

POBIERANIE ŻELAZA PRZEZ PASOŻYTNICZE PIERWOTNIAKI: RECEPTORY DLA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH ŻELAZO*

AN IRON UPTAKE BY PARASITIC PROTOZOA: RECEPTORS
FOR IRON-BINDING PROTEINS

Henryka DŁUGOŃSKA, Bożena DZIADEK, Katarzyna DZITKO

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Efektywne pobieranie żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki jest warunkiem ich przeżycia w organizmie żywiciela. Rodzaj dostępnego źródła żelaza, o które pasożyt musi konkurować z makroorganizmem, zależy od niszy, jaką zasiedla i trybu życia (wewnątrz- lub/i zewnątrzkomórkowy). W pracy opisano różne sposoby pozyskiwania żelaza ze związków chelatowych (transferyna, laktoferyna) u wybranych gatunków *Protozoa*. Szczególną uwagę poświęcono wiciowcom *Trypanosoma brucei*. W uwagach końcowych wskazano na problemy związane z badaniami nad metabolizmem żelaza u wewnątrzkomórkowych pasożytniczych pierwotniaków oraz znaczne zróżnicowanie receptorów zaangażowanych w pobieranie żelaza, zależnie od gatunku i postaci pasożyta.

Słowa kluczowe: białka wiążące żelazo, receptory, pasożytnicze pierwotniaki.

Summary: An effective iron uptake by parasitic protozoa is a determining factor for their survival in host. The available iron source, for which the parasite must compete with the macroorganism, depends on the niche where it resides and its life mode (intracellular or/and extracellular). In the paper an iron acquisition from chelate compounds (transferrin, lactoferrin) in selected protozoan species has been presented. A particular interest has been focused on flagellated protozoon, *Trypanosoma brucei*. In concluding remarks any particular problems associated with the studies on iron metabolism in intracellular parasitic protozoa and a significant variety of protozoan receptors involved in iron delivery, depending on a parasite species and form, have been pointed out.

Key words: iron-binding proteins, receptors, parasitic protozoa.

*Praca została dofinansowana przez KBN: projekt badawczy 2 P04C 014 26.

Żelazo jest nieodzownym do życia pierwiastkiem zarówno dla makroorganizmów, jak i drobnoustrojów. Uczestniczy ono w wielu kluczowych procesach metabolicznych, m.in. w transporcie tlenu, syntezie RNA i DNA, transporcie elektronów, wiązaniu azotu i detoksykacji utleniaczy. Może jednak także katalizować proces wytwarzania wysoko reaktywnego rodnika hydroksylowego (reakcja Fentona: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$), który indukuje szereg reakcji szkodliwych dla komórek, w tym peroksydację lipidów i uszkodzenie DNA oraz powstawanie innych toksycznych metabolitów, np. N-chloramin, czynnych w procesie wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów. Wydaje się, że ze względu na powszechność i obfitość żelaza w biosferze życie jest rodzajem ciągłego hazardu, ponieważ zarówno brak żelaza, jak i jego nadmiar są zdecydowanie szkodliwe [20].

Patogenne drobnoustroje wykształciły bogaty wachlarz mechanizmów zaopatrywania się w żelazo z zasobów organizmu gospodarza. Ponieważ w fizjologicznym pH i w obecności tlenu żelazo tworzy nierozpuszczalne wodorotlenki, jedynym dostępnym jego źródłem są różne związki chelatowe, zwykle o charakterze białkowym. Należą do nich białka rodziny transferyn, obejmujące u ssaków transferynę surowiczą, laktoferynę i melanotransferynę, a u ptaków owotransferynę oraz wewnątrzkomórkowe białka na czele z hemoglobina i ferrytyną, która magazynuje żelazo i bierze udział w procesach detoksykacji [4,28].

BIAŁKA METABOLIZMU ŻELAZA: TRANSFERYNA SUROWICZA I LAKTOFERYNA

Transferyna surowicza ssaków i ptaków (owotransferyna) odpowiadają za transport żelaza Fe^{3+} z płynów ustrojowych do cytosolu, natomiast laktoferyna jest raczej uważana za „zmiatacz” żelaza. Te trzy białka charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa topologii i identycznymi miejscami wiązania żelaza. Częsteczkę transferyn stanowi pojedynczy glikozylowany polipeptyd o masie cząsteczkowej względnej, M_r prawie 80 kDa (ok. 700 aminokwasów), uorganizowany w dwa płaty (N i C), spięte wewnętrznym łańcuchem zbudowanym z 10–12 reszt aminokwasowych. Każdy płat, podzielony na dwie domeny, ma jedno miejsce wiążące jon żelazowy, które leży między wewnętrznymi powierzchniami głębokiej, hydrofilnej szczeliny na styku domen i jest utworzone przez 4 aminokwasy: asparaginę, dwie tyrozyny i histydynę. Brak przyłączonego żelaza (apotransferyna) sprawia, że płat przybiera konformację „otwartej szczęki”. Przyłączenie żelaza (holotransferyna) podwyższa stopień upakowania cząsteczki, zamykając żelazo wewnątrz i chroniąc je przed przypadkowym uwolnieniem. To sprawia, że wiązanie żelaza przez transferyny jest mocne, lecz odwracalne. Jedna cząsteczka transferyny uczestniczy w 100–200 cyklach transportu i uwalniania żelaza. Mimo iż prawie całe żelazo niehemowe w krążeniu jest związane właśnie z transferyną, to jej miejsca wiążące żelazo są wysyczone tylko w ok. 30% [4,28].

Laktoferyna występuje zewnątrzkomórkowo (błony śluzowe, płyny biologiczne: siara, mleko, nasienie, ślina) i wewnątrzkomórkowo (ziarnistości wtórne neutrofilii). Zdolność wiązania żelaza przez laktoferynę jest bardzo duża i aż ponad 300-krotnie wyższa niż transferyny surowiczej. Prócz wiązania żelaza, laktoferyna, a nawet tylko jej proteolityczny fragment powstały po trawieniu pepsyną i obejmujący N-końcowy region cząsteczki (laktoferycyna) wykazują działanie bakteriobójcze, oparte na obecności silnie zasadowych aminokwasów, które sprawiają, że punkt izoelektryczny laktoferyny (pI) znajduje się w przedziale 8,4–9,0, podczas gdy innych przedstawicieli rodziny transferyn – 5,4–5,9. Silnie elektrododatnia laktoferyna chciwie wiąże ujemnie naładowane komponenty komórkowe, np. bakteryjny LPS czy DNA [12,17]. Transferyny, chociaż bardzo podobne pod wieloma względami, różnią się mechanizmem uwalniania żelaza w różnych warunkach środowiska, m.in. różnica dotyczy pH – w przypadku holotransferyny żelazo jest uwalniane w pH ok. 5,5, a w przypadku hololaktoferyny – w $\text{pH} \leq 3,5$ [1].

Transferyny (holotransferyny) są głównym źródłem żelaza dla komórek. Prócz tego, biorą one udział w wielu ważnych procesach fizjologicznych: reakcji zapalnej, proliferacji, różnicowaniu i nowotworzeniu komórek, a także w odporności przeciwzakaźnej [12,17,39]. Nie tylko laktoferyna i jej pochodne [12], ale również transferyna surowicza i owotransferyna mają działanie przeciwbakteryjne, spowodowane zwiększeniem przepuszczalności błony zewnętrznej bakterii [2].

Większość komórek pobiera żelazo drogą endocytozy swoistych receptorów wiążących związki chelatujące żelazo, rzadziej bez udziału tych receptorów. Ten pierwszy sposób charakteryzuje się dużym powinowactwem, ale ograniczoną wydajnością, ten drugi natomiast – niskim powinowactwem, ale dużą wydajnością. Po oddaniu żelaza następuje recykling transferyny, który jest cechą obu procesów, z tym że jest on bardziej efektywny w przypadku drogi zależnej od receptorów [15].

POZYSKIWANIE ŻELAZA PRZEZ PIERWOTNIAKI

Wiedza na temat mechanizmów zaopatrywania się pasożytniczych pierwotniaków w żelazo pochodzące z organizmu żywiciela jest dość uboga. Najwięcej informacji z tego zakresu dotyczy zewnątrzkomórkowych pasożytów, szczególnie wiciowców z rodzaju *Trypanosoma*, które bytując w osoczu krwi ssaków mogą wykorzystywać związki chelatujące żelazo (głównie surowiczą transferynę) w sposób bezpośredni.

Trypanosoma brucei (świdrowiec afrykański)

Świdrowiec afrykański, pasożyt ssaków, jest czynnikiem etiologicznym śpiączki afrykańskiej u ludzi, przenoszonej przez muchy tse-tse. U form trypomastigota, wyizolowanych ze krwi, wykazano obecność receptorów dla transferyny, kodowanych przez geny *ESAG6* i *ESAG7* (*expression site associated gene*). Produkty tych genów tworzą swoisty receptor (TfR) złożony z glikoprotein: pESAG6 (Mr 50–60 kDa) i

pESAG7 (Mr 40-42 kDa). Ten heterodimer jest wbudowany w błonę za pomocą GPI (glikozylofasfatydyloinozytolu), który przyłącza się do pESAG6 w siateczce śródplazmatycznej [31]. Brak GPI upośledza utworzenie dimeru ESAG6-ESAG7 i jego zakotwiczenie w błonie komórkowej [7]. U *T. brucei* stwierdzono aż 1000 genów *VSG* (*variant surface glycoprotein*), kodujących hiperzmienną powierzchnię glikoproteiny o Mr ok. 50 kDa, odpowiedzialną za tworzenie bardzo licznych wariantów antygenowych pasożyta i kolejne fale (nawet ponad 100) parazytemii u jednego żywiciela. Część tych genów zlokalizowana jest w około 20 telomerycznych jednostkach transkrypcyjnych, z których każda zawiera promotor, osiem lub więcej genów *ESAG* (w większości o nieznannej funkcji), w tym geny *ESAG6* i *ESAG7* oraz gen *VSG*. W danym momencie aktywna jest tylko jedna jednostka transkrypcyjna, co prowadzi do ekspresji tylko 1 formy VSG i jednej formy receptora ESAG6/ESAG7, chociaż jak niedawno wykazano ok. 20% mRNA dla ESAG6 pochodzi z wyciszonych (*silent*) jednostek transkrypcyjnych [5,8]. Receptory kodowane przez poszczególne jednostki transkrypcyjnie różnią się znacznie powinowactwem w stosunku do transferyny różnych gatunków, np. TfR kodowane przez jednostkę 221 wiążą silnie transferynę bydlęcą, średnio intensywnie transferynę ludzką, a prawie wcale nie wiążą transferyny psa; wartości K_d wahają się od 0,002 do > 1 mM. U wariantu *T. brucei* z aktywną jednostką 221, hodowanego w obecności transferyny psa, następuje przełączenie na jednostkę VO2, kodującą TfR o wysokim powinowactwie w stosunku do transferyny tego gatunku. Zmienność sekwencji aminokwasów w części receptorów wiążącej ligand (obszar obejmujący aminokwasy 205–215 i 223–238 w N-terminalnej części ESAG6) umożliwia wykorzystywanie transferyny różnych gatunków ssaków, a także możliwość przystosowania się do obecności przeciwciał antyreceptorowych, powstających w przewlekłym zarażeniu i konkurujących z transferyną o wiązanie z TfR [13,32]. Wykazano, że pokrewny gatunek, *Trypanosoma equiperdum* cechuje znacznie mniejsze zróżnicowanie genów *ESAG6*, co koreluje ze znacznie mniejszym wachlarzem potencjalnych żywicieli tego pasożyta (tylko konie, osły i muły) [16].

Tanaka i wsp. [34] stwierdzili ostatnio, że *Trypanosoma brucei* wiąże transferyny: bydlęcą i ludzką laktoferynę, bydlęcą transferynę i owotransferynę przy użyciu dwóch tych samych białek receptorowych o Mr 40 i 43 kDa. Białko 40 kDa zostało zidentyfikowane jako dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPHD). Warto nadmienić, że enzym ten, zlokalizowany u *Staphylococcus aureus* w ścianie komórkowej, wiąże ludzką transferynę. Drugie z opisanych białek, o Mr 43 kDa, jest być może analogiem ESAG7.

Potraktowanie form bytujących we krwi *T. brucei* związkiem chelatującym żelazo, deferoksaminą, hamuje ich proliferację. Są one 10-krotnie bardziej wrażliwe na brak żelaza niż komórki ssaków, co otwiera potencjalne możliwości terapeutyczne, oparte na zaburzaniu metabolizmu żelaza tych pasożytów [9].

Jest interesujące, że postaci trypomastigota spokrewnionego gatunku *Trypanosoma cruzi*, czynnika etiologicznego trypanosomozy amerykańskiej (choroby Chagasa) nie wiążą i nie pochłaniają transferyny, być może dlatego, że są to formy krótko żyjące i nieproliferujące. Natomiast formy epimastigotyczne, pasożytujące u pluskwiaków,

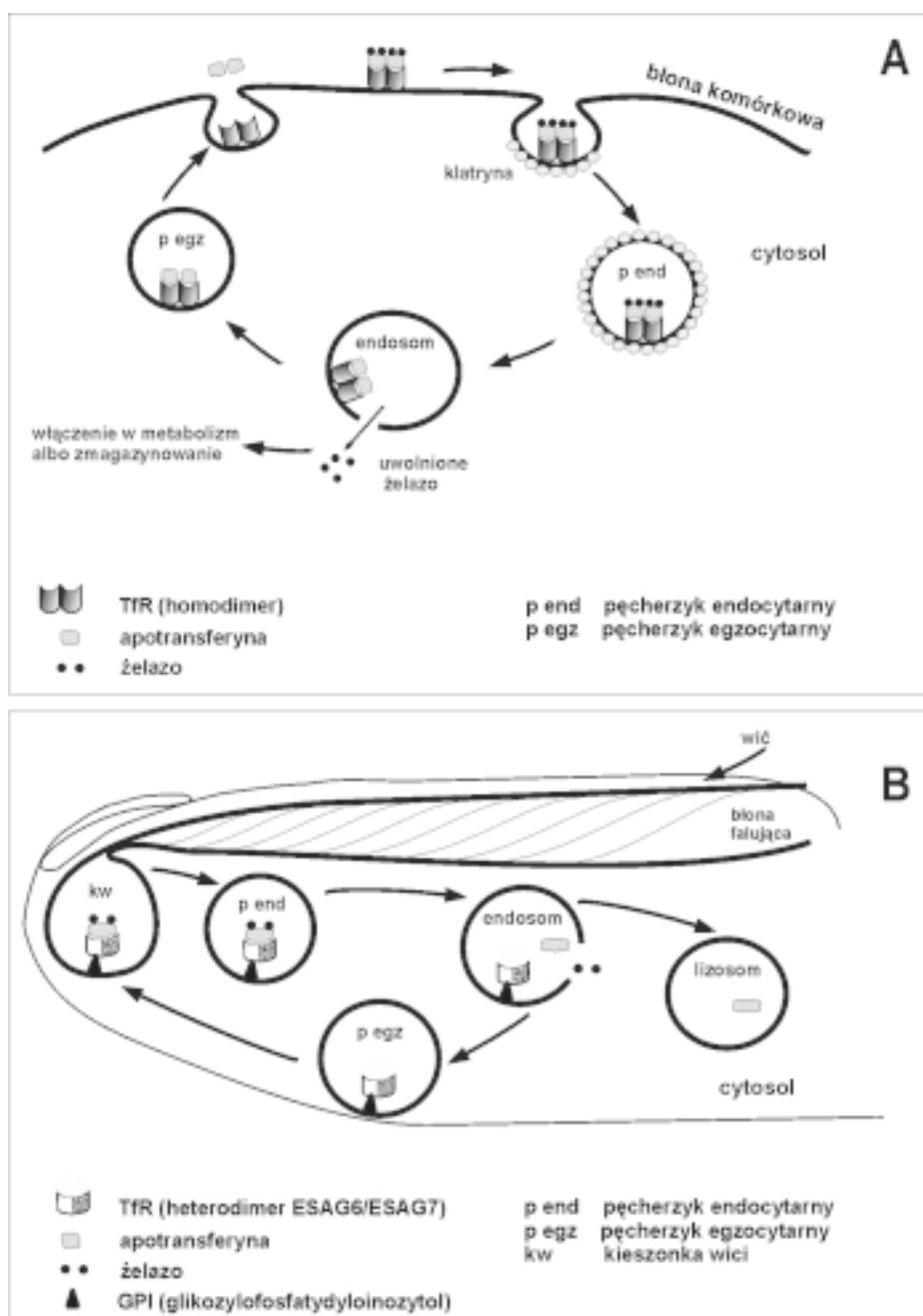
pobierają transferynę do cytostomu (otwór pokarmowy u orzęsków i niektórych wiciowców), skąd jest ona transportowana do rezerwosomów, znajdujących się na tylnym biegunie komórki i będących prawdopodobnie ekwiwalentem lizosomów. Stamtąd, po uwolnieniu żelaza receptory transferynowe powracają na powierzchnię komórki [24].

Proces pochłaniania transferyny (Tf) przez komórki *T. brucei* i ssaków różni się zasadniczo. W tabeli przedstawiono główne cechy receptorów dla transferyny (TfR), a na rysunku – sam proces jej pochłaniania i recyklingu TfR u człowieka i pierwotniaka *T. brucei*. U człowieka opisano dwa rodzaje receptorów dla transferyny: TfR1 i TfR2. Funkcja tego drugiego jest słabo określona [36], stąd podane w tabeli informacje dotyczą tylko TfR1.

Wiązanie transferyny przez TfR może się odbywać na całej powierzchni komórek człowieka, a u *T. brucei* tylko w jednym wydzielonym miejscu – kieszonce wici, będącej zagłębieniem błony, gdzie odbywa się endo- i egzocytoza [3,24]. Kompleksy Tf-TfR u ssaków są internalizowane w pęcherzykach pokrytych klatryną, a u trypanosomy – kompleksy Tf-TfR (zakotwiczone w pellikuli przez GPI, glikozylofosfatydyloinozyl) są najprawdopodobniej przesuwane do wnętrza komórki wraz z przepływem ładunku w błonie. Następnie i jedne, i drugie są dostarczane do endosomów (pH ok. 5,5), a ich dalszy los różni się. W endosomach komórek ssaków żelazo odłącza się i przy udziale DMT1 (czynnika transportującego metale diwalentne) przedostaje się do cytosolu, zaś holotransferyna przekształca się w apotransferynę, a ta nadal skompleksowana z TfR wraca na powierzchnię komórki i tam, w obojętnym pH (7,4), oddysocjuje od receptora i ulega uwolnieniu. Natomiast u *T. brucei*, apotransferyna jest transportowana do lizosomów, gdzie ulega degradacji proteolitycznej. Wolne TfR wracają prawdopodobnie do kieszonki wici [3,28,31]. Mocno zdegradowane fragmenty transferyny, która uległa endocytozie w komórkach *T. brucei*, można jednak znaleźć w podłożu

TABELA. Porównanie właściwości receptorów dla transferyny (TfR) człowieka i *T. brucei*

Cecha	TfR	
	człowiek	<i>T. brucei</i>
Budowa	Homodimer (2 x 90 kDa)	Heterodimer ESAG6/ESAG7; ESAG6 50-60 kDa + ESAG7 40-42 kDa
Modyfikacje potranslacyjne	Glikozylacja, fosforylacja, acylacja	Glikozylacja
Liczba kopii na komórkę	20–700 x 10 ³	3 x 10 ³
Sposób umocowania w błonie komórkowej	2 domeny przezbłonowe	GPI (glikozylofosfatydyloinozyl) na C-terminalnym końcu ESAG6
Wiązanie transferyny		
liczba cząsteczek/TfR	2	1
liczba cząsteczek/TfR/h	18 (erytoblasty)	4,5
Powinowactwo do apotransferyny w pH 7	niskie	wysokie
pH 5	wysokie	niskie
Recykling – powrót TfR na powierzchnię komórki po dostarczeniu żelaza	powraca kompleks TfR-apotransferyna	powraca sam TfR



RYCINA. Pochłanianie transferyny w drodze endocytozy mediowanej przez receptory TfR: A – komórka ssaka, B – *Trypanosoma brucei*

hodowlanym, co wskazuje na możliwość jej częściowego recyklingu, który przebiega z udziałem markerów endocytarnych Rab5 i Rab11 [27].

Trichomonas vaginalis (rzęśistek pochwowy)

T. vaginalis zasiedla z dużą częstością nabłonek układu moczopłciowego u ludzi, przyczepiając się do komórek żywiciela za pomocą cytoadhezyn (AP65, AP51, AP33 i AP23), których ekspresja jest większa w obecności żelaza [30,37]. Środowisko życia otwiera możliwość wykorzystania przez tego pasożyta, poza prostymi związkami żelaza, także laktoferyny i hemoglobiny (z krwi menstruacyjnej). Intensywność ekspresji i powinowactwo białka wiążącego laktoferynę (136 kDa) do ligandu jest zależna od stężenia żelaza w środowisku wzrostu [37].

Blisko spokrewniony pasożyt bydła *Trichomonas foetus*, przenoszony drogą płciową, może wiązać zarówno transferynę, jak i laktoferynę, ale co charakterystyczne, z większą intensywnością przylacza laktoferynę, w tym silniej laktoferynę bydlęcą niż ludzką. Na podstawie testu hamowania kompetycyjnego wykazano, że wiązanie laktoferyny tylko w niewielkim stopniu ma charakter nieswoisty, tj. oparte jest na siłach elektrostatycznych. Aktywność wiązania laktoferyny znaleziono we frakcjach powierzchniowych białek pasożyta o Mr: 22, 49, 55, 72 i 155 kDa. Nie wiadomo, czy są to różne białka czy multimery jednego białka [14]. Tachezy [33] zwraca uwagę, że *Trichomonas vaginalis* i *Trichomonas foetus* mają beztlenowy metabolizm, ze znaczącym udziałem białek typu FeS (np. ferredoksyna), zlokalizowanych w hydrogenosomach. Te dwufunkcyjne białka, oprócz udziału w metabolizmie energe-tycznym, mogą mieć także udział w cytoadhezji pasożyta. Nie ulega wątpliwości, że żelazo jest bardzo istotnym regulatorem zjadliwości *T. foetus*. Szczepy o mniejszej wirulencji słabiej przyswajają żelazo z transferyny i niskocząsteczkowych kompleksów żelazowych [18]. Inkubowanie *T. foetus* w podłożu pozbawionym żelaza zwiększa jego zdolność adhezji do komórek nabłonkowych w hodowli *in vitro*, ale obniża aktywność proteaz cysteinowych pasożyta i jego cytotoksyczność [22]. Obserwacje dotyczące związku: żelazo - zdolność cytoadhezji u *T. foetus* i *T. vaginalis* są więc sprzeczne i być może wskazują, że te dwa bliskie filogenetycznie gatunki rodzaju *Trichomonas* różnią się pod względem metabolizmu.

Entamoeba histolytica (pełzak czerwoni)

Ten kosmopolityczny pasożyt, czynnik etiologiczny pełzakowicy jelitowej, wykorzystuje jako źródło żelaza w hodowli *in vitro*, oprócz soli tego pierwiastka, hemoglobinę różnych gatunków (człowieka, świni i bydła), degradując ją przy użyciu obojętnych proteaz cysteinowych. Swoje wymagania odżywcze względem żelaza może także zaspokoić wiążąc, a następnie internalizując ludzką holotransferynę przy użyciu dwóch białek receptorowych (Mr 140 i 70 kDa), z których jedno jest zlokalizowane w błonie komórkowej, a drugie w cytosolu [29]. Te obserwacje nie pokrywają się z nieco wcześniejszymi, otrzymanymi przez inną grupę badaczy, która śledząc szlaki endocytozy różnych białek u *E. histolytica* stwierdziła, że pasożyt ten nie pochłania transferyny,

mimo że ma zdolność internalizowania innych białek: laktoferyny, albuminy i peroksydazy chrzanowej [6].

Leishmania spp. (leiszmania)

Wiciowce rodzaju *Leishmania* powodują u ludzi leiszmaniozę narządową, skórą i błon śluzowych. Leiszmania występuje w dwóch głównych formach: zewnątrzkomórkowej – promastigota, pasożytującej w jelicie owadów – przenosicieli i wewnątrzkomórkowej – amastigota, pasożytującej w makrofagach ssaków, w tym u człowieka. Ten dualizm powoduje, że pasożyt musi się dopasować do różnych środowisk życia. W badaniach *in vitro* wykazano, że postaci promastigota *L. chagasi* mogą wykorzystywać jako źródło żelaza: heminę, holotransferynę i hololaktoferynę, ale nie ferrytynę [37].

Wewnątrzkomórkowe formy *Leishmania spp.* zasiedlają niezwykle niszę wewnątrz makrofagów ssaków – wakuolę pasożytniczą, której wnętrze jest silnie kwaśne i hydrolityczne. Zarażenie makrofagów nie prowadzi do zmiany intensywności pobierania przez nie transferyny, zmianie ulega natomiast ich system endocytarny. Endosomy zawierające TfR i transferynę zlewają się z wakuolą pasożytniczą. Uwolniona tam transferyna jest pobierana przez pasożyty, a następnie kierowana do lizosomo-podobnego przedziału ich komórki [10,24].

Wilson i wsp. [38] kontynuując badania nad mechanizmem przyswajania żelaza przez formy promastigotyczne *L. chagasi* stwierdzili, że pobierają one preferencyjnie żelazo w formie zredukowanej, co wiąże się z ekspresją zależnej od NADPH reduktazy żelazowej. Redukcja Fe^{3+} do Fe^{2+} w transferynie lub laktoferynie sprzyja ich internalizacji z udziałem monomerycznej cząsteczki o Mr 70 kDa, która wiąże jednak nie tylko transferynę i laktoferynę, ale również albuminę, a więc w przeciwieństwie do *Trypanosoma spp.* proces przyłączania białek wiążących żelazo u *Leishmania spp.* jest nieswoisty. Ta nieswoistość może być istotnym biologicznie walorem, który umożliwia wykorzystywanie różnych związków żelaza u różnych żywicieli.

Toxoplasma gondii (toksoplazma)

Pasożytuje wewnątrzkomórkowo u licznych gatunków ptaków i ssaków, w tym człowieka. Zarażenie przebiega z reguły bezobjawowo, z wyjątkiem osobników z osłabioną odpornością (chorzy na AIDS, biorcy przeszczepów itp.), u których inwazja *T. gondii* może mieć burzliwy przebieg i poważne następstwa.

Tanaka i wsp. [35] wykazali u toksoplazmy obecność białka o Mr 42 kDa przyłączającego zarówno bydlęcą transferynę, jak i bydlęcą laktoferynę oraz owotransferynę. Jaka jest biologiczna rola wiązania laktoferyny, nie wiadomo, tym bardziej że intensywność jej przyłączania wydaje się być niezależna od zawartości żelaza. Warto też w tym miejscu nadmienić, iż rok później Tanaka i wsp. [34] opisali wiązanie tych samych białek chelatujących żelazo u świrdrowca *Trypanosoma brucei* (informacja podana we wcześniejszym fragmencie pracy) z tą różnicą, że u toksoplazmy wykryli tylko jedno białko wiążące, a u trypanosomy dwa – o Mr 40 i 43 kDa.

W błonie wakuoli pasożytniczej, wydzielonego i bezpiecznego przedziału komórkowego, w którym bytuje i namnaża się *T. gondii*, nie stwierdzono obecności TfR; już podczas penetracji typowe, wczesne markery endosomalne, m.in. TfR, są usuwane, uniemożliwiając zlanie się wakuoli z lizosomami i wewnątrzkomórkowe zabicie *T. gondii* [23]. Pozostaje więc otwartą kwestią, co jest źródłem i jaki jest mechanizm zaopatrzenia toksoplazmy w żelazo, skoro błona wakuoli pozwala tylko na swobodne przemieszczanie się cząsteczek o maksymalnej Mr 1300 Da. Z badań własnych *in vitro* wynika, że zarażenie *T. gondii* powoduje po 18 h obniżenie ekspresji TfR na makrofagach myszy (w sposób zależny od dawki), ale nie na fibroblastach, powszechnie używanych w laboratoriach do namnażania toksoplazmy [11]. Zmiany w ekspresji TfR na zarażonych komórkach są więc zależne od ich rodzaju.

Laktoferycyna, 25-aminokwasowy peptyd otrzymywany przez trawienie laktoferyny pepsyną, obniża infekcyjność sporozoitów *T. gondii*, mierzoną przez ich zdolność do penetracji komórek w hodowli *in vitro*, jak i podwyższenie dawki oraz przedłużenie czasu przeżycia zarażonych zwierząt doświadczalnych [26]. Chociaż laktoferycyna może być generowana *in vivo* w warunkach naturalnych z laktoferyny śluzu przewodu pokarmowego pod wpływem pepsyny żołądka, to nie jest pewne, czy mogą być osiągnięte aż tak wysokie stężenia, jak te określone w pracy jako słabo i silnie inhibicyjne (100 i 1000 µg/ml). Z kolei, aby wykorzystać żelazo związane z laktoferyną, pasożyty muszą być odporne na jej bezpośrednią cytotoksyczną aktywność. Brak dotychczas informacji o mechanizmach unikania tego pasożytośobczego działania, zarówno w odniesieniu do *T. gondii*, jak i innych pasożytniczych pierwotniaków, zaś samo pobieranie laktoferyny wysyczonej żelazem ma niewątpliwie działanie propasożytnicze [12].

UWAGI KOŃCOWE

Problem pozyskiwania i przyswajania niezbędnego do życia żelaza u pasożytniczych pierwotniaków jest bardziej złożony niż u innych organizmów, m.in. ze względu na skomplikowane cykle rozwojowe pasożytów i złożone interakcje żywiciel-pasożyt, będące skutkiem długotrwałych ewolucyjnie kontaktów. Różne postaci rozwojowe pasożytniczych pierwotniaków mogą żyć u różnych gatunków żywicieli, nie tylko w różnych tkankach, ale również wewnątrz lub na zewnątrz komórek, co sprawia, że najprawdopodobniej wykorzystują różne mechanizmy zdobywania żelaza, niezbędnego do przeżycia i replikacji. W przeciwieństwie do bakterii, u pierwotniaków nie opisano dotychczas wydzielania sideroforów, które z dużym powinowactwem wiążą żelazo, a potem są internalizowane z udziałem swoistych receptorów ściany bakterii. Wyjątkowo wdzięcznym modelem do badań nad sposobami zaopatrzenia w żelazo okazały się wiciowce rodzaju *Trypanosoma*, ale tylko formy zewnątrzkomórkowe (trypomastigotyczne), bytujące w osoczu krwi. Bardzo skąpe informacje dotyczą bezwzględnych wewnątrzkomórkowych pasożytów, np. *Toxoplasma gondii* czy *Plasmodium spp.* (zarodziec). Mimo wieloletnich intensywnych badań, źródło i sposób zaopatrzenia

zarodźców malarii w żelazo pozostają nadal bardzo enigmatyczne [21,37]. Opisane dotychczas receptory dla transferyny surowiczej, głównego białka transportującego żelazo i dostarczającego go komórkom pierwotniaków, wyraźnie się różnią nie tylko u różnych gatunków, ale także stadiów rozwojowych jednego gatunku. To zróżnicowanie TfR dotyczy m.in. ich lokalizacji w komórkach pierwotniaków. Na przykład u *Leishmania spp.*, postać amastigota, rezydująca wewnątrzkomórkowo, cechuje się równomiernym rozmieszczeniem TfR na całej powierzchni komórki, podczas gdy postać zewnątrzkomórkowa – wybiórczym ich zgrupowaniem w kieszonce wici. Różne miejsca ekspresji TfR i ich endocytozy odzwierciedlają różne środowiska, w których dane pasożyty muszą przeżyć i stąd zapewne u postaci zewnątrzkomórkowych konieczność ukrycia TfR w kieszonce wici, co ogranicza dostęp komórek efektorowych systemu immunologicznego. Badanie metabolizmu żelaza u wewnątrzkomórkowych pasożytniczych pierwotniaków utrudnia fakt, że mogą one czerpać żelazo także z cytosolowych zasobów komórek żywicielskich, w sposób elastyczny wykorzystując egzogenne i endogenne źródła tego elementu, co wykazano u bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, rezydujących w fagosomach makrofagów [25]. Warto też nadmienić, że surowicza transferyna o dużej zdolności wiązania nie tylko żelaza, ale i innych metali i w warunkach fizjologicznych tylko częściowo wysyciona przez żelazo, może być wykorzystana do terapii, dostarczając do komórek, drogą zależną i niezależną od TfR, różne leki, w tym terapeutyczne kationy Ga^{3+} i Ru^{3+} o właściwościach przeciw-nowotworowych, szczególnie że komórki nowotworowe wykazują wysoką ekspresję TfR [19]. Znajomość procesów pobierania żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki może więc mieć znaczenie nie tylko czysto poznawcze, ale i aplikacyjne.

LITERATURA

- [1] ABDALLAH FB, EL HAGE CHACHINE JM. Transferrins: iron release from lactoferrin. *J Mol Biol* 2000; **303**: 255–266.
- [2] AGUILERA O, QUIROS LM, FIERRO JF. Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett* 2003; **548**: 5–10.
- [3] AISEN P. Transferrin receptor 1. *Int J Bioch Cell Biol* 2004; **36**: 2137–2143.
- [4] AISEN P, ENNS C, WESLING-RESNICK M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Bioch Cell Biol* 2001; **33**: 940–959.
- [5] ANSORGE I, STEVERDING D, MELVILLE S, HARTMANN C, CLAYTON C. Transcription of ‘inactive’ expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptors RNAs in bloodstream forms. *Mol Bioch Parasitol* 1999; **101**: 81–94.
- [6] BATISTA EJ, de MENEZES FEITOSA LF, de SOUZA W. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2000; **86**: 881–890.
- [7] BIEBINGER S, HELFERT S, STEVERDING D, ANSORGE I, CLAYTON C. Impaired dimerization and trafficking of ESAG6 lacking a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Mol Bioch Parasitol* 2003; **132**: 93–96.
- [8] BORST P, ULBERT S. Control of VSG gene expression sites. *Mol Bioch Parasitol* 2001; **25**: 17–27.
- [9] BREIDBACH T, SCORY S, KRAUTH-SIEGEL RL, STEVERDING D. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol* 2002; **32**: 473–479.

- [10] BURCHMORE RJS, BARRETT MP. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* 2001; **31**: 1311–1320.
- [11] DZIADEK B, DYTNEŃSKA K, DŁUGOŃSKA H. The modulation of transferrin receptors level on mouse macrophages and fibroblasts by *Toxoplasma gondii*. *Pol J Microbiol* 2004; **53**, suppl.: 75–80.
- [12] FARNAUD S, EVANS RW. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003; **40**: 395–405.
- [13] GERRITS H, MUSSMANN R, BITTER W., KIEFT R, BORST P. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol Bioch Parasitol* 2002; **119**: 237–247.
- [14] GRAB DJ, LONSDALE-ECCLES JD, OLI MW, CORBEIL LB. Lactoferrin-binding proteins of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol* 2001; **87**: 106–1070.
- [15] IKUTA K, ZAK O, AISEN P. Recycling, degradation and sensitivity to the synergistic anion of transferrin in the receptor-independent route of iron uptake by human hepatoma (HuH-7) cells. *Int J Bioch Cell Biol* 2004; **36**: 340–352.
- [16] ISOBE T, HOLMES EC, RUDENKO G. The transferrin receptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in their transferrin binding site than those of broad-host range. *J Mol Evol* 2003; **56**: 377–386.
- [17] KRUZEL ML. Rola laktoferyny w rozwoju ostrych stanów zapalnych. *Post Hig Med Dośw* 2003; **57**: 377–404.
- [18] KULDA J, POISLOVÁ M, SUCHAN P, TACHEZY J. Iron enhancement of experimental infection of mice by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 1999; **85**: 692–699.
- [19] LI H, SUN H, MING QUAN Z. The role of the transferrin-transferrin receptor system in drug delivery and targeting. *Trends Pharm Sci* 2002; **23**: 206–209.
- [20] LIEU PT, HEISKALA M, PETERSON PA, YANG Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001; **22**: 1–87.
- [21] MABEZA GF, LOYEVSKY M, GORDEUK VR, WEISS G. Iron chelation therapy for malaria: a review. *Pharmacol Ther* 1999; **81**: 53–75.
- [22] MELO-BRAGA MB, da ROCHA-AZEVEDO B, SILVA-FILHO FC. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol* 2003; **105**: 111–120.
- [23] MORDUE DG, HÅKANSSON S, NIESMAN I, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 1999; **92**: 87–99.
- [24] MORGAN GW, HALL BS, DENNY PW, CARRINGTON M, FIELD MC. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol* 2002; **18**: 491–496.
- [25] OLAKANMI O, SCHLESINGER LS, AHMED A, BRITIGAN BE. Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49727–49734.
- [26] OMATA Y, SATAKE M, MAEDA R, SAITO A, SHIMAZAKI K, YAMAUCHI K, UZUKA Y, TANABE S, SARASHINA T, MIKAMI T. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *J Vet Med Sci* 2001; **63**: 187–190.
- [27] PAL A, HALL BS, JEFFRIES TR, FIELD MC. Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 2003; **374**: 443–451.
- [28] PONKA P, LOK CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Bioch Cell Biol* 1999; **31**: 1111–1137.
- [29] REYES-LÓPEZ M, SERRANO-LUNA JJ, NEGRETE-ABASCAL E, LEÓN-SICAÍROS N, GUERRERO-BARRERA AL, de la GARZA M. *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp Parasitol* 2001; **99**: 132–140.
- [30] RYU JS, CHOI HK, MINDYHA SE, AHN MH. Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 2001; **87**: 457–460.
- [31] STEVERDING D. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int* 2000; **48**: 191–198.
- [32] STEVERDING D. The significance of transferrin receptor variation in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol* 2003; **19**: 125–127.
- [33] TACHEZY J. More on iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1999; **15**: 207.
- [34] TANAKA T, ABE Y, INOUE N, KIM WS, KUMURA H, NAGASAWA H, IGARASHI I, SHIMAZAKI K. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *J Vet Med Sci* 2004; **66**: 619–625.

- [35] TANAKA T, ABE Y, KIM WS, XUAN X, NAGASAWA H, IGARASHI I, KUMURA H, SHIMAZAKI K. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Toxoplasma gondii*. *J Vet Med Sci* 2003; **65**: 1377–1380.
- [36] TRINDER D, BAKER E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism *Int J Bioch Cell Biol* 2003; **35**: 292–296.
- [37] WILSON ME, BRITIGAN BE. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1998; **14**: 348–353.
- [38] WILSON ME, LEWIS TS, MILLER MA, McCORMICK ML, BRITIGAN BE. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin requires an iron reductase. *Exp Parasitol* 2002; **100**: 196–207.
- [39] XIE H, HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-macrophages. *Dev Comp Immunol* 2002; **26**: 805–815.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 12.12.2004 r.

Przyjęto: 10.01.2005 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail: hdlugo@biol.uni.lodz.pl