich erytrocytów występuje, w niewielkiej ilości trzecia glikoforyna, która nie ma homologii sekwencji aminokwasowej z GPA i GPB – glikoforyna C (GPC) [14]. Łańcuch polipeptydowy GPC jest kodowany przez gen składający się z 4 eksonów i zawiera 128 reszt aminokwasowych (ryc. 1). Z resztami seryny i treoniny zewnątrz błonowego fragmentu łańcucha polipeptydowego związanych jest 12 O-glikanów, natomiast z resztą Asn8 jeden N-glikozydowy łańcuch cukrowy. Znane są rzadko występujące, naturalne warianty genetyczne GPC, zawierające delecję eksonów 2 lub 3, kodujących odpowiednio reszty aminokwasowe 17-35 lub 36-63. Erytrocyty zawierające wymienione warianty GPC mają fenotyp Yus (Δ eks.2) lub Gerbich (Δ eks.3). Znane są również krwinki o fenotypie Leach, niezawierające GPC, o zmienionym kształcie i obniżonej wytrzymałości, co wskazuje na udział GPC w utrzymywaniu kształtu i mechanicznej trwałości erytrocytów, w wyniku interakcji z białkami cytoszkieletu. W ciągu ostatnich kilku lat ukazało się wiele prac wskazujących na rolę GPC – jako receptora dla kolejnego liganda *Plasmodium falciparum* z rodziny DBL – białka EBA-140 (BAEBL), homologicznego do EBA-175.

Antygen BAEBL zidentyfikowano i sklonowano z genomowego DNA *Plasmodium falciparum*, w oparciu o homologię sekwencji nukleotydowej z EBA-175 [21,24,34]. Z cytowanych doniesień wynika, że jako źródło DNA oraz liganda wydzielanego do nadsączki hodowlanej przez merozoity posłużyły dwa różne klonny pasożytów: 3D7 i Dd2/Nm. Wiązanie BAEBL do erytrocytów było zależne od kwasu sjałowego, co mogło sugerować udział sjałoglikoprotein. Ponieważ stwierdzono jednak brak wpływu lub jedynie częściowy spadek wiązania BAEBL do erytrocytów traktowanych proteazami, w tym trypsyną, na której działanie podatne są GPA i GPC, dwie grupy badawcze wykluczyły tę możliwość [24,34]. Trzecia grupa wykazała, że receptor jest wrażliwy na trypsynę i zdefiniowała go, jako GPC, w oparciu o wiązanie BAEBL do erytrocytów pozabawionych GPA i GPB oraz spadek wiązania do erytrocytów o fenotypie Gerbich (Δ egz.3) i Yus (Δ egz.2) [21]. Było to pierwsze doniesienie wskazujące na GPC, jako przypuszczalny receptor dla antygenu BAEBL *Plasmodium falciparum*. Zaobserwowane rozbieżności, dotyczące swo-

istości liganda BAEBL, znalazły późniejsze wyjaśnienie w polimorfizmie reszt aminokwasowych Regionu II, odpowiedzialnego za wiązanie erytrocytów, który stwierdzono w różnych klonach *Plasmodium falciparum*, pochodzących z odmiennych części świata [22]. Znalaziono pięć polimorficznych typów łańcucha polipeptydowego BAEBL (różniących się czterema resztami aminokwasowymi w pozycjach 185, 239, 261, 285): VSTK (klon Dd2/Nm), VSKK (klon PNG13), ISKK (klon E12), INRE (klon PNG3), INKK (klon 3D7), które wiązały się do odmiennych receptorów na erytrocytach. Według autorów, spośród wymienionych wariantów, jedynie wariant zawierający resztę aminokwasową VSTK, pochodzący z klonu Dd2/Nm, wykazywał swoistość wobec GPC, co ustalono na podstawie braku wiązania tego liganda do erytrocytów trawionych neuraminidazą i trypsyną oraz erytrocytów o fenotypie Gerbich (Δ eg.3).

Dalsza szczegółowa charakterystyka GPC jako receptora, dotycząca miejsca wiązania antygeny BAEBL, została przeprowadzona przez trzy niezależne ośrodki badawcze i zaowocowała sprzecznymi wynikami [18,19,20].

W pracy opublikowanej w *Nature Medicine* przez grupę badaczy pod kierunkiem Cowmana, otrzymano warianty klonów 3D7 oraz W2mef *Plasmodium falciparum*, pozbawione genu dla liganda BAEBL [19]. Metodą Western-blottingu z użyciem mieszaniny glikoforyn A, B i C autorzy wykazali wiązanie BAEBL do GPC, w przypadku antygeny pochodzącego z obu natywnych klonów i brak wiązania białek pochodzących z nadsączca hodowlanego klonów *Plasmodium falciparum* pozbawionych genu dla BAEBL. Brak wiązania uzyskano również, używając wariantowej GPC typu Gerbich, mającej delecję r.a. 36-63, co wskazywało na miejsce wiązania BAEBL w tym regionie. Może to mieć ogromne znaczenie epidemiologiczne na obszarach endemicznych malarii, takich jak Papua Nowa Gwinea (Melanezja), gdzie około 46,5% populacji posiada erytrocyty o fenotypie Gerbich [19,37]. Wykazano, że istotnie erytrocyty typu Gerbich wykazują obniżoną podatność (około 60%) na inwazję przez oba klony *Plasmodium falciparum* (3D7 i W2mef) w porównaniu z krwinkami prawidłowymi, co świadczy, że BAEBL nie jest wyłącznym ligandem umożliwiającym inwazję pasożytem, lecz jednym z kilku antygenów zaangażowanych w ten proces. Wyniki przedstawione w omówionej pracy stanowiły potwierdzenie roli GPC jako receptora, były jednak sprzeczne ze stwierdzonym przez inną grupę brakiem wiązania do GPC liganda BAEBL pochodzącego z klonu 3D7 (r. a. INKK) [22].

Próba zdefiniowania miejsca wiążącego na GPC została podjęta również przez Lobo i wsp. [18] z użyciem liganda BAEBL, pochodzącego z klonu 3D7 oraz wariantowych krwinek o fenotypie Yus i Gerbich oraz Leach niemających GPC. Stwierdzono, że antygen BAEBL nie wiąże się do erytrocytów typu Leach, potwierdzając udział GPC w wiązaniu, wykazuje obniżone wiązanie do erytrocytów Yus, natomiast wiąże się, nawet silniej do erytrocytów typu Gerbich. Otrzymane wyniki wskazywały zatem na udział w wiązaniu BAEBL r.a. 17-35 nieobecnych w GPC typu Yus, a nie r.a. 36-63 (GPC typu Gerbich), jak w omawianej wcześniej pracy [18]. Udział fragmentu łańcucha polipeptydowego zawierającego r.a. 13-22 został dodatkowo potwierdzony poprzez hamowanie wiązania BAEBL

monoklonalnymi przeciwciałami rozpoznającymi epitopy w tym regionie (r.a. 13-20 oraz 16-22).

Ostatnie z trzech doniesień zostało opublikowane przez grupę pod kierunkiem Millera, w lutym 2006 r., definiując N-glikozydowy łańcuch cukrowy GPC, jako główny składnik miejsca wiążącego dla antygeny BAEBL [20]. Autorzy podtrzymali wcześniejsze wyniki wykazujące rozpoznawanie GPC na erytrocytach jedynie przez wariant BAEBL zawierający r.a. VSTK (klon Dd2/Nm), a nie przez inne warianty użyte w badaniach, w tym wariant pochodzący z kontrowersyjnego klonu 3D7. Autorzy ci podają, że wiązanie antygeny BAEBL było specyficznie hamowane przez oczyszczoną GPC, w stężeniu podobnym, jak GPA użyta do hamowania wiązania antygeny EBA-175. Wątpliwości budzi jednak czystość preparatu GPC użytej do hamowania wiązania. Oczyszczenie GPC z posiadanego przez autorów preparatu zawierającego mieszaninę glikoforyn A, B i C jest rzeczą trudną, ze względu na wzajemną agregację glikoprotein błonowych, a w pracy nie podano kryteriów czystości GPC. Nie poddając pod wątpliwość udziału GPC w wiązaniu liganda BAEBL, sądziemy jednak, że autorzy mogli posiadać preparat zawierający również GPA, która znajduje się w największej ilości w błonach erytrocytów, co podważa wiarygodność uzyskanych wyników. Enzymatyczne usunięcie łańcucha N-glikozydowego z preparatu GPC całkowicie zniósło efekt hamowania wiązania BAEBL do erytrocytów przez GPC, wskazując na udział tego glikanu w interakcji z ligandem. Uwolnione N-glikany nie wykazywały hamowania wiązania, co może – jak przyznają autorzy – świadczyć o tym, że łańcuch N-glikozydowy jest częścią glikopeptydowego receptora. Autorzy ci uważają, że brak wiązania antygeny BAEBL do wariantowych erytrocytów typu Gerbich, może być wynikiem odmiennej struktury łańcucha N-glikozydowego tego wariantu, a nie delecji części łańcucha polipeptydowego GPC. Poparto to wynikami analizy cukrowej, które wskazywały na większy udział N-glikanów typu mannozowego w GPC typu Gerbich, w porównaniu z łańcuchami typu złożonego w normalnej GPC. Upřednio przypuszczano, że N-glikany wariantów GPC zawierają zwiększoną liczbę jednostek polilaktozoaminowych o różnej długości, co uwiadcza się w elektroforezie migracją tych glikoforyn w postaci rozmytych prążków [14,15]. Kluczowa rola N-glikanu GPC w wiązaniu liganda BAEBL *Plasmodium falciparum* do erytrocytów ludzkich wymaga zatem dalszego potwierdzenia, w czym pomocne byłoby ustalenie niezbadanej struktury N-glikanu normalnej GPC i jej wariantów.

PODSUMOWANIE

Badając wiązanie różnych klonów *Plasmodium falciparum*, w tym klonów laboratoryjnych, jak i dzikich pochodzących od osób z regionów dotkniętych malarią, do erytrocytów traktowanych enzymami (neuraminidazą i proteazami) stwierdzono, że glikoforyny A, B i C nie są wyłącznymi receptorami dla zarodźca sierpowego malarii. Świadczyło o tym również to, że naturalne mutacje prowadzące do pojawienia się w regionach endemicznych malarii erytrocytów, zawierających wariantowe glikoforyny, ograniczają inwazję tylko częściowo. Przykładem są powszechnie występujące wśród Afrykanów erytrocyty o fenotypie S-s-U-u- niezawierające GPB i erytrocyty Dantu mające hy-

brydową GPA oraz występujące u mieszkańców Melanezji erytrocyty o fenotypie Gerbich z delecją fragmentu (r.a. 36-63) GPC [11,37].

Oprócz omówionych dróg inwazji erytrocytów przez *Plasmodium falciparum*, z udziałem glikoforyn, zidentyfikowano przynajmniej trzy alternatywne drogi z udziałem poznanych i jeszcze niezidentyfikowanych par ligand–receptor [8, 11]. Zaproponowano pięć następujących możliwości:

1. EBA-175 – GPA; EBA-140 – GPC (droga zależna od kwasu sjałowego i wrażliwa na trypsynę i chymotrypsynę).
2. LIGAND? – GPB (droga zależna od kwasu sjałowego, niewrażliwa na trypsynę, wrażliwa na chymotrypsynę).
3. Rh1 – RECEPTOR Y (droga zależna od kwasu sjałowego, niewrażliwa na trypsynę i chymotrypsynę).
4. LIGAND? – RECEPTOR X (droga niezależna od kwasu sjałowego, wrażliwa na trypsynę).
5. Rh2b – RECEPTOR Z (droga niezależna od kwasu sjałowego, niewrażliwa na trypsynę).

Zauważono przy tym istotne różnice pomiędzy drogami inwazji klonów laboratoryjnych, jak również dzikich, w zależności od regionu, z którego pochodziły. Większość szczepów laboratoryjnych *Plasmodium falciparum* miało zdolność inwazji erytrocytów traktowanych trypsyną, wśród pozostałych preferowana była droga z udziałem receptora X wrażliwego na trypsynę i niezależnego od kwasu sjałowego [11]. Ustalenie dróg inwazji klonów pochodzących z czterech regionów endemicznych malarii: Indii [25], Brazylii [8], Gambii [3] oraz Kenii [8] pozwoliło na zidentyfikowanie dominującego profilu na danym terenie. I tak, klony pochodzące z Indii preferowały hipotetyczny receptor Z niewrażliwy na neuraminidazę i trypsynę, natomiast pochodzące z Gambii i Brazylii receptor wrażliwy na neuraminidazę oraz trypsynę, co wskazywało na udział

glikoforyn. Większość klonów pochodzących z Kenii było zależnych od receptora X, niezależnego od kwasu sjałowego i wrażliwego na trypsynę.

Istnienie tak wielu alternatywnych dróg zakażenia jest dowodem na ogromną plastyczność i złożoność procesu inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca sierpowego malarii, oraz niestety powodem trudności związanych z opracowaniem skutecznych metod prewencji oraz terapii malarii. Wykorzystanie wielu ligandów i receptorów umożliwiających zmianę drogi inwazji daje pasożytom wciąż przewagę. Uważa się nawet, że nie istnieją erytrocyty, które byłyby całkowicie odporne na zakażenie przez *Plasmodium falciparum*. Największe nadzieje noszą szczepionki zawierające jednocześnie kilka antygenów, co uzasadnia badania zmierzające nie tylko do ich identyfikacji, ale również próby określenia ich immunogenności.

Stosując rekombinacyjne formy antygeny EBA-175 otrzymane w komórkach owadzych, w tym antygen natywny oraz fragmenty łańcucha polipeptydowego obejmujące Region II i domenę F2 oraz syntetyczne peptydy pochodzące z Regionu III-IV (r.a. 1062-1103, 1069-1087, 1085-1096, 1076-1096), stwierdzono, że mają one zdolność do indukcji przeciwciał u zwierząt doświadczalnych, a przeciwciała te efektywnie blokują inwazję erytrocytów przez *Plasmodium falciparum* [7,13,16,31,33]. Co jest istotne, rekombinacyjne formy Regionu II i domeny F2 EBA-175 oraz peptyd obejmujący r.a. 1062-1103 liganda EBA-175, są rozpoznawane przez naturalne przeciwciała obecne u osób chorych na malarię [7,31]. Świadczy to o istotnym znaczeniu drogi inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca sierpowego, przebiegającej z udziałem antygeny EBA-175 i GPA, co stawia EBA-175, w rzędzie potencjalnych składników szczepionki przeciw malarii [16].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams J.H., Blair P.L., Kaneko O., Peterson D.S.: An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol., 2001; 17: 297–299
- [2] Adams J.H., Sim B.K., Dolan S.A., Fang X., Kaslow D.C., Miller L.H.: A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89: 7085–7089
- [3] Baum J., Pinder M., Conway D.J.: Erythrocyte invasion phenotypes of *Plasmodium falciparum* in The Gambia. Infect. Immun., 2003; 71: 1856–1863
- [4] Blanchard D., Dahr W., Hummel M., Latron F., Beyreuther K., Cartron J.P.: Glycophorins B and C from human erythrocyte membranes. Purification and sequence analysis. J. Biol. Chem., 1987; 262: 5808–5811
- [5] Camus D., Hadley T.J.: A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. Science, 1985; 230: 553–556
- [6] Cowman A.F., Crabb B.S.: Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, 2006; 124: 755–766
- [7] Daugherty J.R., Murphy C.I., Doros-Richert L.A., Barbosa A., Kashala L.O., Ballou W.R., Snellings N.J., Ockenhouse C.F., Lanar D.E.: Baculovirus-mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies. Infect. Immun., 1997; 65: 3631–3637
- [8] Deans A.M., Nery S., Conway D.J., Kai O., Marsh K., Rowe J.A.: Invasion pathways and malaria severity in Kenyan *Plasmodium falciparum* clinical isolates. Infect. Immun., 2007; 75: 3014–3020
- [9] Dolan S.A., Proctor J.L., Alling D.W., Okubo Y., Wellem T.E., Miller L.H.: Glycophorin B as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol., 1994; 64: 55–63
- [10] Duraisingh M.T., Maier A.G., Triglia T., Cowman A.F.: Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100: 4796–4801
- [11] Gaur D., Mayer D.C.G., Miller L.H.: Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol., 2004; 34: 1413–1429
- [12] Gaur D., Storry J.R., Reid M.E., Barnwell J.W., Miller L.H.: *Plasmodium falciparum* is able to invade erythrocytes through a trypsin-resistant pathway independent of glycophorin B. Infect. Immun., 2003; 71: 6742–6746
- [13] Jakobsen P.H., Heegaard P.M., Koch C., Wasniewska K., Lemnge M.M., Jensen J.B., Sim B.K.: Identification of an erythrocyte binding peptide from the erythrocyte binding antigen, EBA-175, which blocks parasite multiplication and induces peptide-blocking antibodies. Infect. Immun., 1998; 66: 4203–4207
- [14] Jaśkiewicz E.: Molekularne i genetyczne podstawy układu grupowego Gerbich ludzkich erytrocytów. Post. Biochem., 1991; 37: 75–81
- [15] Jaśkiewicz E., Czerwinski M., Colin Y., Lisowska E.: Recombinant forms of Gerbich blood group antigens: expression and purification. Transfus. Clin. Biol., 2002; 9: 121–129
- [16] Liang H., Narum D.L., Fuhrmann S.R., Luu T., Sim B.K.: A recombinant baculovirus-expressed *Plasmodium falciparum* receptor-binding domain of erythrocyte binding protein EBA-175 biologically mimics native protein. Infect. Immun., 2000; 68: 3564–3568
- [17] Lisowska E.: Antigenic properties of human erythrocyte glycophorins. W: The molecular immunology of complex carbohydrates, red.: A. M. Wu, Plenum Press, New York and London, 1988; 265–316

- [18] Lobo C.A., Rodriguez M., Reid M., Lustigman S.: Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*, 2003; 101: 4628–4631
- [19] Maier A.G., Duraisingh M.T., Reeder J.C., Patel S.S., Kazura J.W., Zimmerman P.A., Cowman A.F.: *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat. Med.*, 2003; 9: 87–92
- [20] Mayer D.C., Jiang L., Achur R.N., Kakizaki I, Gowda D.C., Miller L.H.: The glycophorin C N-linked glycan is a critical component of the ligand for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte receptor BAEBL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 2358–2362
- [21] Mayer D.C., Kaneko O., Hudson-Taylor D.E., Reid M.E., Miller L.H.: Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 5222–5227
- [22] Mayer D.C., Mu J.B., Feng X., Su X.Z., Miller L.H.: Polymorphism in a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand changes its receptor specificity. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1523–1528
- [23] Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K.: The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002; 415: 673–679
- [24] Narum D.L., Fuhrmann S.R., Luu T., Sim B.K.: A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein-2 (EBP2/BAEBL) involved in erythrocyte receptor binding. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2002; 119: 159–168
- [25] Okoyeh J.N., Pillai C.R., Chitnis C.E.: *Plasmodium falciparum* field isolates commonly use erythrocyte invasion pathways that are independent of sialic acid residues of glycophorin A. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 5784–5791
- [26] Orlandi P.A., Klotz F.W., Haynes J.D.: A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J. Cell Biol.*, 1992; 116: 901–909
- [27] Pasvol G.: How many pathways for invasion of the red blood cell by the malaria parasite? *Trends Parasitol.*, 2003; 19: 430–432
- [28] Rasti N., Wahlgren M., Chen Q.: Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004; 41: 9–26
- [29] Siebert P.D., Fukuda M.: Human glycophorin A and B are encoded by separate, single copy genes coordinately regulated by a tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 12433–12436
- [30] Siebert P.D., Fukuda M.: Molecular cloning of human glycophorin B cDNA: Nucleotide sequence and genomic relationship to glycophorin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 6735–6739
- [31] Sim B.K.: EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, 1995; 11: 213–217
- [32] Sim B.K., Chitnis C.E., Wasniowska K., Hadley T.J., Miller L.H.: Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1994; 264: 1941–1944
- [33] Sim B.K., Orlandi P.A., Haynes J.D., Klotz F.W., Carter J.M., Camus D., Zegans M.E., Chulay J.D.: Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *Cell Biol.*, 1990; 111: 1877–1884
- [34] Thompson J.K., Triglia T., Reed M.B., Cowman A.F.: A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol. Microbiol.*, 2001; 41: 47–58
- [35] Tolia N.H., Enemark E.J., Sim B.K., Joshua-Tor L.: Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 2005; 122: 183–193
- [36] Tomita M., Marchesi V.T.: Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975; 72: 2964–2968
- [37] Zimmerman P.A., Patel S.S., Maier A.G., Bockarie M.J., Kazura J.W.: Erythrocyte polymorphisms and malaria parasite invasion in Papua New Guinea, *Trends Parasitol.*, 2003; 19: 250–252