

Received: 2015.03.11
Accepted: 2015.12.03
Published: 2015.12.31

Ewolucja *Plasmodium falciparum* – z punktu widzenia zarodźca malarii*

From malaria parasite point of view – *Plasmodium falciparum* evolution

Agata Zerka¹, Radosław Kaczmarek¹, Ewa Jaśkiewicz^{1,2}

¹Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Wrocław

²Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Zielonogórski, Zielona Góra

Streszczenie

Malaria jest chorobą pasożytniczą, spowodowaną przez zarażenie jednokomórkowym pierwotniakiem z rodzaju *Plasmodium*, który wywołuje największą presję selekcyjną na człowieka. Zarodźce malarii z rodzaju *Plasmodium* (typ *Apicomplexa*), zarażają nie tylko ludzi, ale również zwierzęta, w tym morskie bezkręgowce, płazy, gady, ptaki, gryzonie i małpy naczelne. Charakterystyczną cechą *Plasmodium* jest ich gatunkowa swoistość, dlatego różnorodność ich żywicieli, wskazuje na umiejętność zarodźca do przystosowywania się do wciąż nowych gatunków. Niezwykła ewolucja *Plasmodium*, rozpoczęła się przypuszczalnie od wolno żyjącej czerwonej algi, a zakończyła pasożytniczym życiem w czerwonej krwi człowieka. Badania małp człekokształtnych zamieszkujących Afrykę, dostarczyły nowych informacji na temat ewolucji zarodźców malarii, a zwłaszcza *P. falciparum*, gatunku powodującego największą śmiertelność wśród ludzi. Wykazano, że zarażający szympansy *P. reichenowi*, należy do najbliższego, siostrzanego taksonu ludzkiego *P. falciparum*. Początkowo uważano, że *P. falciparum* prawdopodobnie pochodzi od *P. reichenowi* i koewoluował wraz ze swoim gospodarzem już po rozdzieleniu się linii ludzi i szympansov, czyli około 6-7 mln lat temu. Jednak ostatnie badania wykazały duże zróżnicowanie gatunków *Plasmodium* krążących wśród afrykańskich małp człekokształtnych. Wśród nich zidentyfikowano zarodźca podobnego do ludzkiego *P. falciparum*, zarażającego goryle, który nazwano *P. praefalciparum*. Powstała konkurencyjna do teorii kospecjacji hipoteza wskazująca na początek ewolucji ludzkiego *P. falciparum* u goryli, która zakłada całkiem niedawny (około 10 tys. lat temu) transfer gorylego zarodźca na człowieka.

Badania dotyczące ewolucji *Plasmodium*, wiążą się z wyjaśnieniem mechanizmów umożliwiających *Plasmodium* ustawiczną zmianę gospodarza. Poznanie tych mechanizmów, odpowiedzialnych za swoistość zarodźca wobec gospodarza, a zwłaszcza człowieka, jest konieczne do opracowania skutecznych strategii walki z malarią.

Słowa kluczowe: *Apikomplexa* • *Plasmodium falciparum* • *Plasmodium reichenowi* • ewolucja

Summary

Malaria is caused by infection with protozoan parasites belonging to the genus *Plasmodium*, which have arguably exerted the greatest selection pressure on humans in the history of our species. Besides humans, different *Plasmodium* parasites infect a wide range of animal hosts, from marine invertebrates to primates. On the other hand, individual *Plasmodium* species show

*Praca została sfinansowana z grantu: MNSiW (nr N N302 281436).

high host specificity. The extraordinary evolution of *Plasmodium* probably began when a free-living red algae turned parasitic, and culminated with its ability to thrive inside a human red blood cell. Studies on the African apes generated new data on the evolution of malaria parasites in general and the deadliest human-specific species, *Plasmodium falciparum*, in particular. Initially, it was hypothesized that *P. falciparum* descended from the chimpanzee malaria parasite *P. reichenowi*, after the human and the chimp lineage diverged about 6 million years ago. However, a recently identified new species infecting gorillas, unexpectedly showed similarity to *P. falciparum* and was therefore named *P. praefalciparum*. That finding spurred an alternative hypothesis, which proposes that *P. falciparum* descended from its gorilla rather than chimp counterpart. In addition, the gorilla-to-human host shift may have occurred more recently (about 10 thousand years ago) than the theoretical *P. falciparum*-*P. reichenowi* split.

One of the key aims of the studies on *Plasmodium* evolution is to elucidate the mechanisms that allow the incessant host shifting and retaining the host specificity, especially in the case of human-specific species. Thorough understanding of these phenomena will be necessary to design effective malaria treatment and prevention strategies.

Key words: *Apikompleksa • Plasmodium falciparum • Plasmodium reichenowi • evolution*

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1192430>

Word count: 4592

Tables: –

Figures: –

References: 101

Adres autorki: dr hab. Ewa Jaśkiewicz, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; ewa.jaskiewicz@iitd.pan.wroc.pl

WPROWADZENIE

Malaria jest chorobą pasożytniczą, która trapi człowieka od początków jego historii aż do chwili obecnej. Wciąż stanowi globalny problem - jedna trzecia z siedmiu miliardów ludzi na Ziemi jest zagrożona zarażeniem zarodźcem malarii, rocznie notuje się około 200 milionów zachorowań oraz ponad milion zgonów, głównie wśród dzieci do lat pięciu na terenach subsaharyjskiej Afryki [98].

Za rozwój choroby jest odpowiedzialny jednokomórkowy pierwotniak, należący do rodzaju *Plasmodium*, który wraz z innymi pasożytami np.: *Toxoplasma*, *Cryptosporium* oraz *Babesia* zalicza się do typu *Apikompleksa* [32]. Nazwa typu pochodzi od dwóch słów: apex (czubek) oraz complexus (kompleks, zestaw) wynikających z podobnej budowy pasożytów, które zawierają zestaw struktur znajdujących się w apikalnym końcu komórki. Należą do nich: mikrotubule i organelle wydzielnicze (roprtie oraz mikronemy). Kompleks apikalny umożliwia pasożytom inwazję komórek gospodarza [60,75,76].

Zarodźce malarii z rodzaju *Plasmodium* zarażają nie tylko ludzi, ale również zwierzęta, w tym morskie bezkręgowce, płazy, gady, ptaki, gryzonia oraz naczelnice, które są żywicielami pośrednimi pasożytów należących do różnych gatunków, natomiast żywicielem ostatecznym

jest samica komara z rodzaju *Anopheles*, który obejmuje około 40 gatunków. Obecnie wyróżnia się około 5000 gatunków *Plasmodium* i liczba ta stale rośnie [48,101]. Spośród nich jedynie pięć gatunków: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* oraz *P. knowlesi* zaraża człowieka, powodując malarię, przy czym *P. vivax* jest odpowiedzialny za prawie 80% zachorowań, a *P. falciparum* za 90% zgonów [50].

Cechą charakterystyczną *Plasmodium* jest ich gatunkowa swoistość, co oznacza, że tylko wybrane gatunki zarodźca rozpoznają i zarażają określonych gospodarzy [68,93]. Biorąc pod uwagę tak dużą różnorodność żywicieli wymaga to wyjątkowej umiejętności zarodźca do zarażenia wciąż nowych organizmów, czyli ustawicznej zmiany gospodarza [48].

W artykule przedstawiono tę niezwykłą ewolucję *Plasmodium*, która rozpoczęła się przypuszczalnie od samowystarczalnej czerwonej algi, a zakończyła pasożytniczym życiem w czerwonej krwi człowieka [3,33].

OD ALGI DO NIETOPERZA

Odkrycie ponad 10 lat temu, że *Plasmodium* oraz inne *Apikompleksa* zawierają plastyd (apikoplast) [100] organelę komórkową odpowiedzialną za fotosyntezę u roślin i alg,

skierowało uwagę na ich nieoczekiwane pochodzenie. Apikoplast, który u *Apikomplexa* utracił zdolność do fotosyntezy, jest konieczny do ich przeżycia i zachował wiele genów umożliwiających analizę filogenetyczną [3,32,38]. Jednoznacznie wykazano, że plastyd *Apikomplexa* pochodzi od wspólnego przodka endosymbiotycznej czerwonej algi, której najbliższymi obecnymi krewnymi są symbiotyczne, fotosyntetyzujące algi z rodzaju *Chromera* i *Vitrella* żyjące w rafie koralowej i spokrewnione z morskimi pierwotniakami należącymi do typu *Dinoflagellata* [32,33]. Sugeruje się, że być może takie były początki pasożytniczego trybu życia czerwonych alg w komórkach koralowca, które następnie przekształciły się w obligatoryjne („bezwzględne”) pasożyty *Apikomplexa* w wyniku utraty i modyfikacji pierwotnych funkcji chloroplastów [38]. Wcześniejsza koncepcja zakładała, że to raczej jakiś przodek *Apikomplexa* zinternalizował algę, która stała się endosymbiontem straciwszy funkcje fotosyntetyczne, przy czym wskazywano zarówno na czerwoną jak i zieloną przedstawicielkę alg [3].

Najnowsza i najbardziej szczegółowa analiza genomu jądrowego alg *Chromera velia* oraz *Vitrella brassicaformis* nie tylko potwierdziła, że są blisko spokrewnione z *Apikomplexa*, ale pozwoliła na prześledzenie pięciu etapów zmian w genomie, które stopniowo umożliwiły aldze pasożytniczy tryb życia [101]. Wykazano nieprzypadkową utratę genów koniecznych dla organizmu wolno żyjącego, w tym genów kodujących enzymy głównych szlaków metabolicznych – fotosyntezy i syntezy steroli. Utracie genów towarzyszyła jednoczesna przebudowa genów kodujących białka zewnątrzkomórkowe oraz białka budulcowe flagelli – struktur odpowiedzialnych za ruch. To właśnie struktury flagelli stały się częścią kompleksu apikalnego umożliwiającego inwazję komórek gospodarza przez tzw. ruch „ślizgowy” (*gliding motility*). Oznacza to, że większość genów *Apikomplexa* było obecnych już u wolno żyjącej algi, a ich przebudowa przyczyniła się do powstania najsukcesywniejszej z grup eukariotycznych pasożytów.

Podobnie jak niezwykle początki *Apikomplexa* w rafie koralowej, również i dalsza ewolucja *Plasmodium* okazała się zaskakująca. Najnowsza analiza oparta na sekwencjonowaniu genów mitochondrialnych, jądrowych i apikoplastu dwóch gatunków pasożytów (*P. voltaicum* oraz *P. cyclopsi*) pochodzących od afrykańskich nietoperzy ujawniła, że ich najbliższymi krewnymi są pasożyty zarażające gryzonie [74]. Ze względu na daleki dystans ewolucyjny tych zwierząt sugeruje się, że musiała nastąpić zmiana gospodarza - z nietoperza na szczura nadrzewnego z gatunku *Thicket rat*, którą umożliwiło wspólne środowisko bytowania wraz z komarami z rodzaju *Anopheles*. Do potwierdzenia tej hipotezy konieczne jest wykazanie możliwości takiego transferu *Plasmodium* z nietoperzy na gryzonie laboratoryjne (szczury bądź myszy) [74]. Podobna zmiana gospodarza *Plasmodium* była sugerowana między ptakami i jaszczurkami [38,48,59], natomiast była nieznana w przypadku ssaków. A stąd już niedaleko do człowieka...

CZŁOWIEK - MÓJ CEL!

Prawdopodobnie najwięcej badań nad ewolucją *Plasmodium* dotyczy *P. falciparum*, gatunku, który powoduje największą śmiertelność z powodu malarii. Brakuje nadal informacji na temat początków ewolucji *P. ovale* i *P. malariae*, natomiast ostatnio wykazano, że *P. vivax* powstał w wyniku przeniesienia zarodźca z azjatyckich małp lub afrykańskich małp człekokształtnych na człowieka [43,63]. Ze względu na dużą zjadliwość *P. falciparum* od początku przypuszczano, że jest to gatunek zarodźca zarażający ludzi, który został nabyty przez transfer od gospodarza z innej linii ewolucyjnej [9]. Pierwsze filogenetyczne badania genów *Plasmodium* były zgodne z tym założeniem, ponieważ wykazywały, że *P. falciparum* jest bliżej spokrewniony z *P. gallinaceum*, zarodźcem zarażającym kurczaki, niż z tymi, które zarażają ssaki. Zaproponowano wtedy tezę, że *P. falciparum* ewoluował przez przeniesienie ptasiego zarodźca na człowieka, które mogło się odbyć w neolicie, gdy nastąpiło udomowienie kur [94]. Jednak niedługo później wyniki zostały podważone [48], a uwagę zwrócono ponownie na inne ssaki naczelne.

Najpierw był szympanś?

Wykazano, że najbliższym siostrzanym taksonem *P. falciparum* jest *P. reichenowi*, zarodziec wyizolowany od szympansa i morfologicznie prawie identyczny z ludzkim *P. falciparum* [15]. Ustalono również, że *P. falciparum* ewoluował niezależnie od pozostałych ludzkich zarodźców: *P. vivax* i *P. malariae* (a one niezależnie względem siebie). Ich rozdzielenie ewolucyjne znacznie wyprzedzało pochodzenie człekokształtnych [24,25]. Na podstawie analizy mitochondrialnego cytochromu B (*cytB*), potwierdzono doniesienia o bliskim pokrewieństwie *P. falciparum* i *P. reichenowi*, odrębność od innych ludzkich zarodźców oraz odległości filogenetyczne od ptasich i gadzich *Plasmodium* [26,61].

Pojawiło się zatem kolejne pytanie: który zarodziec był pierwszy: *P. falciparum* czy *P. reichenowi*? W pierwszych doniesieniach skłaniano się ku hipotezie kospecjacji, która zakłada, że oba zarodźce mają wspólnego przodka, ale po rozdzieleniu się linii ludzkiej i naczelnych, ewoluowały niezależnie wraz z ludźmi i szympanсами, przez ostatnie 5-7 milionów lat [22,23,24,57]. Niestety, w tamtym czasie, dwie alternatywne hipotezy:

- początek u ludzi (*P. reichenowi* ewoluował przez wprowadzenie *P. falciparum* do szympansięgo gospodarza) oraz
- początek u szympansa (*P. falciparum* ewoluował przez wprowadzenie *P. reichenowi* do linii ludzkiej)

nie mogły być zweryfikowane względem siebie oraz z teorią kospecjacji, ze względu na dostępność pojedynczego izolatu *P. reichenowi* (CDC1), pozyskanego od szympansa w niewoli [16].

Niedługo potem wykazano, że ludzki *P. falciparum* ma bardzo niski poziom neutralnego polimorfizmu [6,65,67], któ-

ry może być spowodowany pojawieniem się *P. falciparum* na świecie stosunkowo niedawno – tylko kilka tysięcy lat temu [67]. W 2005 r. Varki i wsp. zaproponowali i udowodnili doświadczalnie hipotezę zgodną z tym założeniem, opartą na różnicy w rodzaju kwasu sjałowego, cukru, który znajduje się na powierzchni erytrocytów i innych komórek gospodarza – człowieka i małp [46]. Wiadomo, że biochemiczna zmiana w biosyntezie kwasu sjałowego w linii ludzkiej, z kwasu N-glikolyloneuraminowego (Neu5Gc) na jego prekursor kwas N-acetylonauraminowy (Neu5Ac) nastąpiła już po oddzieleniu się naszego wspólnego przodka od szympanów, około 2,8 miliona lat temu [90]. W wyniku mutacji enzymu - hydroksylazy (CMAH) odpowiedzialnej za syntezę kwasu Neu5Gc przez hydroksylację kwasu Neu5Ac, ludzie nie mają kwasu Neu5Gc [88,89]. Stąd ludzkie erytrocyty zawierają tylko kwas Neu5Ac, podczas gdy małpie erytrocyty, mają mieszaninę obu typów kwasów sjałowych, z przewagą ilościową kwasu Neu5Gc [51]. Wymienieni autorzy wykazali że *P. reichenowi* preferencyjnie wiąże kwas Neu5Gc, który jest kwasem dominującym na erytrocytach szympanich, natomiast *P. falciparum* preferencyjnie wiąże kwas Neu5Ac, jedyny kwas neuraminowy obecny na ludzkich erytrocytach [46]. Oznaczało to różną swoistość obu zarodźców. Autorzy zasugerowali, że wspólny przodek *P. falciparum*/*P. reichenowi* był bardziej podobny do małpiego *P. reichenowi*, który preferuje kwas Neu5Gc nad kwasem Neu5Ac. Dlatego też, utrata kwasu Neu5Gc w linii ludzkiej, po mutacji genu CMAH około 3 miliony lat temu [14], mogła zapewnić świeżo wyłaniającym się ludzkim przodkom, czasowe uwolnienie od malarii. Niestety, w neolicie (około 10 000 lat temu) pojawił się w wyniku mutacji ludzki *P. falciparum* wykazujący zmienioną zdolność do wiązania bogatych w kwas Neu5Ac ludzkich erytrocytów, co mogło być przypuszczalnie przyczyną jego dużej zjadliwości [46].

Do maja 2009 r. *P. reichenowi* był jedynym znanym bliskim krewnym ludzkiego *P. falciparum* i jedynym gatunkiem podejrzanym o bycie jego przodkiem. Zmiany w postrzeganiu różnorodności wśród zarodźców zarażających afrykańskie małpy, zapoczątkowali Ollomo i wsp. [56], którzy opublikowali kompletny mitochondrialny genom nowego, wcześniej jeszcze nieopisanego gatunku *Plasmodium*, krążącego wśród małp człekokształtnych i należącego do linii *P. falciparum*/*P. reichenowi*. Nowy gatunek, nazwany *P. gaboni*, został wyizolowany od dwóch dzikich szympanów, trzymany jako zwierzęta domowe w wiosce w Gabonie (Afryka Centralna). Bazując na hipotezie kospecjacji, Ollomo zaproponował, że *P. gaboni* oddzielił się od linii *P. reichenowi* około 21 milionów lat temu, co nasuwa wniosek, że przodek kladu zarodźca afrykańskich małp człekokształtnych i ludzi (również znany jako podrodzaj *Laverania* [10]), mógł być wcześniej obecny wśród człekokształtnych [56].

Rich i wsp. podjęli kolejną próbę wyjaśnienia pochodzenia *P. falciparum*, na podstawie filogenetycznej zależności z *P. reichenowi* oraz porównania ich poziomu genetycznego polimorfizmu, zwłaszcza w odniesieniu do nukleotydów wyciszonych, które gromadzą się w zależności od szybko-

ści mutacji oraz czasu, który upłynął od rozdzielenia się gatunków [66]. Do analiz wykorzystano tkanki pobrane od 10 dziko żyjących lub narodzonych dziko szympanów z Wybrzeża Kości Słoniowej oraz 84 z Kamerunu. Na podstawie analizy mitochondrialnego *cytB*, apikoplastowego *clpC* oraz jądrowego 18S rRNA, udało się zidentyfikować 8 nowych izolatów *P. reichenowi* [66]. Niektóre z nich były genetycznie bardzo zbliżone do opisanego wcześniej *P. gaboni*. Znaleziono znacznie większy polimorfizm wśród szczepów *P. reichenowi* w porównaniu do pochodzących z całego świata 133 szczepów *P. falciparum*. Stwierdzono również, że wszystkie szczepy *P. falciparum* wywodzą się prawdopodobnie od jednego szczepu *P. reichenowi*, co bardzo przemawiało za hipotezą, że *P. falciparum* ewoluował na skutek wprowadzenia *P. reichenowi* do linii ludzkiej, w wyniku pojedynczego zdarzenia, które zaistniało prawdopodobnie około 10 000 lat temu [5]. Wyniki te podważyły hipotezę kospecjacji zakładającą, że *P. falciparum* i *P. reichenowi* oddzieliły się w tym samym czasie co odpowiadający im gospodarze (ludzie i szympany), między 5-7 milionów lat temu, natomiast były zgodne z wcześniejszą hipotezą grupy Varkiiego [46], mówiącej o dwóch kolejnych mutacjach, pierwszej - u ludzi, dotyczącej utraty kwasu Neu5Gc (2-3 mln lat temu) i kolejnej, dotyczącej zmiany swoistości zarodźca (5-10 tys. lat temu).

A może jednak goryl?

Pozyskiwanie nowego materiału do badań nie było łatwym zadaniem, ponieważ dziko żyjące małpy są ściśle chronione i pobranie krwi czy próbek tkanek jest możliwe tylko w określonych przypadkach (np. podczas badań kontrolnych zwierząt trzymany w niewoli). Rewolucja nastąpiła w 2010 r., kiedy to po raz pierwszy Prugnolle i wsp. opublikowali wyniki oparte na badaniu materiału pozyskanego nową, nieinwazyjną metodą [62]. Wykazano, że sekwencje DNA *Plasmodium* są obecne w odchodach małp człekokształtnych. Odkrycie to pozwoliło na zbadanie większej liczby próbek pochodzącym od zwierząt żyjących w ich naturalnym środowisku, a to przyczyniło się do znacznego poszerzenia wiedzy na temat pochodzenia *P. falciparum*.

Badania ponad 200 próbek kału dziko żyjących szympanów i goryli, zebranych w 8 odrębnych miejscach na terenach Kamerunu, wykazały duże rozpowszechnienie zarażeń *Plasmodium* wśród małp w ich naturalnym środowisku [62]. Potwierdzono również występowanie *P. reichenowi* i *P. gaboni* wśród dziko żyjących szympanów oraz wykazano, że oba gatunki powszechnie występują na terenach Afryki i zarażają więcej niż jeden podgatunek szympansa (*Pan troglodytes troglodytes*, *Pan troglodytes verus* oraz *Pan troglodytes vellerosus*). U goryli po raz pierwszy zidentyfikowano dwie unikalne, wcześniej nieznanie linie zarodźca, które nazwano *P. GorB* (tworzący wspólny klastery z *P. falciparum* i *P. reichenowi*) i *P. GorA* (spokrewniony z *P. gaboni*). Wykazanie, że *P. falciparum* znajduje się w kladzie, który zawiera *P. reichenowi* oraz *P. GorB*, pozwoliło na potwierdzenie teorii, że *P. falciparum* pochodzi od szympaniego *P. reichenowi*. Jednak, autorzy zidentyfikowali również *P.*

falciparum w dwóch próbkach kału goryli różnych podgatunków (*Gorilla gorilla diehli* oraz *Gorilla gorilla gorilla*). Odkrycie było zaskakujące, ponieważ wcześniej uważano, że *P. falciparum* zaraża wyłącznie ludzi. Ponadto, nie wykazano różnic genetycznych w częściowej sekwencji *cytB*, między *P. falciparum* krążącym wśród ludzi, a zarażającym goryle, co sugerowało możliwość transferu między ludźmi a gorylami. Przeprowadzone badania nie pozwalały jednak na jednoznacznie stwierdzenie, czy goryle zaraziły się od ludzi lub innych naczelnych, czy odwrotnie. Jednak, po raz pierwszy zidentyfikowano zarodźca podobnego do *P. falciparum* w gospodarzu innym niż człowiek.

Wkrótce potwierdzono różnorodność gatunków *Plasmodium* wśród małp człekokształtnych zamieszkujących Afrykę. Zidentyfikowano dwie oddzielne linie zarodźca zarażającego szympansy, z których pierwszą – *P. billocollinsi*, umiejscowiono między *P. falciparum* i *P. reichenowi*, a drugą *P. billbrayi*, określono jako bliską ewolucyjnie *P. gaboni* [39]. Potwierdzono również występowanie *P. GorB* i *P. falciparum* u goryli oraz *P. gaboni* i *P. reichenowi* u szympansov [22]. Po raz pierwszy wykazano obecność *P. falciparum* u bonobo [39] oraz u dwóch szympansov przebywających w rezerwatach (podgatunki *P. t. vllerosus* oraz *P. t. troglodytes*) [22].

Przez ostatnie pięć lat hipotezy pochodzenia *P. falciparum* zmieniały się kilkakrotnie (pochodzenie od szympansa, bonobo lub goryla), w zależności od analizowanego gatunku gospodarza, odkrytej linii *Plasmodium* lub danych wybranych do analizy. W świetle przedstawionych faktów, wydaje się pewne, że *P. falciparum* nie pojawił się przez transfer od ptaków, jaszczurek lub gryzoni, ale pochodzi od niektórych linii *Plasmodium*, które ewoluowały wśród afrykańskich małp człekokształtnych.

Przełomem w badaniach nad ewolucją *P. falciparum* stały się badania Liu i wsp. opublikowane w 2010 r., które niezbicie wykazały, że to goryle stanowią rezerwuuar *P. falciparum*, a wszystkie szczepy występujące u ludzi pochodzą z pojedynczej krzyżowej transmisji zarodźca z goryla na człowieka [42]. Praca wydaje się przekonująca, ze względu na bardzo dużą kolekcję próbek kału (prawie 3000), pochodzących od dziko żyjących małp Centralnej Afryki, włączając trzy podgatunki szympansov (*P. t. troglodytes*, *P. t. troglodytes ellioti* znany również jako *P. t. vllerosus* oraz *P. t. schweinfurthii*), bonobo oraz dwa podgatunki goryli (*G. gorilla gorilla* oraz *G. gorilla graueri*). Zastosowana metodologia, umożliwiła badanie małp zarażonych mieszanymi szczepami *Plasmodium*. Na tej podstawie grupa Liu wykazała istnienie sześciu gatunków *Plasmodium* należących do podrodzaju *Laverania*: trzech wśród szympansov (*P. gaboni*, *P. billcollinsi* i *P. reichenowi*) oraz trzech u goryli (*P. gorA*, *P. gorB* i *P. praefalciparum*). Potwierdzono występowanie zarodźca podobnego do *P. falciparum* u goryli, nazwanego *P. praefalciparum*, który wykazuje większe zróżnicowanie genetyczne niż izolowany od ludzi. Nie wykazano natomiast obecności *P. falciparum* u szympansov i bonobo. Praca ta jednoznacznie wykazała, że ludzki *P. falciparum* pochodzi od gorylego przodka – *P. praefalciparum* [42].

Czy już wszystko wiemy?

Chociaż teoria przedstawiona przez grupę Liu wydaje się bardzo prawdopodobna, potrzeba więcej danych, aby potwierdzić, że *P. falciparum* ma swoje, całkiem niedawne początki u goryli. Obecnie, nie jest możliwe definitywne wykluczenie alternatywnych hipotez.

Zgodnie z reanalizą filogenetyczną opartą o wyniki Rich i wsp. [66], Ollomo i wsp. [56] oraz Prugnolle i wsp. [62] przeprowadzoną przez Hughes i Verra [31] wciąż rozważa się możliwość, że *P. falciparum* oddzielił się od *P. reichenowi*, w chwili rozdzielenia linii szympansov i ludzi. Mała różnorodność genetyczna obserwowana u obecnie wyizolowanych ludzkich *P. falciparum* (w porównaniu do obserwowanej u goryli) może być natomiast wynikiem niedawnych zjawisk demograficznych [81]. Mimo dużej liczby zbadanych próbek przez Liu i wsp. [42], nadal istnieje możliwość, że szczepy pokrewne do *P. falciparum* krążą wśród innych afrykańskich małp człekokształtnych (szympansov i bonobo) jak wskazał Duval [22] i Krief [39], ale występują mniej powszechnie [30].

Ponadto, uwzględniając zdolność rodzaju *Plasmodium* do zmiany jednego gospodarza na innego – jak w przypadku przeniesienia *P. knowlesi* z makaków na ludzi [36,37,78,91] oraz wymianie *P. vivax* między ludźmi a małpami zamieszkującymi Południową Afrykę [83], nie można wykluczyć, że szczepy pokrewne *P. falciparum* lub inne linie *Laverania* nie zarażają w Afryce innych naczelnych (poza ludźmi). Jednak grupa Liu stwierdziła, że nie ma dowodów na krzyżowe zarażenie zarodźcami swoistymi dla szympansov i goryli, chociaż wiele z nich zaraża małpy człekokształtne na tym samym terytorium, a to ponownie potwierdza swoistość zarodźców *Laverania* [42].

W 2015 r. ukazało się doniesienie dowodzące, że gatunki *Plasmodium* infekujące ssaki współistniały i ewoluowały jednocześnie wraz ze swoimi gospodarzami, czyli potwierdzające hipotezę kospecjacji [77]. Nawet jeśli dochodziło do krzyżowych transmisji między ludźmi i innymi naczelnymi, nie ma dowodów na to, by było to częste zjawisko. Ponadto, w przeprowadzonych ostatnio badaniach ponad 4000 próbek krwi pobranych od ludzi zamieszkujących wioski w Gabonie, z których u 1674 zidentyfikowano *Plasmodium*, nie wykazano obecności żadnego z 6 gatunków *Laverania* krążących wśród małp człekokształtnych. Pomimo że Gabon zamieszkuje duża część wszystkich zachodnioafrykańskich szympansov oraz goryli, w próbkach pobranych od ludzi żyjących w lasach, a więc bezpośrednio narażonych na krzyżowe transmisje, zidentyfikowano tylko ludzkie *Plasmodium*, w tym *P. falciparum*, *P. malariae* i *P. ovale* [21]. Podobne wyniki uzyskano badając mniejszą liczbę próbek pochodzącą od populacji zamieszkujących Kamerun [80]. Natomiast dawniej przeprowadzone eksperymenty wykluczyły możliwość zarażenia się szympansov od ludzi. Wykazano, że zainfekowana *P. falciparum* ludzka krew, po podaniu szympansom nie powoduje zachorowania na malarię [15]. Nawet przeprowadzenie splenektomii, która miała na celu zwiększenie

przeżywalności zarodźca u zarażonych szympanów, nie spowodowało rozwoju parazytemii porównywalnej do obserwowanej u ludzi [82]. Ponadto, szympany trzymane w niewoli w Gabonie (Afryka Centralna) nie zarażały się *P. falciparum*, pomimo wysokiego poziomu zarażenia wśród ich opiekunów oraz faktu, że były ekspozowane na ten sam wektor przenoszący *P. falciparum* [57]. Wszystkie argumenty przemawiają przeciwko możliwości przeniesienia *Plasmodium* między małpami i ludźmi natomiast wspierają hipotezę koewolucji zarodźca wraz z gospodarzem-człowiekiem, która doprowadziła do powstania mechanizmów odpowiedzialnych za jego restrykcyjną swoistość wobec człowieka. Powstaje zatem kolejne pytanie: jakie są molekularne podstawy tej swoistości?

SWOISTOŚĆ WOBEC GOSPODARZA

Równoległe do badań dotyczących ewolucji *Plasmodium*, uwaga badaczy skupiła się na zrozumieniu mechanizmów inwazji zarodźca na erythrocyty gospodarza - w tym człowieka i szympana. Wykazano, że chociaż genomy zarodźca ludzkiego (*P. falciparum*) i szympaniego (*P. reichenowi*) są bardzo podobne, to główne różnice dotyczą genów kodujących białka zaangażowane w proces inwazji erythrocytów gospodarza [58]. Rozpoznanie erythrocytów przez merozoity, jest zależne od ich białek należących do dwóch rodzin: ligandów wiążących erythrocyty (EBL, Erythrocyte-Binding Ligands) oraz ligandów wiążących retikulocyty (RBL, Reticulocyte-Binding Ligands) [27,28,34,84]. Biorąc pod uwagę znalezione różnice w obu genomach zaproponowano, że to właśnie zmiany w sekwencji i układzie genów EBL oraz RBL mogą być bezpośrednio związane z przystosowaniem się *Plasmodium* do nowego gospodarza [58].

Plasmodium falciparum ma kilka białek należących do rodziny EBL, które umożliwiają merozoitom oddziaływanie z receptorami ludzkich erythrocytów. Zidentyfikowano cztery funkcjonalne antygeny wiążące erythrocyty (EBA, Erythrocyte Binding Antigens), odpowiedzialne za niezależne szlaki inwazji: antygen EBA-175, EBA-140, EBA-181 oraz ligand EBL-1 [1]. Wszystkie zawierają konserwatywne regiony łańcucha polipeptydowego, takie jak region II, który jest zaangażowany w wiązanie receptora na erythrocytach. Struktura liganda EBA-175 *P. falciparum* jest dobrze poznana [86]. Wykazano, że rozpoznaje reszty kwasu sjałowego cukrowych łańcuchów O-glikozydowych przyłączonych do błonowej glikoforyny A (GPA) ludzkich erythrocytów [34,73,92]. Ostatnio zidentyfikowany ligand EBA-140 [41,52,85] odpowiada za zależne od kwasu sjałowego wiązanie glikoforyny C (GPC) - innej glikoproteiny erythrocytów [35,44,70,71,72]. Receptorami liganda EBA-140 są prawdopodobnie klastery N- i O-usjałowanych glikanów na cząsteczce GPC [4,49]. Homologiczne ligandy EBL, w tym białka EBA-175 i EBA-140, zostały zidentyfikowane u *P. reichenowi* [64]. Ustalono, że sekwencja aminokwasowa ligandów EBA-140 pochodzących od *P. falciparum* i *P. reichenowi* jest w 81% identyczna i w 86% konserwatywna szczególnie w regionie II, odpowiedzialnym za wiązanie erythrocytów. Ustalono jednak, że ligan-

dy EBA-175 oraz EBA-140 pochodzące od *P. falciparum* i *P. reichenowi*, wykazują różną preferencję wiązania kwasu sjałowego obecnego na erythrocytach ludzkich (Neu5Ac) i szympanich (Neu5Gc), jak opisano wcześniej [46].

Stało się to podstawą hipotezy, że głównym mechanizmem determinującym swoistość zarodźca wobec gospodarza jest oddziaływanie między ligandem EBA-175 merozoitów oraz receptorem erythrocytów - kwasem Neu5Ac na ludzkiej glikoforynie A [46]. Jednak ostatnio zakwestionowano to przez grupę Wrighta [93], która wykazała, że ortolog EBA-175 *P. reichenowi* (zarodźca szympana), wiąże ludzką GPA z powinowactwem podobnym do liganda EBA-175 *P. falciparum*. Dlatego też zasugerowano, że oddziaływanie EBA-175-GPA nie jest jedynym wyznacznikiem swoistości *P. falciparum* wobec człowieka. Natomiast wykazano, że podstawowym dla swoistości wiązania jest oddziaływanie innego liganda RBL- białka RH5 z basiginą (BSG) obecną na erythrocytach [93].

Istnieje też inna hipoteza, dotycząca rozróżnienia erythrocytów człowieka i małp przez ligandy merozoitów, która zakłada pojawienie się nowego receptora dla liganda EBA-140 *P. falciparum* - glikoforyny C na ludzkich erythrocytach [99]. Glikoforyna C jest kodowana u ludzi przez gen *GYP C*, który koduje dwa białka: GPC oraz jej skróconą o 21 aminokwasów formę - glikoforynę D (GPD). Ich translacja przebiega z jednego transkryptu mRNA, ale rozpoczyna się od dwóch oddzielnych kodonów startowych [40]. Wilder i wsp. [99] poznali sekwencję regionu kodującego genu *GYP C* sześciu gatunków należących do człekokształtnych: człowieka, szympana, bonobo, goryla, orangutana oraz gibona. Ustalono, że miejsce startu translacji dla GPC jest obecne tylko u ludzi, natomiast nie ma go u małp naczelnych, u których jedynym produktem białkowym jest GPD. Jest to wynikiem transwersji cytozyny na adeninę, która spowodowała powstanie nowego kodonu startowego dla GPC u człowieka. Tylko GPC, a nie GPD, pełni rolę receptora na erythrocytach ludzkich w inwazji *P. falciparum* z udziałem szlaku zależnego od liganda EBA-140 [35,44,45,70]. Pojawienie się nowego receptora - GPC na ludzkich krwinkach, może stanowić uzasadnienie dla swoistości oraz większej zjadliwości *P. falciparum* u ludzi.

WZAJEMNA PRESJA EWOLUCYJNA

Od dawna wiadomo, że zarodziec malarii wywołuje największą presję selekcyjną na człowieka w jego najnowszej historii ewolucji. Ludzki genom zmienia się, aby uwolnić się lub ograniczyć podatność na chorobę odpowiedzialną za dużą śmiertelność. Wśród tych zmian można wyróżnić: anemię sierpowatą, talasemię [95], niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) [2], pojawienie się nowych antygenów, takich jak HLA-B53, który prezentuje antygeny wątrobowych postaci zarodźców i sporozoitów komórkom T [29]. Antygeny grupowe krwi również odgrywają znaczącą rolę w oddziaływaniach zarodźca z komórkami gospodarza [20]. Przykładem jest antygen Duffy, który jest wyłącznym receptorem dla *P. vivax*, umożliwia-

jącym mu wniknięcie do krwinki. U niektórych ludzi antygen Duffy nie podlega ekspresji, co zapewnia całkowitą odporność na zarażenie *P. vivax*. Fenotyp ten jest rozpowszechniony wśród rdzennej ludności zachodniej i środkowej Afryki, najprawdopodobniej z powodu dużego narażenia na inwazje *P. vivax* w ostanich kilkuset latach [12].

Plasmodium również ewoluuje, czego dowodem jest powstanie gatunku o bardzo dużej zjadliwości, jakim jest *P. falciparum*. Natomiast przykładem już nie tak odległych zmian jest nabywanie przez zarodźce, od kilkudziesięciu lat, odporności na powszechnie stosowane leki antymalaryczne, przez co opracowanie skutecznego leku pozostaje wciąż wyzwaniem. Chinina, najstarszy antymalaryczny lek pochodzenia naturalnego, była stosowana już od 1600 r. w postaci sproszkowanej kory drzewa chinowego (*Cinchona officinalis*), a w czystej postaci od 1820 r. [19]. Z powodu działań niepożądanych oraz postępującą oporność jej stosowanie ogranicza się do przypadków ciężkiej malarii wywołanej *P. falciparum*.

Pierwszą syntetyczną pochodną chininy powszechnie używaną do walki z malarią od 1946 r. była chlorochina (4-aminochinolina) [13]. Stosowano ją na wszystkich trzech, głównych obszarach występowania malarii: Afryce (głównie *P. falciparum* i *P. vivax*), Azji południowo-wschodniej i wyspach Pacyfiku (głównie *P. vivax* i *P. falciparum*) oraz Ameryce Południowej i Środkowej (głównie *P. vivax* i *P. falciparum*). Jej działanie polega na blokowaniu przekształcenia toksycznych dimerów hematyny (produktu degradacji hemu) do bezpiecznych dla zarodźca kryształów hemozyny, w wakuoli trawiennej zarodźca, która po zarażeniu wypełnia erytrocyt [79]. Główną przyczyną wykształcenia oporności *P. falciparum* na chlorochinę jest prawdopodobnie mutacja w genie *pfcr*, który koduje białko PfCRT (*P. falciparum* Chloroquine Resistant Transporter). Zmieniony transporter skutecznie usuwa chlorochinę i prawdopodobnie też inne chinoliny z wakuoli trawiennej [17,47]. Pojawienie się oporności *P. vivax* na chlorochinę w Indonezji spowodowało wycofywanie jej stosowania również w przypadku malarii wywołanej przez ten gatunek zarodźca [7]. Do zwalczania *P. vivax* oraz *P. ovale* stosuje się obecnie chlorochinę z primachiną (8-aminochinolina), która zabija pasożyty na etapie wątrobowym oraz hipnozoity odpowiedzialne za powracające epizody malarii [19].

Innymi skutecznymi lekami antymalarycznymi były antyfoliany, stosowane od lat czterdziestych ub.w. [55]. Oporność na antyfoliany *P. falciparum* i *P. vivax* pojawiła się w Azji (na wyspach Pacyfiku) oraz w Południowej Ameryce już w latach 70 ub.w., a następnie rozprzestrzeniła się w Afryce [19]. Pirymetamina razem z sulfadoksyną hamują rozwój *Plasmodium* przez blokowanie syntezy kwasu foliowego. Mutacja w genie *dhfr* kodującym reduktazę dihydrofolianową (DHFR) [11,18] jest przyczyną wystąpienia oporności na antyfoliany. Ponadto pirymetamina/sulfadoksyna zwiększa gemetocytozę [8], dlatego stosowanie ich w przypadku szczepów opornych może się przyczyniać do rozprzestrzeniania lekooporności wśród

Plasmodium. Obecnie, związek z grupy inhibitorów DHFR – proguanil wraz z inhibitorem transportu elektronów (naftochinon, atowakwon) jest stosowany jako Malarone w profilaktyce i leczeniu malarii wywołanej *P. falciparum* [19].

Z powodu pojawienia się oporności na wymienione leki, od połowy 2000 r. skuteczne zwalczanie malarii, w większości rejonów występowania choroby, w tym przede wszystkim w Afryce, opiera się głównie na łączeniu artemizyniny lub jej pochodnych (artemeter, artesunat, dihydroartemizynina) ze środkami farmaceutycznymi należącymi do innych grup leków (ACT, Artemisinin-based combination therapy) [23]. Artemizyninę, substancję naturalną, otrzymano w latach 70 ub.w. z bylicy rocznej (*Artemisia annua*), co z powodu ważnego znaczenia w walce z malarią uhonorowano w tym roku Nagrodą Nobla. Światowa organizacja zdrowia (WHO) nie zaleca jednak stosowania leków z grupy artemizynin poza terapią kombinowaną, ze względu na obawę przed wytworzeniem lekooporności na tę ważną i skuteczną grupę leków. Artemizyniny są przede wszystkim skuteczne w walce z ciężką malarią, ale mają krótki okres półtrwania w organizmie. Połączenie z długo działającymi lekami należącymi do innych grup (m.in. lumefantryną, amodiachiną, meflochiną, piperachiną, pyronaridyną, sulfadoksyną/pirymetaminą), zwiększa skuteczność terapii oraz zabezpiecza przed wystąpieniem oporności na artemizyniny [54]. Terapia może się jednak wkrótce nie sprawdzić w regionach, w których zarodziec nabył oporność na leki obecne w podawanej mieszaninie, ponieważ już w 2008 r. pojawiły się pierwsze doniesienia o oporności na artemizyninę na granicy Kambodży i Tajlandii [53]. Tylko ciągła obserwacja i ocena skuteczności leków wchodzących w skład ACT, może umożliwić wybór odpowiedniej terapii w regionach z udokumentowaną lekoopornością na składniki ACT, a przez to zastosowanie skutecznego leczenia [19].

Nigdy nie wiadomo, kiedy zarodziec uodporni się na obecnie stosowane leki, istnieje więc ciągła potrzeba opracowywania nowych leków antymalarycznych. Dlatego też zamiast walczyć z inwazją pasożytów, lepszym rozwiązaniem jest jej zapobieganie. W ramach profilaktyki zalecane jest stosowanie moskitier, oprysków owadobójczych oraz prewencyjnych chemioterapeutyków. Innym rozwiązaniem byłoby otrzymanie szczepionki chroniącej populacje zagrożone przed chorobą. Obecnie w badaniach klinicznych oraz w zaawansowanych badaniach przedklinicznych jest ponad 20 szczepionek podjednostkowych [97]. Najbardziej obiecującą szczepionką przeciwko *P. falciparum* jest RTS,S/AS01. Trzecia faza badań klinicznych (zakończona w kwietniu 2015 r.) została przeprowadzona w dwóch grupach dzieci (5-17 miesięcy oraz 6-12 tygodni), w siedmiu krajach Afryki Subsaharyjskiej (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenia, Malawi, Mozambik, Zjednoczona Republika Tanzanii). W obu badanych grupach, najlepszy wynik chroniący przed ciężką malarią, uzyskano po podaniu czterech dawek w 0, 1, 2, i 20 miesiącu badania. W przypadku dzieci w wieku 5-17 miesięcy, osiągnięto 39% skuteczność

przeciwno malarii klinicznej przez cały czas trwania badania oraz 31,5% ochrony przed ciężką malarią (w tym redukcję ciężkiej anemii oraz konieczności hospitalizacji). W drugiej grupie dzieci młodszych nie wykazano znaczącej skuteczności szczepionki przeciwko ciężkiej malarii, natomiast ochrona przed malarią kliniczną wynosiła 27% [69,96]. Obecnie Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) powołała grupę ekspertów, której zadaniem jest ocena bezpieczeństwa, skuteczności i zasadności wprowadzenia na rynek szczepionki RTS,S/AS01. Oficjalne stanowisko WHO znane będzie pod koniec 2015 r.

WYZWANIA NA PRZYSZŁOŚĆ

Badania małych człekokształtnych zamieszkujących Afrykę, wykazały duże zróżnicowanie gatunków *Plasmodium*

krążących wśród naszych najbliższych krewnych oraz dostarczyły nowych informacji na temat ewolucji ludzkich zarodźców malarii, a zwłaszcza *P. falciparum*. Dalsze poznanie biologii, ekologii i ewolucji gatunków *Plasmodium* zarażających naczelną, w tym człowieka, wymagać będzie współpracy wielu ludzi nauki, między innymi antropologów, entomologów oraz biologów ewolucyjnych i molekularnych.

Jednym z najważniejszych zadań będzie wyjaśnienie - jak w trakcie ewolucji *P. falciparum* przystosował się do zarażania człowieka. Zrozumienie molekularnych podstaw zmiany gospodarza stwarza bowiem podstawy do opracowania skutecznych strategii walki z coraz skuteczniejszym pasożytem.

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] Allison A.C., Clyde D.F.: Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Br. Med. J., 1961; 1: 1346-1349
- [3] Arisue N., Hashimoto T.: Phylogeny and evolution of apicomplexans and apicomplexan parasites. Parasitol. Int., 2015; 64: 254-259
- [4] Ashline D.J., Duk M., Lukaszewicz J., Reinhold V.N., Lisowska E., Jaskiewicz E.: The structures of glycoprotein C N-glycans, a putative component of the GPC receptor site for *Plasmodium falciparum* EBA-140 ligand. Glycobiology, 2015; 25: 570-581
- [5] Ayala F.J., Escalante A.A., Rich S.M.: Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. Parasitologia, 1999; 41: 55-68
- [6] Ayala F.J., Rich S.M.: Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. Gene, 2000; 261: 161-170
- [7] Baird J.K.: Resistance to chloroquine unhinges vivax malaria therapeutics. Antimicrob. Agents Chemother., 2011; 55: 1827-1830
- [8] Barnes K.I., Little F., Mabuza A., Mngomezulu N., Govere J., Durheim D., Roper C., Watkins B., White N.J.: Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. J. Infect. Dis., 2008; 197: 1605-1613
- [9] Boyd M.F.: Malariology: a comprehensive survey of all aspects of this group of disease from a global standpoint. Saunders, Philadelphia, 1949
- [10] Bray R.S.: The malaria parasites of anthropoid apes. J. Parasitol., 1963; 49: 888-891
- [11] Bzik D.J., Li W.B., Horii T., Inselburg J.: Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 8360-8364
- [12] Carter R., Mendis K.N.: Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. Clin. Microbiol. Rev., 2002; 15: 564-594
- [13] CDC - Centers for Disease Control and Prevention: CDC - Malaria - About Malaria - History. <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/#chloroquine> (30/08/2015)
- [14] Chou H.H., Takematsu H., Diaz S., Iber J., Nickerson E., Wright K.L., Muchmore E.A., Nelson D.L., Warren S.T., Varki A.: A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95: 11751-11756
- [15] Coatney G.R., Collins W.E., Warren M., Contacos P.G.: The Primate Malaria. U.S. Government Printing Office, Washington DC, 1971
- [16] Collins W.E., Skinner J.C., Pappaioanou M., Broderson J.R., Mehafeff P.: The sporogonic cycle of *Plasmodium reichenowi*. J. Parasitol., 1986; 72: 292-298
- [17] Cooper R.A., Lane K.D., Deng B., Mu J., Patel J.J., Wellems T.E., Su X., Ferdig M.T.: Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. Mol. Microbiol., 2007; 63: 270-282
- [18] Cowman A.F., Morry M.J., Biggs B.A., Cross G.A., Foote S.J.: Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988; 85: 9109-9113
- [19] Cui L., Mharakurwa S., Ndiaye D., Rathod P.K., Rosenthal P.J.: Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2015; 93 (Suppl. 3): 57-68
- [20] Czerwiński M.: Grupy krwi - minusy i plusy. Czy antygeny grupowe krwi chronią nas przed chorobami zakaźnymi? Postępy Hig. Med. Dośw., 2015; 69: 703-722
- [21] Délicat-Loembet L., Rougeron V., Ollomo B., Arnathau C., Roche B., Elguero E., Moukoudoum N.D., Okougha A.P., Mve Ondo B., Boudenga L., Houzé S., Galan M., Nkoghé D., Leroy E.M., Durand P., Paupy C., Renaud F., Prugnolle F.: No evidence for ape *Plasmodium* infections in humans in Gabon. PLoS One, 2015; 10: e0126933
- [22] Duval L., Fourment M., Nerrienet E., Rousset D., Sadeuh S.A., Goodman S.M., Andriaholinirina N.V., Randrianavelojosia M., Paul R.E., Robert V., Ayala F.J., Ariey F.: African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010; 107: 10561-10566
- [23] Enserink M.: Malaria treatment: ACT two. Science, 2007; 318: 560-563
- [24] Escalante A.A., Ayala F.J.: Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994; 91: 11373-11377

- [25] Escalante A.A., Barrio E., Ayala F.J.: Evolutionary origin of human and primate malarial parasites: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol. Biol. Evol.*, 1995; 12: 616-626
- [26] Escalante A.A., Freeland D.E., Collins W.E., Lal A.A.: The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 8124-8129
- [27] Gaur D., Chitnis C.E.: Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011; 14: 422-428
- [28] Gaur D., Mayer D.C., Miller L.H.: Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int. J. Parasitol.*, 2004; 34: 1413-1429
- [29] Hill A.V., Allsopp C.E., Kwiatkowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J., Greenwood B.M.: Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 1991; 352: 595-600
- [30] Holmes E.C.: Malaria: the gorilla connection. *Nature*, 2010; 467: 404-405
- [31] Hughes A.L., Verra F.: Malaria parasite sequences from chimpanzee support the co-speciation hypothesis for the origin of virulent human malaria (*Plasmodium falciparum*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2010; 57: 135-143
- [32] Janoušková J., Horák A., Oborník M., Lukeš J., Keeling P.J.: A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 10949-10954
- [33] Janoušková J., Tikhonenkov D.V., Burki F., Howe A.T., Kolisko M., Mylnikov A.P., Keeling P.J.: Factors mediating plastid dependency and the origins of parasitism in apicomplexans and their close relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015; 112: 10200-10207
- [34] Jaśkiewicz E., Graczyk J., Rydzak J.: Białka biorące udział w procesie inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźce malarii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 617-626
- [35] Jiang L., Duriseti S., Sun P., Miller L.H.: Molecular basis of binding of the *Plasmodium falciparum* receptor BAEBL to erythrocyte receptor glycoporphin C. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2009; 168: 49-54
- [36] Jongwutiwes S., Putaporntip C., Iwasaki T., Sata T., Kanbara H.: Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004; 10: 2211-2213
- [37] Kantele A., Marti H., Felger I., Müller D., Jokiranta T.S.: Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008; 14: 1434-1436
- [38] Keeling P.J., Rayner J.C.: The origins of malaria: there are more things in heaven and earth *Parasitology*, 2015; 142 (Suppl. S1): S16-S25
- [39] Krief S., Escalante A.A., Pacheco M.A., Mugisha L., André C., Halbwax M., Fischer A., Krief J.M., Kasenene J.M., Crandfield M., Cornejo O.E., Chavatte J.M., Lin C., Letourneur F., Grüner A.C., et al.: On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from bonobos. *PLoS Pathog.*, 2010; 6: e1000765
- [40] Le Van Kim C., Piller V., Cartron J.P., Colin Y.: Glycophorins C and D are generated by the use of alternative translation initiation sites. *Blood*, 1996; 88: 2364-2365
- [41] Lin D.H., Malpede B.M., Batchelor J.D., Tolia N.H.: Crystal and solution structures of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 140 reveal determinants of receptor specificity during erythrocyte invasion. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 36830-36836
- [42] Liu W., Li Y., Learn G.H., Rudicell R.S., Robertson J.D., Keele B.F., Ndjanga J.B., Sanz C.M., Morgan D.B., Locatelli S., Gonder M.K., Kranzusch P.J., Walsh P.D., Delaporte E., Mpoudi-Ngole E. i wsp.: Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 2010; 467: 420-425
- [43] Liu W., Li Y., Shaw K.S., Learn G.H., Plenderleith L.J., Malenke J.A., Sundararaman S.A., Ramirez M.A., Crystal P.A., Smith A.G., Bibollet-Ruche F., Ayoub A., Locatelli S., Esteban A., Mouacha F. i wsp.: African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 3346
- [44] Lobo C.A., Rodriguez M., Reid M., Lustigman S.: Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baeb1). *Blood*, 2003; 101: 4628-4631
- [45] 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
- [46] Martin M.J., Rayner J.C., Gagneux P., Barnwell J.W., Varki A.: Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 12819-12824
- [47] Martin R.E., Marchetti R.V., Cowan A.I., Howitt S.M., Bröer S., Kirk K.: Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*, 2009; 325: 1680-1682
- [48] Martinsen E.S., Perkins S.L., Schall J.J.: A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2008; 47: 261-273
- [49] 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
- [50] Miller L.H., Ackerman H.C., Su X.Z., Welles T.E.: Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat. Med.*, 2013; 19: 156-167
- [51] Muchmore E.A., Diaz S., Varki A.: A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1998; 107: 187-198
- [52] 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
- [53] Noeld H., Se Y., Sriwichai S., Schaecher K., Teja-Isavadharm P., Smith B., Rutvisuttinunt W., Bethell D., Surasri S., Fukuda M.M., Socheat D., Thap L.C.: Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. *Clin. Infect. Dis.*, 2010; 51: e82-e89
- [54] Nosten F., White N.J.: Artemisinin-based combination treatment of *Falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007; 77 (Suppl. 6): 181-192
- [55] Nzila A.: The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 1043-1054
- [56] Ollomo B., Durand P., Prugnolle F., Douzery E., Arnathau C., Nkoghe D., Leroy E., Renaud F.: A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathog.*, 2009; 5: e1000446
- [57] Ollomo B., Karch S., Bureau P., Elissa N., Georges A.J., Millet P.: Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997; 56: 440-445
- [58] Otto T.D., Rayner J.C., Böhme U., Pain A., Spottiswoode N., Sanders M., Quail M., Ollomo B., Renaud F., Thomas A.W., Prugnolle F., Conway D.J., Newbold C., Berriman M.: Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 4754
- [59] Outlaw D.C., Ricklefs R.E.: Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 13183-13187
- [60] Paing M.M., Tolia N.H.: Multimeric assembly of host-pathogen

adhesion complexes involved in apicomplexan invasion. *PLoS Pathog.*, 2014; 10: e1004120

[61] Perkins S.L., Schall J.J.: A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.*, 2002; 88: 972-978

[62] Prugnolle F., Durand P., Neel C., Ollomo B., Ayala F.J., Arnathau C., Etienne L., Mpoudi-Ngole E., Nkoghe D., Leroy E., Delaporte E., Peeters M., Renaud F.: African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 1458-1463

[63] Prugnolle F., Rougeron V., Becquart P., Berry A., Makanga B., Rahola N., Arnathau C., Ngoubangoye B., Menard S., Willaume E., Ayala F.J., Fontenille D., Ollomo B., Durand P., Paupy C., Renaud F.: Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 8123-8128

[64] Rayner J.C., Huber C.S., Barnwell J.W.: Conservation and divergence in erythrocyte invasion ligands: *Plasmodium reichenowi* EBL genes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2004; 138: 243-247

[65] Rich S.M., Ayala F.J.: Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 6994-7001

[66] Rich S.M., Leendertz F.H., Xu G., LeBreton M., Djoko C.F., Aminake M.N., Takang E.E., Diffo J.L., Pike B.L., Rosenthal B.M., Formenty P., Boesch C., Ayala F.J., Wolfe N.D.: The origin of malignant malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 14902-14907

[67] Rich S.M., Licht M.C., Hudson R.R., Ayala F.J.: Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 4425-4430

[68] Roos D.S.: Themes and variations in apicomplexan parasite biology. *Science*, 2005; 309: 72-73

[69] RTS,S Clinical Trials Partnership: Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomized, controlled trial. *Lancet*, 2015; 386: 31-45

[70] Rydzak J., Kaczmarek R., Czerwinski M., Lukasiewicz J., Tyborowska J., Szewczyk B., Jaskiewicz E.: The baculovirus-expressed binding region of *Plasmodium falciparum* EBA-140 ligand and its glycoporphin C binding specificity. *PLoS One*, 2015; 10: e0115437

[71] Rydzak J., Kmiecik A.M., Jaśkiewicz E.: Glikoforyna C erytrocytów ludzkich jako receptor dla liganda EBA-140 merozoitów *Plasmodium falciparum*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1331-1339

[72] Rydzak J., Kryńska K., Suchanowska A., Kaczmarek R., Łukasiewicz J., Czerwinski M., Jaśkiewicz E.: Bacterially expressed truncated F2 domain of *Plasmodium falciparum* EBA-140 antigen can bind to human erythrocytes. *Acta Biochim. Pol.*, 2012; 59: 685-691

[73] Salinas N.D., Paing M.M., Tolia N.H.: Critical glycosylated residues in exon three of erythrocyte glycoporphin A engage *Plasmodium falciparum* EBA-175 and define receptor specificity. *MBio*, 2014; 5: e01606-14

[74] Schaer J., Perkins S.L., Decher J., Leendertz F.H., Fahr J., Weber N., Matuschewski K.: High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 17415-17419

[75] Sharma P., Chitnis C.E.: Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013; 16: 432-437

[76] Sibley L.D.: How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010; 21: 592-598

[77] Silva J.C., Egan A., Arze C., Spouge J.L., Harris D.G.: A new method for estimating species age supports the coexistence of malaria parasites and their mammalian hosts. *Mol. Biol. Evol.*, 2015; 32: 1354-1364

[78] Singh B., Sung L.K., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul

S.S., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D.J.: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 2004; 363: 1017-1024

[79] Sullivan D.J.Jr., Gluzman I.Y., Russell D.G., Goldberg D.E.: On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 11865-11870

[80] Sundararaman S.A., Liu W., Keele B.F., Learn G.H., Bittinger K., Mouacha F., Ahuka-Mundeye S., Manske M., Sherrill-Mix S., Li Y., Malenke J.A., Delaporte E., Laurent C., Mpoudi Ngole E., Kwiatkowski D.P. i wsp.: *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 7020-7025

[81] Tanabe K., Sakihama N., Hattori T., Ranford-Cartwright L., Goldman I., Escalante A.A., Lal A.A.: Genetic distance in housekeeping genes between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi* and within *P. falciparum*. *J. Mol. Evol.*, 2004; 59: 687-694

[82] Taylor D.W., Wells R.A., Vernes A., Rosenberg Y.J., Vogel S., Diggs C.L.: Parasitologic and immunologic studies of experimental *Plasmodium falciparum* infection in nonsplenectomized chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985; 34: 36-44

[83] Tazi L., Ayala F.J.: Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect. Genet. Evol.*, 2011; 11: 209-221

[84] Tham W.H., Healer J., Cowman A.F.: Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.*, 2012; 28: 23-30

[85] 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

[86] 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

[87] Triglia T., Menting J.G., Wilson C., Cowman A.F.: Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 13944-13949

[88] Varki A.: Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2001; 116 (Suppl. 33): 54-69

[89] Varki A.: Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 2007; 446: 1023-1029

[90] Varki A., Gagneux P.: Human-specific evolution of sialic acid targets: explaining the malignant malaria mystery? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 14739-14740

[91] Vythilingam I., Tan C.H., Asmad M., Chan S.T., Lee K.S., Singh B.: Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2006; 100: 1087-1088

[92] Wanaguru M., Crosnier C., Johnson S., Rayner J.C., Wright G.J.: Biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen-175 (EBA175)-glycophorin-A interaction: implications for vaccine design. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 32106-32117

[93] Wanaguru M., Liu W., Hahn B.H., Rayner J.C., Wright G.J.: RH5-basigin interaction plays a major role in the host tropism of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 20735-20740

[94] Waters A.P., Higgins D.G., McCutchan T.F.: *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 3140-3144

[95] Weatherall D.J.: Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria. *Br. J. Haematol.*, 2008; 141: 276-286

[96] WHO | Questions and answers on malaria vaccines. <http://www.who.int>

who.int/immunization/research/development/malaria_vaccine_qa/en/(05/08/2015)

[97] WHO | Tables of malaria vaccine projects globally. [http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/\(05/08/2015\)](http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/(05/08/2015))

[98] WHO | World Malaria Report 2012. [http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/\(31/08/2015\)](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/(31/08/2015))

[99] Wilder J.A., Hewett E.K., Gansner M.E.: Molecular evolution of GYPC: evidence for recent structural innovation and positive selection in humans. *Mol. Biol. Evol.*, 2009; 26: 2679-2687

[100] 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., Williamson D.H.: Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, 1996; 261: 155-172

[101] Woo Y.H., Ansari H., Otto T.D., Klinger C.M., Kolisko M., Michálek J., Saxena A., Shanmugam D., Tayyrov A., Veluchamy A., Ali S., Bernal A., del Campo J., Cihlář J., Flegontov P. i wsp.: Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *eLife*, 2015; 4: e06974

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.