

Received: 2013.06.24
Accepted: 2013.11.15
Published: 2013.12.23

Glikoforyna C erytrocytów ludzkich jako receptor dla liganda EBA-140 merozoitów *Plasmodium falciparum**

Human erythrocyte glycophorin C as the receptor for EBA-140 *Plasmodium falciparum* merozoite ligand

Joanna Rydzak¹, Alicja M. Kmiecik¹, Ewa Jaśkiewicz^{1,2}

¹ Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

² Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

Streszczenie

Proces inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźce malarii jest wynikiem kaskady wzajemnych interakcji między pasożytem a krwinką czerwoną. Bierze w nim udział wiele ligandów merozoitów *Plasmodium falciparum*, w tym białka z rodziny EBL (erythrocyte-binding-like). Poznanie struktury rekombinowanego regionu wiążącego (Regionu II) liganda EBA-140, należącego do tej rodziny białek, pozwoliło na wyjaśnienie molekularnych podstaw jego oddziaływania z receptorem erytrocytów. Struktura krystaliczna Regionu II otrzymana w obecności $\alpha(2,3)$ -sialolaktozy, wykazała, że region ten wiąże się do receptora jako monomer. Ustalono, że Region II białka EBA-140 zawiera dwie kieszenie wiążące glikan, przy czym każda z nich znajduje się wewnątrz odrębnej domeny, F1 lub F2. Stwierdzone dla domen F1 i F2 Regionu II różnice w oddziaływaniach wskazują na ich odmienne role w wiązaniu receptora. Uważa się, że chociaż obie domeny są konieczne do efektywnego wiązania, domena F1 pełni decydującą rolę w oddziaływaniu z receptorem. Otrzymane wyniki wykazały, że struktura regionu wiążącego liganda EBA-140 *P. falciparum* oraz mechanizm wiązania glikanu jest unikalny wśród innych białek EBL. Ligand EBA-140 *P. falciparum* wiąże się do ludzkich erytrocytów poprzez błonową sialoglikoproteinę - glikoforynę C. Sugeruje się, że w oddziaływaniu ligand - receptor może uczestniczyć klastr uszajlowanych łańcuchów N- i O-glikozydowych, których dostępność zależy od regionu łańcucha polipeptydowego glikoforyny C, który obejmuje reszty aminokwasowe w poz. 36-63. Szczegółowa charakterystyka miejsca receptorowego na glikoforynie C może mieć potencjalne znaczenie w hamowaniu inwazji erytrocytów ludzkich przez *P. falciparum* w oparciu o receptor.

Słowa kluczowe:

ligand EBA-140 *P. falciparum* • glikoforyna C • oddziaływanie ligand -receptor erytrocytów

Summary

Erythrocyte invasion by the blood-stage *Plasmodium falciparum* parasites is a multistep process involving specific interactions between parasites and red blood cells. Several proteins are involved in this process, including EBL ligands.

The structure of the EBA-140 ligand, a member of the EBL protein family, provides a full description of its molecular interactions with the erythrocyte receptor. The crystal structure of the EBA-140 Region II in a complex with sialolactose revealed that the binding region is monomeric. Two glycan binding pockets, one in each F1 or F2 domain, were identified. Stark

*Praca została sfinansowana z grantów: MNSiW (nr N N302 281436) oraz NCN (nr 2012/05/N/NZ6/00667).

	differences in the receptor binding for the F1 and F2 domains suggests that each domain performs a distinct function. Although both domains are required for effective glycan binding, it seems that the interaction may be mediated solely by the F1 domain. The structure of the binding region and the interaction with glycan are unique to the EBA-140 ligand and not shared by other EBL ligands. The EBA-140 ligand binds specifically to human erythrocytes through the membrane sialoglycoprotein glycophorin C. The receptor site for the EBA-140 ligand was suggested to be a cluster of N- and O-linked sialylated glycans on the GPC molecule, whose conformation is dependent on the polypeptide chain region composed of amino acid residues 36-63. Precise definition of the binding site for the EBA-140 ligand on glycophorin C may be important with respect to human erythrocyte invasion inhibition strategies based on a receptor.
Key words:	<i>Plasmodium falciparum</i> EBA-140 ligand • glycophorin C • ligand-receptor interactions
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1081865
Word count:	2879
Tables:	–
Figures:	5
References:	44

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

WPROWADZENIE

Malaria jest chorobą pasożytniczą wywołaną przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* [39]. Wyróżnia się pięć gatunków zarodźców zdolnych do rozwoju w organizmie ludzkim: ruchliwy (*P. vivax*), pasmowy (*P. malariae*), sierpowy (*P. falciparum*), owalny (*P. ovale*) oraz *P. knowlesi*, który zakaża również małpy.

Według raportu WHO około 219 milionów osób, głównie mieszkańców subsaharyjskich regionów Afryki oraz Indochin, zachorowało w 2010 roku na malarię, a około 660 tysięcy zmarło [13]. Przypadki śmiertelne dotyczą głównie kobiet w ciąży oraz dzieci, które nie ukończyły piątego roku życia. Za najcięższą postać malarii oraz większość zgonów odpowiedzialny jest *P. falciparum* [15]. Niestety, nie wprowadzono dotąd skutecznej szczepionki przeciw malarii. Stosowane obecnie metody zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby to wczesna diagnoza i leczenie uwzględniające lekooporność zarodźca oraz profilaktyka obejmująca kontrolę wektorową.

Mimo że problem malarii wydaje się dotyczyć jedynie krajów trzeciego świata, to przypadki zachorowań odnotowuje się również na terenach wysoce zurbanizowanych [10,11]. Wprawdzie malaria nie stanowi poważnego zagrożenia na terenach Polski, to ze względu na łatwość i częstość podróżowania wciąż zdarzają się pojedyncze przypadki zachorowań wśród osób powracających z zagranicy, marynarzy i żołnierzy [14,20].

Cykl rozwojowy zarodźca malarii obejmuje dwie fazy: płciową (sporogonię) oraz bezpłciową (schizogonię)

[13,34,35,39]. Do rozmnażania bezpłciowego *Plasmodium* dochodzi w organizmie człowieka, który pełni rolę żywiciela pośredniego. Rozmnażanie płciowe pierwotniaka odbywa się natomiast w układzie pokarmowym samicy komara z rodzaju *Anopheles*, który jest żywicielem ostatecznym. Pasożyt dostaje się do krwi człowieka w wyniku ukąszenia komara, wraz z jego śliną. Następnie sporozycy przemieszczają się z krwią i docierają do wątroby. W hepatocytach sporozycy po wielokrotnych podziałach komórkowych przekształcają się w schizonta, który uwalnia do krwiobiegu żywiciela merozoity, zarażające następnie erytrocyty. W krwince merozoit ulega przeobrażeniu ponownie w schizonta, który daje początek nowym merozoitom, atakującym kolejne erytrocyty. Rozpadowi erytrocytów towarzyszy występowanie objawów chorobowych typowych dla malarii: gorączki i dreszczy [16,35].

Inwazja erytrocytów przez merozoity zarodźca malarii jest złożonym procesem, obejmującym kaskadę oddziaływań pomiędzy białkami pasożyta a receptorami erytrocytu [3,8,9,12,38]. Obejmuje ona kilka najważniejszych etapów: wstępne wiązanie merozoitu do powierzchni erytrocytu, apikalną reorientację merozoitu, utworzenie „ściślego” i nieodwracalnego wiązania między merozoitem a erytrocytem oraz ostatecznie wnikięcie merozoitu do wnętrza czerwonej krwinki.

Wśród adhezyn odpowiedzialnych za „ściśle” kontakt merozoitu z erytrocytem wyróżnić można dwie rodziny białek: RBL (reticulocyte-binding-like) oraz DBL (Duffy-binding-like) [8,9,12,34,42]. Do rodziny DBL należą białka EBL (erythrocyte-binding-like antigens) oraz Var (variant surface antigens). Termin DBL pochodzi od antygenu Duffy

na krwinkach czerwonych, którego identyfikacja dała początek badaniom ligandów *P. vivax* i *P. knowlesi*. Wymienione białka są umiejscowione w organellach wydzielniczych merozoitów: ligandy EBL w mikronemach, natomiast białka RBL w roptriach. Rodzina EBL *P. falciparum* reprezentowana jest przez cztery białka: EBA-175 (erythrocyte binding antigen-175), EBA-140 (erythrocyte binding antigen-140), EBA-181 (erythrocyte binding antigen-181) oraz EBL-1 (erythrocyte-binding-ligand-1) [1,2].

Ligandy *P. falciparum* z rodziny EBL należą do białek transbłonowych typu I [1,2]. W obrębie zewnątrzblonowego, N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego białka EBA zawierają domenę wiążącą receptor, nazwaną Regionem II (RII). Region II ligandów EBL *P. falciparum* zbudowany jest z dwóch homologicznych domen DBL: F1 i F2. Region wiążący ligandów EBL wykazuje homologię sekwencji aminokwasowej [44].

Zidentyfikowano wiele receptorów na erytrocytach ludzkich, które są wiązane przez białka EBL. Dla większości z nich receptorami są glikoforyny - sjałoglikoproteiny błon erytrocytów [7,17,24]. Glikoforyna A (GPA) i C (GPC) pełni rolę receptora odpowiednio dla ligandów EBA-175 oraz EBA-140 [25,27,32,37,40,41]. Obie z nich można usunąć z powierzchni erytrocytów w wyniku trawienia trypsyną. Ligand EBL-1 wiąże się do glikoforyny B, która jest wrażliwa na działanie chymotrypsyny [30]. Oddziaływanie między receptorami a ligandami z rodziny EBL jest zależne od obecności reszt kwasu sjałowego i z tego powodu neuraminidaza znosi wiązanie tych ligandów.

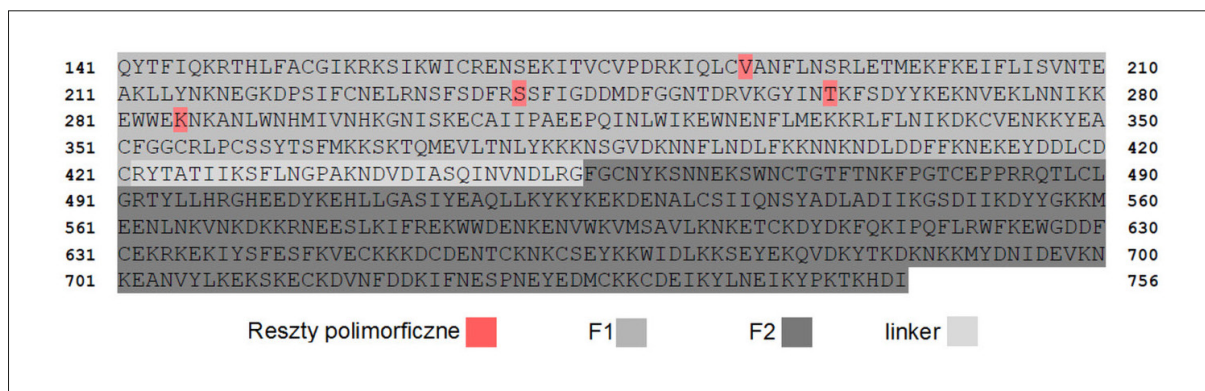
LIGAND EBA-140 *P. FALCIPARUM* I JEGO RECEPTOR GLIKOFORYNA C

Wykazano, że białko EBA-140 pochodzące z klonów Dd2/Nm oraz 3D7 *P. falciparum*, nie wiąże się do erytrocytów traktowanych trypsyną oraz neuraminidazą. Wynik ten potwierdzono na podstawie spadku wiązania liganda EBA-140 do erytrocytów o fenotypach Yus i Gerbich, które zawierają wariantową GPC z delecją odpowiednio reszt aminokwasowych 17-35 oraz 36-63 [6]. Sugeruje to, że białko EBA-140 wiąże się do ludzkich erytrocytów poprzez błonową sjałoglikoproteinę - glikoforynę C (GPC) [26,27,28]. Należy wspomnieć, że istnieją również donie-

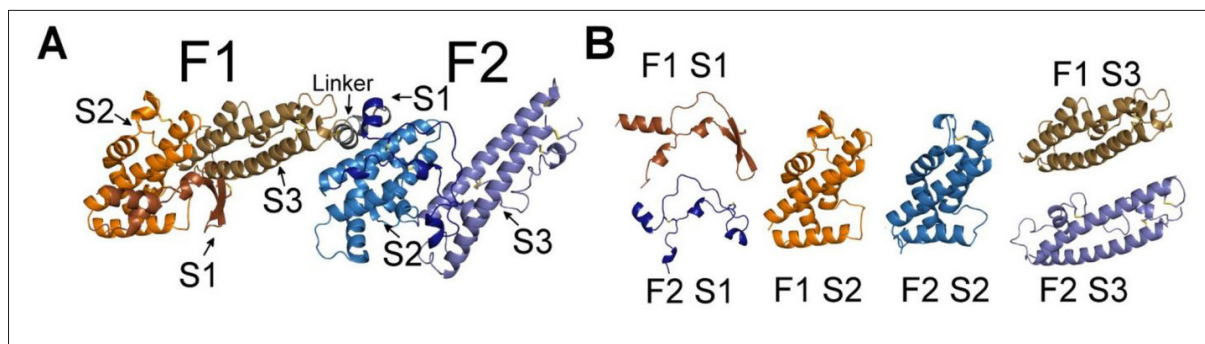
sienia o braku wpływu lub jedynie częściowym spadku wiązania liganda EBA-140 do erytrocytów traktowanych trypsyną, na której działanie wrażliwa jest GPC, co wyklucza jej udział w wiązaniu białka EBA-140 [36,43].

Obserwowane rozbieżności mogą być związane z polimorfizmem reszt aminokwasowych regionu wiążącego białka EBA-140, który stwierdzono wśród różnych klonów *P. falciparum*, pochodzących z odmiennych regionów świata [26,33]. Zidentyfikowano pięć typów polimorficznych Regionu II EBA-140: VSTK, VSKK, ISKK, INRE, które dotyczą czterech reszt aminokwasowych domeny F1 odpowiednio w pozycjach: 185, 239, 261, 285 (ryc. 1).

Wykazano różnicę w swoistości wiązania rekombinowanych wariantów polimorficznych Regionu II liganda EBA-140 poddanych ekspresji w komórkach COS7. Ustalono, że spośród pięciu wariantów, jedynie wariant VSTK (pochodzący z klonu Dd2/Nm) nie wiąże się do erytrocytów trawionych neuraminidazą lub trypsyną oraz do erytrocytów o fenotypie Gerbich, a zatem wykazuje swoistość wobec GPC. Różnica w wiązaniu do erytrocytów dwóch odmiennych wariantów polimorficznych Regionu II liganda EBA-140: VSTK i VSKK, została potwierdzona również dla rekombinowanych białek poddanych ekspresji na powierzchni komórek CHO-K1 [18]. Stwierdzono, że wariantowa postać VSTK nie wiąże się do erytrocytów traktowanych neuraminidazą oraz erytrocytów o fenotypie Gerbich, podczas gdy wariant VSKK zachowuje zdolność wiązania w obu przypadkach. Ponieważ warianty te różnią się jedynie jedną resztą aminokwasową domeny F1 (lizyna zamiast treoniny w poz. 121), zaproponowano, że to właśnie T121 jest resztą aminokwasową kluczową dla wiązania kwasu sjałowego GPC [18]. Modelowanie struktury przestrzennej RII liganda EBA-140 na podstawie znanej struktury krystalicznej RII homologicznego liganda EBA-175 [44] pozwoliło na ujawnienie w sąsiedztwie T121 czterech reszt aminokwasowych zawierających ładunek, a więc potencjalnie zaangażowanych w oddziaływanie z kwasem sjałowym: dwóch reszt argininy w poz. 52 i 114 oraz reszty kwasu glutaminowego w poz. 54 i kwasu asparaginowego w poz. 125. Analiza wiązania mutantów Regionu II do erytrocytów, wykazała, że zamiana reszt argininy (R52 i R114) na reszty alaniny lub lizyny spowodowała wiązanie się wariantu



Ryc. 1. Sekwencja aminokwasowa Regionu II EBA-140 klonu Dd2 wraz z rozmieszczeniem polimorficznych reszt aminokwasowych (wg [33], zmodyfikowano)



Ryc. 2. Struktura Regionu II liganda EBA-140; A – przestrzenne rozmieszczenie subdomen; B – struktury pojedynczych subdomen; w obrębie domeny F1: subdomena 1- kolor brązowy, subdomena 2 - kolor pomarańczowy, subdomena 3 - kolor ciemnopomarańczowy; w obrębie domeny F2: subdomena 1 – kolor ciemnoniebieski, subdomena 2 - kolor niebieski, subdomena 3 - kolor jasnoniebieski; region łączący (linker) – kolor szary (wg [23], zmodyfikowano)

VSTK do erytrocytów traktowanych neuraminidazą oraz erytrocytów typu Gerbich. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że reszty R52, R114 oraz T121 Regionu II liganda EBA-140 uczestniczą w wiązaniu kwasu sjałowego i decydują o swoistości wiązania wobec GPC.

Wyniki dowodzące, że jedynie polimorficzny wariant VSTK liganda EBA-140 wiąże się do glikoforyny C, zostały jednak podważone [26]. Stosując immunoblotting z użyciem błon erytrocytów wykazano wiązanie wszystkich pięciu polimorficznych wariantów liganda EBA-140 do GPC. Wykazano również, że żaden z wariantów nie wiąże się do erytrocytów traktowanych neuraminidazą i trypsyną oraz do krwinek o fenotypach Gerbich, Yus, Yus/Gerbich, które mają wariantowe postaci GPC. Stwierdzono, że polimorfizm Regionu II nie wpływa na swoistość liganda EBA-140 wobec receptora, którym jest GPC, a jedynie na powinowactwo. Sprzeczne wyniki można wytłumaczyć tym, że w pierwszym przypadku użyto rekombinowanych form Regionu II białka EBA-140 poddanych ekspresji w komórkach COS7 [30] lub CHO-K1 [34], natomiast w drugim przypadku natywnym białkiem EBA-140 pochodzącym z nadsączca hodowanego różnych klonów *P. falciparum*.

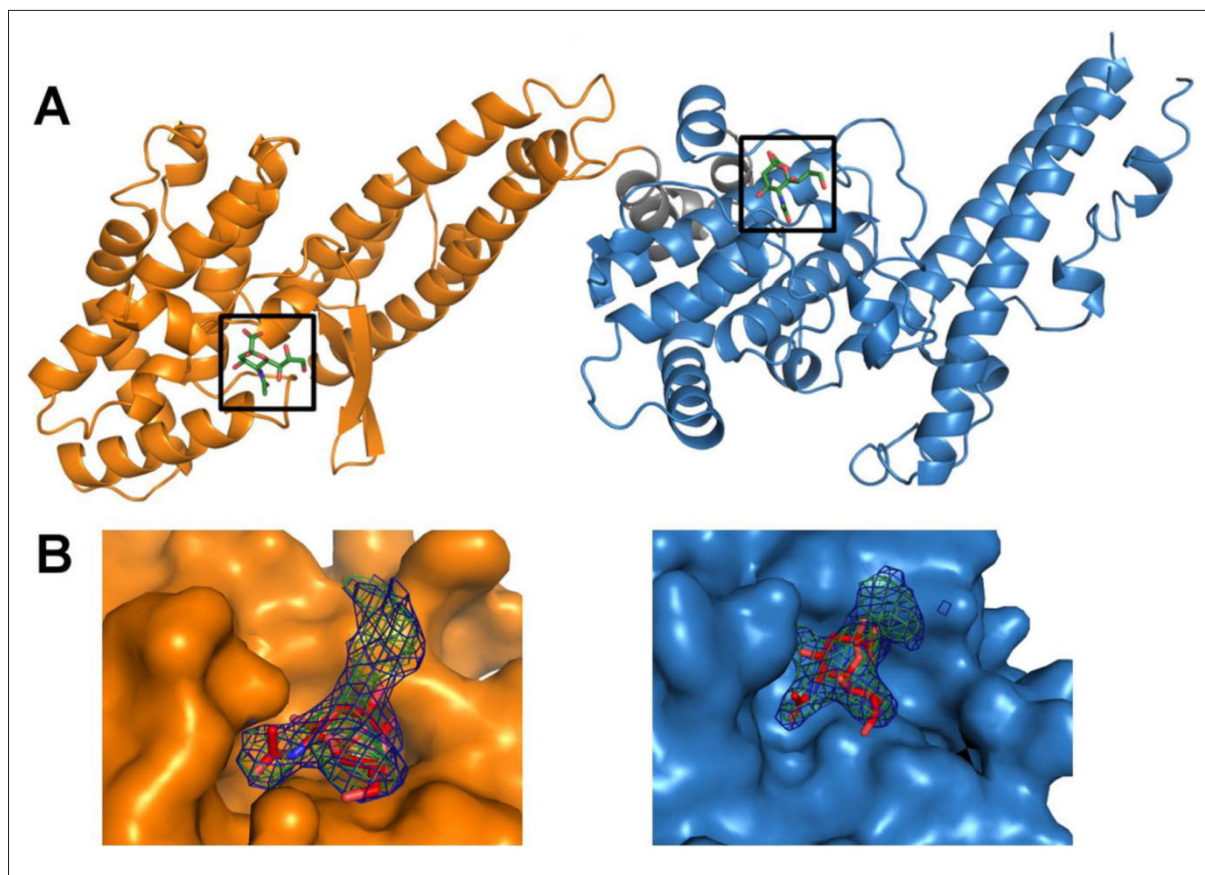
Obserwowany spadek wiązania liganda EBA-140 do krwinek o fenotypie Gerbich [26,27,33] sugerował istotny udział fragmentu łańcucha polipeptydowego GPC kodowanego przez ekson 3 (r. a. 36-63). Wynik ten nie potwierdził się dla liganda EBA-140 pochodzącego z nadsączca hodowanego klonu 3D7 (wariant INKK), który wiązał się nawet silniej do erytrocytów typu Gerbich, niż do prawidłowych erytrocytów [25]. Spadek wiązania tego liganda zaobserwowano natomiast w przypadku wariantowych erytrocytów o fenotypie Yus. Otrzymane wyniki wskazywały zatem, że reszty aminokwasowe w poz. 17-35, nieobecne w GPC typu Yus, są istotne w wiązaniu liganda EBA-140, a nie reszty w poz. 36-63, nieobecne w GPC typu Gerbich, jak wskazano poprzednio. Jednakże za tezę, że region glikoforyny C obejmujący reszty aminokwasowe 36-63 ma znaczenie w wiązaniu liganda EBA-140, przemawia to, że na obszarach endemicznych malarii, takich jak Papua-Nowa Gwinea, prawie 50% populacji posiada erytrocyty typu Gerbich,

z delecją tego fragmentu [27]. Prawdopodobnie mutacja ta jest wynikiem ewolucyjnej ochrony przed inwazją *P. falciparum*. Sprzeczności dotyczące udziału łańcucha polipeptydowego GPC w wiązaniu liganda EBA-140, wymagają dalszych badań, które są prowadzone również w naszym laboratorium.

Głównym problemem jest jednak udział łańcuchów cukrowych GPC w wiązaniu białka EBA-140. Przyjmuje się, że zewnątrz błonowy fragment GPC ma 12 usjałowanych łańcuchów O-glikozydowych związanych z resztami seryny i treoniny oraz jeden złożony łańcuch N-glikozydowy związany z resztą asparaginy w poz. 8 [24]. Wykazano, że łańcuch ten jest niezbędny do wiązania białka EBA-140 do GPC [31]. Sugeruje się, że w oddziaływaniu ligand-receptor może uczestniczyć klaster usjałowanych łańcuchów N- i O-glikozydowych, przyłączonych do odpowiedniej części łańcucha polipeptydowego glikoforyny C [23,31].

Niedawno, wykorzystując bibliotekę fagową, zawierającą pulę peptydów pochodzących z klonu FCR3 *P. falciparum* [22], zidentyfikowano syntetyczny peptyd, złożony z 7 reszt aminokwasowych: ETTLKSF, który wiąże się do glikoforyny C. Ponadto wykazano, że peptyd ten hamuje inwazję erytrocytów ludzkich przez *P. falciparum* tylko wtedy, gdy gen *eba-140* podlega ekspresji. Wynik ten sugerował, że zidentyfikowany peptyd powinien odpowiadać sekwencji aminokwasowej w obrębie łańcucha polipeptydowego liganda EBA-140, która jest zaangażowana w wiązanie GPC. Okazało się jednak, że znaleziona sekwencja aminokwasowa nie odpowiada żadnemu fragmentowi łańcucha polipeptydowego białka EBA-140. Wynik ten jest trudny do wyjaśnienia.

Poznanie struktury krystalicznej rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140, otrzymanego w bakteriach, pozwoliło na wyjaśnienie molekularnych podstaw jego oddziaływania z receptorem [23,28]. Wykazano, że Region II występuje w roztworze w postaci monomeru (ryc. 2). Dwie domeny: F1 (r. a. 143-422) oraz F2 (r. a. 447-740) są połączone krótkim helikalnym odcinkiem. Każda z domen zbudowana jest z trzech subdomen i zawiera 12 reszt cysteiny, które tworzą mostki disiarczkowe stabilizujące ich strukturę.



Ryc. 3. Miejsca wiążące kwas sjałowy w domenie F1 i F2 Regionu II EBA-140; A – cząsteczki kwasu sjałowego w ramach zaznaczono kolorem zielonym; B – przestrzenne rozmieszczenie wiązanego glikanu w obrębie kieszeni wiążących; reszta kwasu sjałowego (kolor czerwony) wnika w głąb kieszeni, a pierścień galaktozy wystaje na zewnątrz; domena F1 – kolor pomarańczowy; domena F2 – kolor niebieski; region łączący (linker) – kolor szary (według [28], zmodyfikowano)

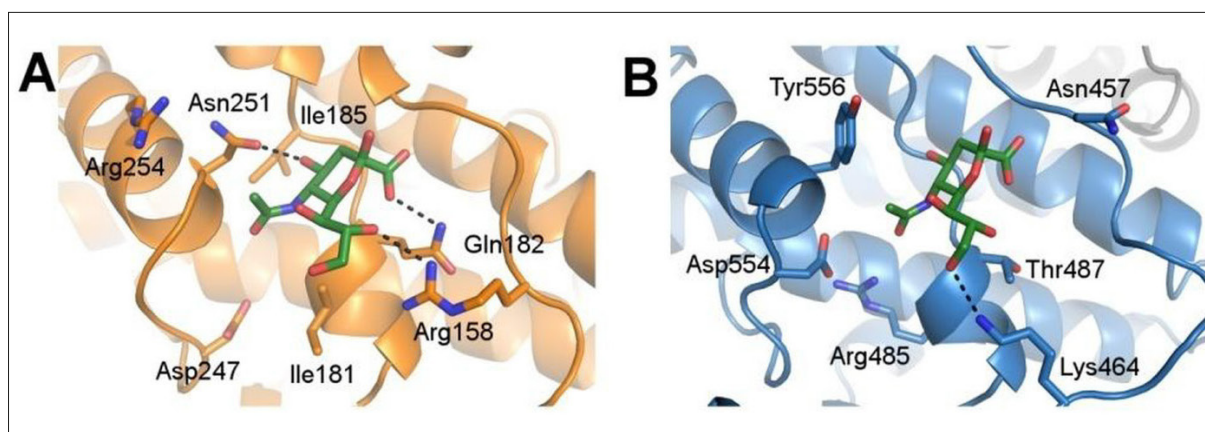
Chociaż Region II liganda EBA-140 jest strukturalnie podobny do domen wiążących innych białek DBL, w tym należących do *P. vivax* i *P. knowlesi*, to można wskazać pewne różnice. W obrębie Regionu II białka EBA-140 dwa mostki disiarczkowe utworzone zostały według odmiennego wzoru. Połączenia tworzą reszty cysteiny w poz. 7 i 8 oraz 9 i 12, zamiast reszt C7 i C9 oraz C8 i C12. W odróżnieniu od RII homologicznego liganda EBA-175, który zawiera dwa odpowiedzialne za dimeryzację przeciwrównoległe skręty β o strukturze „spinki do włosów” [44], ligand EBA-140 ma taką strukturę jedynie w obrębie domeny F1. W domenie F2 zastępuje ją natomiast nowy α -helikalny segment. Ligand EBA-140 nie ma również charakterystycznego dla domeny DBL „supła” w subdomenie 3 domeny F1, co jest spowodowane brakiem jednej reszty glicyny. Brak tego „supła” znacznie zmienia kąt nachylenia między domenami F1 i F2, co ogranicza możliwość ruchu, uniemożliwiając dimeryzację liganda EBA-140.

Struktura krystaliczna Regionu II białka EBA-140 otrzymana w obecności $\alpha(2,3)$ -sjałolaktazy potwierdziła, że ligand ten wiąże się do receptora również jako monomer [28]. Ustalono, że Region II zawiera dwie kieszenie wiążące kwas sjałowy, przy czym każda z nich znajduje się

wewnątrz odrębnej domeny, F1 lub F2. Kieszenie obejmują rejon o dużym zagęszczeniu dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, przypuszczalnie ułatwiających oddziaływanie z kwasem sjałowym, który wnika do wnętrza kieszeni (ryc. 3).

Cząsteczka kwasu sjałowego zawiera pierścień piranowy, grupę karboksylową, resztę glicerolu oraz grupę acetyloamidową. Ustalono, że reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie kwasu sjałowego są odmienne w każdej z domen (ryc. 4). W kieszeni domeny F1 reszta Q182 tworzy wiązania van der Waals z grupą karboksylową kwasu sjałowego. Reszta R158 oddziałuje z łańcuchem glicerolu poprzez wiązania wodorowe oraz z grupą hydroksylową poprzez wiązania van der Waals. Po przeciwnej stronie kieszeni, położona w obrębie helisy, reszta N251 tworzy wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową C-4 pierścienia piranowego i jest zwrócona w stronę grupy acetyloamidowej. Położone na spodzie kieszeni reszty I181 oraz I185 oddziałują z hydrofobową częścią cukru.

Mimo że kieszeń domeny F2 ma podobną strukturę, w wiązaniu kwasu sjałowego uczestniczą inne reszty ami-



Ryc. 4. Reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie kwasu sjałowego przez RII EBA-140; A – kieszeń wiążąca domenę F1 (kolor pomarańczowy); B – kieszeń wiążąca domenę F2 (kolor niebieski); cząsteczki kwasu sjałowego (kolor zielony) (według [28], zmodyfikowano)

nokwasowe (ryc. 4). Reszta N457, położona w obrębie pętli umiejscowionej w górnej części kieszeni domeny F2, tworzy wiązania van der Waals z grupą karboksylową kwasu. Reszta K464 oddziałuje z łańcuchem glicerolu, tworząc wiązania wodorowe oraz wiązania van der Waals z grupą hydroksylową. Za oddziaływania hydrofobowe odpowiada reszta T487 zlokalizowana na spodzie kieszeni domeny F2. Położona po przeciwnej stronie w obrębie helisy reszta Y556 wchodzi w hydrofobowe oddziaływania z grupą acetyloamidową kwasu sjałowego.

W celu potwierdzenia roli w wiązaniu kwasu sjałowego wymienione reszty aminokwasowe obu domen F1 i F2 zostały zastąpione w wyniku mutagenyzy resztami alaniny. Mutacje pojedynczych reszt kieszeni wiążącej domeny F1 spowodowały obniżenie lub brak wiązania RII EBA-140 do erytrocytów wskazując, że domena F1 jest niezbędna do wiązania receptora. Wykazano, że reszta I181 jest odpowiedzialna za utrzymanie poprawnej konformacji miejsca wiążącego oraz oddziaływania hydrofobowe z glikanem, zaś helisa zawierająca resztę N251 wspomaga wiązanie glikanu oraz stabilizuje strukturę kieszeni. Zamiana reszt R158, Q182 i I181 znosiła wiązanie Regionu II do erytrocytów, wskazując, że reszty te są kluczowe dla wiązania.

Mutacje reszt wiążących kieszeni domeny F2 tylko w niewielkim stopniu wpłynęły na wiązanie liganda do erytrocytów. Wcześniej zauważono natomiast, że zamiana reszt R485 oraz D554 domeny F2, które są położone w bliskim sąsiedztwie miejsca wiążącego, na alaninę znacząco obniżyła wiązanie Regionu II do erytrocytów [23]. Zaburzenie rozkładu ładunków wewnątrz kieszeni wiążącej miało również negatywny wpływ na wiązanie. Zaobserwowano, że zamiana reszt K464 lub Y556 na resztę kwasu glutaminowego obniżyło wiązanie o około 30%. Zmiana ładunku na ujemny przypuszczalnie powoduje odpychanie kwasu sjałowego i w ten sposób obniża wiązanie.

Stwierdzone różnice w oddziaływaniach domen F1 i F2 Regionu II EBA-140 wskazują na ich odmienne role w wiązaniu receptora. Uważa się, że chociaż obie domeny są

konieczne do wiązania, tylko domena F1 uczestniczy bezpośrednio w oddziaływaniu z receptorem. Na uwagę zasługuje to, że jedna z czterech reszt polimorficznych (I185) domeny F1 liganda EBA-140, znajduje się w obrębie kieszeni wiążącej kwas sjałowy. Wcześniej wykazano, że zamiana tej reszty na resztę waliny skutkuje obniżeniem wiązania do erytrocytów i glikoforyny C [23]. Wynik ten można wytłumaczyć tym, że reszta I185 uczestniczy w tworzeniu kontaktu z kwasem sjałowym oraz utrzymaniu odpowiedniego kształtu kieszeni wiążącej domeny F1. Wykazano, że zastąpienie *in silico* tej reszty izoleucyny waliną zmienia wewnętrzną powierzchnię kieszeni i osłabia jej przestrzenne dopasowanie do cząsteczki kwasu sjałowego. Potwierdza to, że polimorfizm 185 reszty aminokwasowej domeny F1 rzeczywiście ma wpływ na powinowactwo liganda do receptora, a być może decyduje również o jego swoistości.

Omówione szczegółowo wyniki dotyczące struktury regionu wiążącego liganda EBA-140 *P. falciparum* wskazały, że dwie kieszenie wiążące kwas sjałowy oraz mechanizm wiązania glikanu są unikalne wśród innych białek z rodziny DBL, w tym homologicznego liganda EBA-175 *P. falciparum* i DBP *P. vivax* [4,44]. Wiązanie glikanu przez białka PvDBP oraz EBA-175 wymaga bowiem ich dimeryzacji. Ligand PvDBP występuje w postaci monomeru i dopiero w obecności receptora DARC tworzy dimer. Również dimeryzacja liganda EBA-175 zachodzi w obecności receptora - glikoforyny A i jest niezbędna do wiązania. Natomiast Region II liganda EBA-140 występuje jedynie w formie monomeru i dlatego może wiązać tylko dwie cząsteczki glikanu, podczas gdy dimer EBA-175 wiąże aż sześć O-glikanów GPA. Przypuszczalnie ma to bezpośredni wpływ na powinowactwo obu ligandów odpowiednio do GPC i GPA.

OTRZYMYWANIE REKOMBINOWANEGO REGIONU WIĄŻĄCEGO LIGANDA EBA-140

Głównym ograniczeniem w badaniach nad ligandami *P. falciparum* z rodziny EBL są problemy z otrzymaniem rozpuszczalnych, poprawnie sfałdowanych i funkcjonal-

nych rekombinowanych białek w większych ilościach [5]. Spowodowane jest to ich znacznym rozmiarem oraz zawartością licznych mostków disiarczkowych. Doświadczenia, mające na celu wyjaśnienie molekularnych podstaw oddziaływania ligandów EBL z receptorami na erytrocytach były prowadzone głównie z użyciem białek uzyskanych bezpośrednio z nadsącza hodowanego merozoitów. Niestety tylko niektóre z białek mogą być otrzymywane z wystarczającą wydajnością bezpośrednio z hodowli komórek naturalnego gospodarza. Konieczne jest więc stosowanie heterologicznych systemów ekspresji.

Białka merozoitów z rodziny EBL są zbyt duże, by mogły być poddane ekspresji w całości. Otrzymano jedynie regiony wiążące białek EBA-175 oraz EBA-140. Rekombinowany, pełny Region II, a także pojedyncze domeny F1 i F2, liganda EBA-140, zostały poddane ekspresji w komórkach CHO-K1 [18], COS7 [29,33] oraz HEK – 293T [23]. Zaletą tych eukariotycznych systemów ekspresji było uzyskanie rekombinowanych białek mających natywną konformację, jednak poważnym ograniczeniem była ich nierozpuszczalna, związana z powierzchnią błony komórkowej forma.

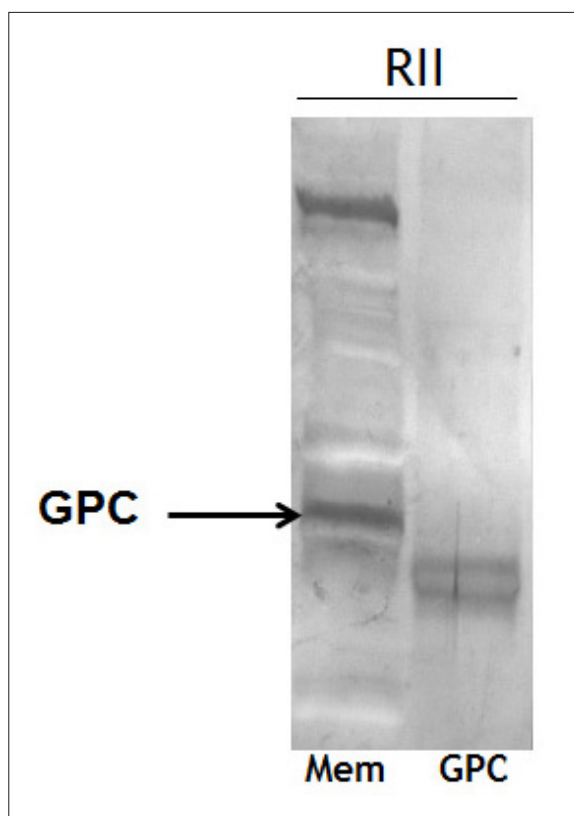
Rekombinowany Region II antygeny EBA-140 otrzymano w komórkach *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych [23]. Otrzymanie rozpuszczalnego RII wymagało wstępnego rozpuszczenia ciałek inkluzyjnych w warunkach denaturujących, a następnie renaturacji rekombinowanego białka poprzez gwałtowne rozcieńczenie w obecności zredukowanego i utlenionego glutationu. Tak otrzymane białko zostało poddane krystalizacji.

Poprawne fałdowanie rekombinowanego Regionu II liganda EBA-140 oraz prostotę oczyszczania zapewniło natomiast użycie systemu bakulowirusowego [19]. Wydzielane do pożywki hodowlanej komórek owadzych rekombinowane białko zostało bezpośrednio oczyszczone z medium metodą chromatografii powinowactwa [21]. System ekspresji w komórkach owadzych zwiększa szansę na otrzymanie poprawnie sfalowanych i rozpuszczalnych, rekombinowanych białek z dużą wydajnością, nawet takich, których otrzymanie w innych systemach jest niemożliwe. Umożliwia również potranslacyjną modyfikację białek, w tym glikozylację, fosforylację oraz tworzenie mostków disiarczkowych.

REKOMBINOWANY REGION II LIGANDA EBA-140 WIĄŻE SIĘ DO GLIKOFORYNY C

W celu sprawdzenia, czy rekombinowany Region II EBA-140 otrzymany w systemie bakulowirusowym (Genescript) jest funkcjonalny posłużyliśmy się metodą immunoblottingu.

Region II wiązano do membran ludzkich erytrocytów oraz do oczyszczonej glikoforyny C, immobilizowanych na błonie nitrocelulozowej (ryc. 5). W przypadku membran erytrocytów zaobserwowano dwa prążki, z których



Ryc. 5. Wiązanie rekombinowanego Regionu II EBA-140 (Genescript) do membran erytrocytów ludzkich oraz oczyszczonej glikoforyny C metodą immunoblottingu; Mem, – membrany erytrocytów; GPC – oczyszczona glikoforyna C

dolny odpowiadał monomerowi glikoforyny C, a górny utworzonym przez nią agregatom. Wiązanie Regionu II do oczyszczonej GPC było widoczne w postaci dwóch, nieznacznie oddalonych od siebie prążków, które migrowały niżej niż prążek odpowiadający GPC w membranach. Wynika to przypuszczalnie z częściowej degradacji GPC podczas oczyszczania.

Wykazano zatem, że rekombinowany Region II liganda EBA-140 *P. falciparum*, otrzymany w systemie bakulowirusowym, jest funkcjonalny i wiąże się swoiście do glikoforyny C.

PODSUMOWANIE

Ligand EBA-140 *P. falciparum* należący do rodziny białek EBL merozoitów wiąże się do glikoforyny C erytrocytów ludzkich. Dalszych badań wymaga jednak szczegółowe poznanie struktury i lokalizacji miejsca receptorowego dla liganda EBA-140 na glikoforynie C, ze szczególnym uwzględnieniem udziału łańcuchów cukrowych oraz reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego GPC.

Badania te mogą mieć potencjalne znaczenie dla hamowania drogi inwazji erytrocytów ludzkich przez *P. falciparum* z udziałem liganda EBA-140 i glikoforyny C.

PÍSMIENICTWO

- [1] Adams J.H., Blair P.L., Kaneko O., Peterson D.S.: An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol., 2001; 17: 297-299
- [2] Adams J.H., Sim B.K., Dolan S.A., Fang X., Kaslow D.C., Miller L.H.: A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89: 7085-7089
- [3] Bannister L.H., Dluzewski A.R.: The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. Blood Cells, 1990; 16: 257-292
- [4] Batchelor J.D., Zahm J.A., Tolia N.H.: Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. Nat. Struct. Mol. Biol., 2011; 18: 908-914
- [5] Birkholtz L.M., Blatch G., Coetzer T.L., Hoppe H.C., Human E., Morris E.J., Ngcete Z., Oldfield L., Roth R., Shonhai A., Stephens L., Louw A.I.: Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. Malar. J., 2008; 7: 197
- [6] Cartron J.P., Le Van Kim C., Colin Y.: Glycophorin C and related glycoproteins: structure, function, and regulation. Semin. Hematol., 1993; 30: 152-168
- [7] Chasis J.A., Mohandas N.: Red blood cell glycophorins. Blood, 1992; 80: 1869-1879
- [8] Cowman A.F., Berry D., Baum J.: The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J. Cell Biol., 2012; 198: 961-971
- [9] Cowman A.F., Crabb B.S.: Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, 2006; 124: 755-766
- [10] Epidemiological surveillance of malaria in countries of central and eastern Europe and selected newly independent states. Report on a WHO intercountry meeting. 2002, Sofia, Bulgaria; http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/98781/E77302.pdf (15.07.2013)
- [11] Feachem R.G., Phillips A.A., Hwang J., Cotter C., Wielgosz B., Greenwood B.M., Sabot O., Rodriguez M.H., Abeyasinghe R.R., Ghebreyesus T.A., Snow R.W.: Shrinking the malaria map: progress and prospects. Lancet, 2010; 376: 1566-1578
- [12] 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
- [13] Global Malaria Programme. WHO World Malaria Report 2012. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_no_profiles.pdf (15.07.2013)
- [14] Goljan J., Felczak-Korzybska I., Nahorski W.L., Myjak P.: Malaria relapse and recrudescence among travellers to the tropics. Int. Marit. Health, 2003; 54: 92-100
- [15] Greenwood B.M., Fidock D.A., Kyle D.E., Kappe S.H., Alonso P.L., Collins F.H., Duffy P.E.: Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. J. Clin. Invest., 2008; 118: 1266-1276
- [16] Grobusch M.P., Kremsner P.G.: Uncomplicated malaria. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2005; 295: 83-104
- [17] Jaśkiewicz E.: Glikoforyny ludzkich erytrocytów jako receptory dla zarodźca sierpowego malarii (*Plasmodium falciparum*). Postępy Hig. Med. Dośw., 2007; 61: 718-724
- [18] Jiang L., Duriseti S., Sun P., Miller L.H.: Molecular basis of binding of the *Plasmodium falciparum* receptor BAEBL to erythrocyte receptor glycophorin C. Mol. Biochem. Parasitol., 2009; 168: 49-54
- [19] Kelly B.J., King L.A., Possee R.D.: Baculovirus and insect cell expression protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2007
- [20] Knap J.P., Myjak P.: Malaria w Polsce i na świecie. Alfa Medica Press, 2009
- [21] Kobayashi K., Kato K., Sugi T., Takemae H., Pandey K., Gong H., Tohya Y., Akashi H.: *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. J. Biol. Chem., 2010; 285: 1716-1725
- [22] Li X., Chen H., Khan A.A., Lauterbach S.B., Lanzillotti R., Rai P.R., Kane R.S., Coetzer T.L., Chishti A.H.: Receptor-based identification of an inhibitory peptide against blood stage malaria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008; 376: 489-493
- [23] 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
- [24] Lisowska E.: Antigenic properties of human erythrocyte glycophorins. Adv. Exp. Med. Biol., 1988; 228: 265-315
- [25] Lobo C.A., Rodriguez M., Reid M., Lustigman S.: Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). Blood, 2003; 101: 4628-4631
- [26] Maier A.G., Baum J., Smith B., Conway D.J., Cowman A.F.: Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. Infect. Immun., 2009; 77: 1689-1699
- [27] 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
- [28] Malpede B.M., Lin D.H., Tolia N.H.: Molecular basis for sialic acid-dependent receptor recognition by the *Plasmodium falciparum* invasion protein erythrocyte-binding antigen-140/BAEGL. J. Biol. Chem., 2013; 288: 12406-12415
- [29] 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
- [30] Mayer D.C., Cofie J., Jiang L., Hartl D.L., Tracy E., Kabat J., Mendoza L.H., Miller L.H.: Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009; 106: 5348-5352
- [31] 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 BAEGL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006; 103: 2358-2362
- [32] Mayer D.C., Kaneko O., Hudson-Taylor D.E., Reid M.E., Miller L.H.: Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98: 5222-5227
- [33] Mayer D.C., Mu J.B., Feng X., Su X.Z., Miller L.H.: Polymorphism in a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand changes its receptor specificity. J. Exp. Med., 2002; 196: 1523-1528
- [34] 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
- [35] Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K.: The pathogenic basis of malaria. Nature, 2002; 415: 673-679
- [36] Narum D.L., Fuhrmann S.R., Luu T., Sim B.K.: A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein-2 (EBP2/BAEGL) involved in erythrocyte receptor binding. Mol. Biochem. Parasitol., 2002; 119: 159-168
- [37] Orlandi P.A., Klotz F.W., Haynes J.D.: A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(a2-3)Gal- sequences of glycophorin A. J. Cell Biol., 1992; 116: 901-909

- [38] Riglar D.T., Richard D., Wilson D.W., Boyle M.J., Dekiwadia C., Turnbull L., Angrisano F., Marapana D.S., Rogers K.L., Whitchurch C.B., Beeson J.G., Cowman A.F., Ralph S.A., Baum J.: Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*, 2011; 9: 9–20
- [39] Sherman I.W.: *Molecular Approaches to Malaria*. ASM Press, Washington, DC, 2005
- [40] Sim B.K.: EBA-175: an erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, 1995; 11: 213–217
- [41] Sim B.K., Chitnis C.E., Wasniowska K., Hadley T.J., Miller L.H.: Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1994; 264: 1941–1944
- [42] Tham W.H., Healer J., Cowman A.F.: Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.*, 2012; 28: 23–30
- [43] 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
- [44] 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
-
- Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.