

Received: 2010.06.02  
Accepted: 2010.11.15  
Published: 2010.11.30

## Białka biorące udział w procesie inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźce wywołujące malarię\*

### Proteins involved in invasion of human red blood cells by malaria parasites

Ewa Jaśkiewicz<sup>1,2</sup>, Jakub Graczyk<sup>2</sup>, Joanna Rydzak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu  
<sup>2</sup> Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

#### Streszczenie

Malaria jest chorobą pasożytniczą wywoływana przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*, które odpowiadają za około 1–2 mln zgonów rocznie, w tym głównie dzieci do piątego roku życia i kobiet w ciąży.

Malarię u ludzi może wywołać pięć gatunków zarodźców: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* oraz *P. falciparum*, z których ostatni jest najbardziej zjadliwy. Zarodek ma dwie fazy cyklu rozwojowego: płciową (sporogonię), która przebiega w organizmie komara i bezpłciową (schizogonię). Faza bezpłciowa odbywa się w organizmie człowieka i dzieli się na dwa etapy: egzoerytrocytarny (wątrobowy) i endoerytrocytarny (wewnątrzkrwinkowy).

Proces inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźce malarii jest wynikiem kaskady swoistych interakcji między białkami pasożyta i krwinki czerwonej. Można wyróżnić cztery główne etapy tego procesu: swoiste przyłączenie merozoitu do erytrocytu, reorientację jednokomórkowego zarodźca polegającą na ustawieniu się końcem apikalnym, utworzenie „ściśłego” i nieodwracalnego wiązania pomiędzy merozoitem a erytrocytem i ostatecznie wniknięcie zarodźca do krwinki z wytworzeniem wakuoli, która jest miejscem jego dalszego rozwoju.

Zidentyfikowano białka ulegające ekspresji w komórkach zarodźca, które biorą udział w poszczególnych etapach. Należy tutaj wymienić m.in.: białka powierzchniowe merozoitów (MSP) związane z błoną komórkową poprzez kotwicę GPI, które odpowiadają za wstępne rozpoznanie i odwracalne wiązanie merozoitów do gatunkowo swoistych erytrocytów; antygen AMA-1 biorący udział w reorientacji części apikalnej komórki zarodźca w kierunku erytrocytu oraz apikalne białka zaangażowane w utworzenie „ściśłego” kontaktu między dwoma komórkami. Ostatnie z wymienionych ligandów można zaliczyć do dwóch rodzin: RBL (reticulocyte-binding-like) oraz DBL (Duffy-binding-like). U *P. falciparum* znaleziono przynajmniej sześć białek z rodziny DBL o nazwach: EBA-175, EBA-140 (BAEBL), EBA-181 (JESEBL), EBA-165 (PEBL) oraz EBL-1.

Poznanie molekularnych podstaw procesu inwazji komórek gospodarza przez pasożyty ma priorytetowe znaczenie dla opracowania efektywnych metod leczenia oraz prewencji malarii, w tym przede wszystkim skutecznych szczepionek. Nadzieje na przyszłość wiąże się z powstaniem wieloantygennowych i wieloepitopowych szczepionek, które zapewniłyby pełną ochronę organizmu na wszystkich etapach procesu inwazji przez zarodźce malarii.

**Słowa kluczowe:** inwazja erytrocytów • zarodek (*Plasmodium*) • białka merozoitów • szczepionki przeciwmalaryczne

\* Praca została przygotowana w ramach projektu grantowego nr N N302 281436 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## Summary

Malaria is a disease caused by parasites of *Plasmodium* species. It is responsible for around 1-2 million deaths annually, mainly children under the age of 5. It occurs mainly in tropical and sub-tropical areas.

Malaria is caused by five *Plasmodium* species: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. knowlesi* and *P. ovale*. Mosquitoes spread the disease by biting humans. The malaria parasite has two stages of development: the human stage and the mosquito stage. The first stage occurs in the human body and is divided into two phases: the liver phase and the blood phase.

The invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites is a multistep process of specific protein interactions between the parasite and red blood cell. The first step is the reversible merozoite attachment to the erythrocyte followed by its apical reorientation, then formation of an irreversible "tight" junction and finally entry into the red cell in a parasitophorous vacuole.

The blood phase is supported by a number of proteins produced by the parasite. The merozoite surface GPI-anchored proteins (MSP-1, 2, 4, 5, 8 and 10) assist in the process of recognition of susceptible erythrocytes, apical membrane antigen (AMA-1) may be directly responsible for apical reorientation of the merozoite and apical proteins which function in tight junction formation. These ligands are members of two families: Duffy binding-like (DBL) and reticulocyte binding-like (RBL) proteins. In *Plasmodium falciparum* the DBL family includes: EBA-175, EBA-140 (BAEBL), EBA-181 (JESEBL), EBA-165 (PEBL) and EBL-1 ligands.

To date, no effective antimalarial vaccine has been developed, but there are several studies for this purpose. Therefore, it is crucial to understand the molecular basis of host cells invasion by parasites. Major efforts are focused on developing a multiantigenic and multi-epitope vaccine preventing all steps of *Plasmodium* invasion.

**Key words:** erythrocyte invasion • *Plasmodium* parasites • merozoite proteins • antimalarial vaccine

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=924419>

**Word count:** 3297

**Tables:** 3

**Figures:** 5

**References:** 61

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

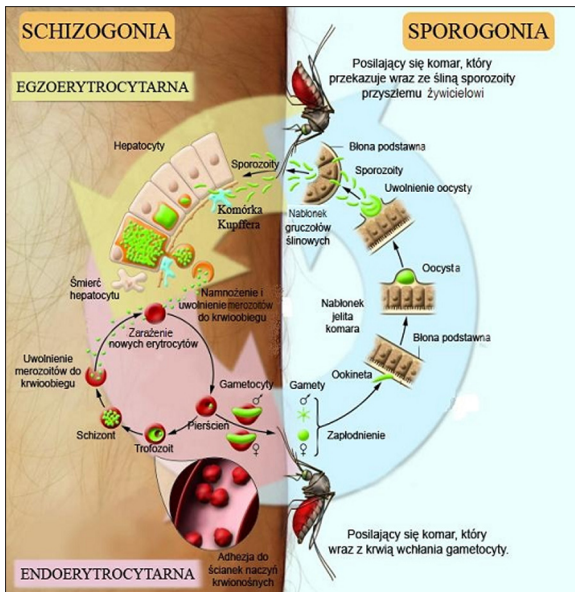
## WPROWADZENIE

Malaria, inaczej nazywana zimnicą, wywołana jest przez pasożyty z rodzaju *Plasmodium* (zarodźce). Wyróżnia się pięć gatunków zarodźców, które mogą się rozwijać w organizmie człowieka i powodować różne odmiany malarii: *P. falciparum* (zarodziec sierpowy), *P. malariae* (zarodziec pasmowy), *P. ovale* (zarodziec owalny), *P. knowlesi* (nie ma odpowiednika polskiego) oraz *P. vivax* (zarodziec ruchliwy) [23]. Spośród nich za najpoważniejszą postać choroby i niemal większość zgonów jest odpowiedzialny *P. falciparum*. Wywołana przez niego malaria tropikalna prowadzi do uszkodzenia organów wewnętrznych w tym śledziony i nerek oraz może przybierać postać mózgową [13,23].

Malaria wciąż pozostaje problemem globalnym. Blisko 2 miliardy ludzi na całym świecie jest zagrożona zarażeniem, przy czym 90% przypadków zachorowań dotyczy ludności krajów afrykańskich zamieszkującej obszary subsaharyjskie. Szacuje się, że rocznie zapada na malarię 300–500

milionów osób, a umiera 1–2 mln, w tym głównie dzieci do piątego roku życia i kobiet w ciąży [18,57]. Jednak malaria nie jest jedynie problemem krajów trzeciego świata. Również i w krajach silnie zindustrializowanych, odnotowuje się kilkanaście tysięcy przypadków rocznie. Dotyczy to głównie osób przybywających ze stref endemicznych: turystów, imigrantów oraz personelu wojskowego.

Obecnie jedynymi, skutecznymi sposobami zapobiegania rozprzestrzenianiu się choroby jest przede wszystkim profilaktyka, w tym kontrola wektorowa z użyciem insektycydów oraz wczesna diagnoza i skuteczne leczenie uwzględniające powstającą lekooporność pasożytów [23,60]. Niestety nie istnieje, jak do tej pory, skuteczna szczepionka uniemożliwiająca zarażenie i/lub zapewniająca skuteczną eliminację zarodźców z organizmu. Kluczem do rozwiązania problemu pozostaje jedynie szczegółowe poznanie istoty samej choroby, w tym biologii *Plasmodium*, jak również molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za proces inwazji oraz za immunologiczną obronę organizmu.



Ryc. 1. Cykl rozwojowy zarodźców wywołujących malarię (według [23 zmodyfikowano])

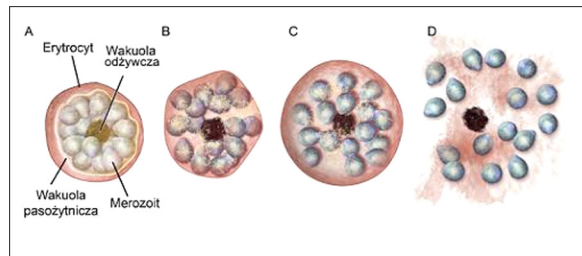
### CYKL ROZWOJOWY ZARODŹCÓW MALARII

U zarodźców wywołujących malarię, tak jak u innych przedstawicieli typu *Apicomplexa*, można wyróżnić dwie fazy cyklu rozwojowego (ryc. 1). Pierwsza nazywana jest płciową (sporogonia) i zachodzi w układzie pokarmowym komarów, między innymi z rodzaju *Anopheles*. Druga natomiast jest bezpłciowa (schizogonia) i przebiega w organizmie ludzkim [11,13,23].

Początkiem cyklu życiowego pasożyta jest zarażenie człowieka przez samicę komara widliszka w wyniku ukąszenia (ryc. 1). Sporozycy są przez komara wprowadzane do ludzkiej skóry właściwej. Te unikając kontaktu z przeciwciałami docierają do naczyń krwionośnych skóry, a stamtąd do krwiobiegu. Następnie sporozycy (w przeciągu 30–40 minut) poprzez krew docierają do wątroby, gdzie wnikają do hepatocytów i rozpoczynają pozakrwinkowy (egzoerytrocytarny) etap rozmnażania, który trwa około tygodnia. Z powstałej w hepatocytach postaci schizonta uwalniane są do krwiobiegu żywiciela merozoity, które zarażają następnie erytrocyty, co jest początkiem schizogonii endoerytrocytarnej [11,13,23].

W zarażonej krwince czerwonej z merozoitu tworzy się forma pierścienia, który poprzez formę trofozoitu rozwija się ponownie w schizonta, uwalniającego merozoity, które zarażają kolejne krwinki czerwone. Z każdego schizonta, który ulega procesowi merulacji, w ciągu 48–72 godzin powstają nowe merozoity (6–24 w zależności od gatunku), tak więc liczebność pasożytów w organizmie żywiciela szybko wzrasta. Endoerytrocytarna faza rozwoju zarodźca jest odpowiedzialna za kliniczne objawy malarii związane z masowym rozpadem erytrocytów [13,23].

Po kilku cyklach wtórnego zarażania erytrocytów, część merozoitów tworzy gametocyty, które jeżeli zostaną pobrane przez samicę komara wraz z krwią zapoczątkują fazę płciową rozwoju *Plasmodium*, czyli sporogonię (ryc. 1).



Ryc. 2. Uwolnienie merozoitów z erythrocytu: A – dojrzałe merozoity w wakuoli pasożytniczej, B – uwolnienie merozoitów z wakuoli pasożytniczej, C – degradacja cytoskieletu komórki, D – pęknięcie błony komórkowej i uwolnienie merozoitów (według [11] zmodyfikowano)

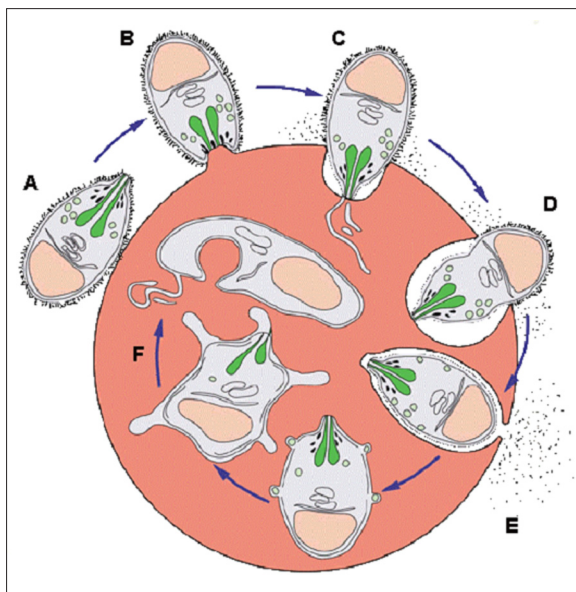
Połączenie gamet, w ciele komara, w zygotę zwaną ookinetą, rozpoczyna proces rozwoju mający na celu wytworzenie nowych sporozycitów. Ookineta zagnieżdża się w nabłonku jelita tworząc oocystę, która następnie dzieli się wielokrotnie, aby utworzyć sporozycy. Sporozycy uwalniają się do jamy ciała i wędrują do gruczołów ślinowych komara. Owad zaraża człowieka w chwili, kiedy dochodzi do ponownego ukąszenia [13,23].

### ZARAŻENIE ERYTROCYTÓW PRZEZ ZARODŹCE

Proces inwazji erytrocytów jest złożony i wieloetapowy, a jego poznanie stało się możliwe dzięki technice wideo-mikroskopii [16] oraz analizie ultrastrukturalnej [6,7].

Aby zarodźce mogły atakować kolejne erytrocyty muszą najpierw uwolnić się z wakuoli pasożytniczej (ryc. 2), w której się rozwijają, a następnie przebić się przez błonę komórkową krwinki czerwonej. Uwolnienie w pełni rozwiniętych merozoitów wiąże się ze zwiększeniem ciśnienia wewnątrzkomórkowego oraz z wieloma procesami biochemicznymi [21,57]. Prowadzi to do destabilizacji cytoskieletu i pęknięcia błony komórkowej erythrocytu. Etap ten przebiega gwałtownie i kończy się eksplozją komórki żywiciela oraz uwolnieniem merozoitów do krwiobiegu. W procesie tym biorą udział najprawdopodobniej proteazy z rodziny SERA (serine repeat antigen), które są umiejscowione w wakuoli pasożytniczej [41]. Proteazy SERA biorą także udział w uwolnieniu dojrzałych sporozycitów z oocysty w jelicie komara [13].

Po wydostaniu się z komórki erythrocytu, merozoity obierają nowy cel – kolejne krwinki czerwone. Pasożyt swoście rozpoznaje krwinkę, wiąże się, a następnie do niej wnika (ryc. 3) [6,16]. Cały proces przebiega bardzo szybko (około 60 s), ze względu na ograniczenie do minimum czasu kontaktu z układem odpornościowym żywiciela. Dzięki wyspecjalizowanym organelom, pasożyt rozróżnia erythrocyty nadające się do zarażenia od innych komórek. Wstępny kontakt między komórkami zachodzi w dowolnym punkcie powierzchni zarodźca (ryc. 3). Reorientacja położenia merozoitu prowadzi do jego ustawienia się końcem apikalnym w kierunku erythrocytu. Następnie tworzy się tzw. „ścisle” wiązanie (tight junction) pomiędzy błoną komórkową erythrocytu a apikalnym końcem merozoitu, zwanym pierścieniem konoidu (ryc. 3, 4). Wiązanie to przesuwa się od wierzchołka szczytowego w kierunku drugiego końca komórki zarodźca. Proces napędzany



Ryc. 3. Proces wnikania merozoitu do krwinki czerwonej (według [11] zmodyfikowano)

jest przez kompleks aktyny i miozyny pasożyta. Pasożyt wnikając w głąb krwinki zrzuca otoczkę okrywającą błonę komórkową, dzięki proteazie serynowej (SUB2), która jest umiejscowiona w mikronemach [25]. Po zagnieżdżeniu w krwince merozoit wytwarza, dzięki organelom nazywanym roptriami (ryc. 4), wakuolę pasożytniczą (ryc. 2) odgradzącą go od cytoplazmy erythrocytu.

Przedstawiony wieloetapowy proces inwazji erythrocytów przez zarodźce wywołujące malarię jest wynikiem złożonych interakcji na poziomie cząsteczkowym. Oddziaływania pomiędzy białkami merozoitów i receptorami na powierzchni erythrocytów, wspólne dla wszystkich gatunków *Plasmodium*, zostaną omówione dalej, ze szczególnym uwzględnieniem *P. falciparum*.

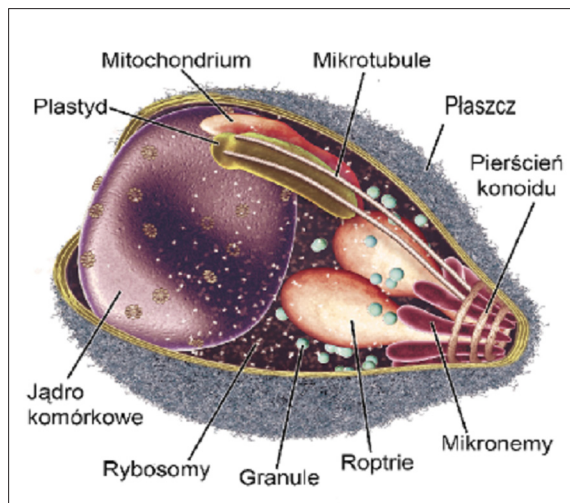
#### BIAŁKA BIORĄCE UDZIAŁ W PROCESIE INWAZJI

##### Etap I – wstępne wiązanie merozoitów do erythrocytów

##### Powierzchniowe białka GPI merozoitów

Kontakt między komórką zarodźca i krwinką jest przypadkowy i może do niego dojść w dowolnym punkcie. Wiązanie to jest odwracalne, lecz swoiste, ponieważ merozoity wiążą jedynie erythrocyty właściwego dla siebie gospodarza (człowieka, małpy lub gryzonia), co wskazuje na swoiste oddziaływanie międzycząsteczkowe [40].

Powierzchnia merozoitu pokryta jest białkami związanymi z błoną komórkową poprzez kotwicę glikozylofosfatydiloinozytolową (GPI) [54]. Zidentyfikowano i opisano dziewięć takich białek na powierzchni merozoitów (MSP, merozoite surface proteins) (tab. 1), które mogą być potencjalnymi ligandami biorącymi udział w wiązaniu do erythrocytów. Białka GPI *Plasmodium* mają podobną budowę i zawierają na C-końcu bogate w cysteinę domeny, w tym domeny EGF-podobne (epidermal growth factor-like),



Ryc. 4. Schemat budowy merozoitu z wyszczególnionymi głównymi organelami (według [11] zmodyfikowano)

Tabela 1. Właściwości niektórych powierzchniowych białek GPI *P. falciparum*

Nazwa	Funkcja/struktura
MSP-1	przypuszczalny ligand białka pasma 3 rbc, dwie C-końcowe domeny typu EGF, ważny dla inwazji
MSP-2	wysoce polimorficzny
MSP-4	pojedyncza C-końcowa domena typu EGF
MSP-5	homolog białka MSP-4, niewymagany do inwazji
MSP-10	występuje na powierzchni i apikalnym końcu, C-terminalna domena typu EGF
Pf12	członek rodziny białek „6-cys”
Pf38	członek rodziny białek „6-cys” występujący na powierzchni i apikalnym końcu
Pf92	powierzchniowe białko bogate w cysteinę
Pf113	przypuszczalne białko powierzchniowe

które jak się sugeruje są odpowiedzialne za interakcję między białkami [10].

MSP-1 jest najliczniejszym białkiem na powierzchni merozoitu [22]. Jest ono niezbędne do prawidłowego funkcjonowania zarodźca, nie można bowiem otrzymać zarodźców bez genu kodującego MSP-1 (knock out). Najprawdopodobniej, ze względu na równomierne umiejscowienie, jest ono białkiem zapoczątkującym kontakt między *Plasmodium*, a krwinką czerwoną. Przypuszcza się, że decydujące znaczenie w tym procesie ma związany z błoną 90-aminokwasowy fragment MSP-1<sub>19</sub>, zawierający dwie domeny typu EGF, którego struktura została poznana [52]. Przypomina ona płaski dysk utrzymywany przez 6 wiązań disiarczkowych, w którym dwie domeny EGF nachodzą na siebie. Wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko fragmentowi MSP-1<sub>19</sub> blokują proces inwazji erythrocytów *in vitro* oraz zapewniają ochronę przed

zarażeniem *P. falciparum* u myszy i małą szczepionych re-kombinowanym fragmentem MSP-1<sub>19</sub> [33].

### Powierzchniowe białka peryferyjne merozoitów

Kolejnymi ligandami mogącymi brać udział w wiązaniu zarodźca do krwinek żywiciela są białka peryferyjne, które są wydzielane do wakuoli pasożytniczej podczas rozwoju schizonta (tab. 2) [45]. Przyłączają się one do rozwijających się merozoitów dzięki interakcji z białkami GPI (np. MSP-1). Zdecydowana większość białek peryferyjnych należy do jednej z trzech głównych rodzin: MSP3/6, MSP-7 oraz do proteaz SERA (tab. 2).

Wydaje się, że jedynie kilka białek peryferyjnych, w tym białka z rodziny MSP-7 oraz Pf41, jest wystarczająco silnie związanych z powierzchnią merozoitu, aby móc pełnić rolę adhezyn. Pozostałe mogą pełnić funkcje strukturalne (w tym MSP-3 i MSP-6) [54].

### Etap II i III – apikalna reorientacja merozoitów i „ściśle” wiązanie do erytrocytów

#### Białka apikalnych organelli merozoitu

Apikalne ustawienie merozoitu względem erytrocytu jest konieczne w procesie wnikania pasożyta do komórki żywiciela. Wykazano, że białko AMA-1 (apical membrane antigen) (tab. 3) bierze bezpośredni udział w tym procesie, ponieważ PfAMA-1 jest transportowane na powierzchnię merozoitu przed rozpoczęciem ataku na erytrocyty, a reorientację *Plasmodium* można swoiście zahamować przeciwciałami rozpoznającymi ten antygen [42].

AMA-1 jest integralnym białkiem typu I, zlokalizowanym w mikronemach, jego fragment zewnętrzny składa się z 3 domen: N-końcowej, centralnej i C-końcowej. Ektodomena AMA-1 zawiera 16 reszt cysteiny, które są konserwatywne w obrębie rodzaju *Plasmodium* [29]. AMA-1 jest syntetyzowany jako cząsteczka o ciężarze 66 kDa, która ulega obróbce proteolitycznej podczas transportu na powierzchnię merozoitu. Wydaje się, że AMA-1 stanowić może pomost, który stabilizuje słabe oddziaływania z udziałem białek MSP i umożliwia kolejny etap „ściśłego” wiązania do erytrocytu z udziałem innych białek apikalnych organelli.

Utworzenie „ściśłego” kontaktu między apikalnym końcem pasożyta i krwinką jest nieodwracalne i równoznaczne z rozpoczęciem procesu inwazji. Zidentyfikowano i scharakteryzowano wiele ligandów apikalnych organelli *P. falciparum* i receptorów na erytrocytach, które uczestniczą w adhezji i umożliwiają wnikanie merozoitu do wnętrza krwinki (tab. 3) [18]. Należą one do dwóch rodzin: białek homologicznych do liganda wiążącego antygen Duffy *P. vivax*/knowlesi (Duffy binding-like – DBL) i białek wiążących retikulocyty (reticulocyte binding-like – RBL).

Szczególnie interesująca wydaje się rodzina białek DBL mikronemów *P. falciparum*, do której należą ligandy: EBA-175, EBA-140 (znany też pod nazwą BAEBL), EBA-181 (inaczej JSEBL), EBA-165 (PEBL, przypuszczalnie nieulegający ekspresji) oraz EBL-1 [23]. Wszystkie ligandy DBL mają podobną budowę łańcucha polipeptydowego,

Tabela 2. Właściwości niektórych powierzchniowych białek peryferyjnych *P. falciparum*

Nazwa	Funkcja/struktura
ABRA	nieznana funkcja, prawdopodobnie proteaza
S-antigen	nieznana funkcja
GLURP	nieznana funkcja,
MSP3	słabo związane z powierzchnią tetrameryczne, wydłużone cząsteczki
MSP6	białko MSP-3-podobne, słabo związane z MSP-1
H101	białko MSP3-podobne, nieznana funkcja
H103	białko MSP3-podobne, nieznana funkcja
MSP7	białko wiążące MSP-1, silnie związane, rola w inwazji
MSP7-podobne	prawdopodobnie białko wiążące MSP-1
MSP7-podobne	prawdopodobnie białko wiążące MSP-1
Pf41	członek rodziny białek „6-cys”, apikalny koniec merozoitu
SERA3	domena proteazy cysteinowej
SERA4	domena proteazy cysteinowej, ekspresja w schizontie
SERA5	domena proteazy cysteinowej, silna ekspresja w schizontie
SERA6	domena proteazy cysteinowej, ekspresja w schizontie

na którą składają się N-końcowy fragment zewnątrzłonowy, domena transłonowa oraz fragment cytoplazmatyczny. W obrębie N-końcowego fragmentu można wyróżnić dwa regiony (RII oraz RVI) zawierające dużą liczbę konserwatywnych reszt cysteiny. Charakterystyczną cechą ligandów DBL *P. falciparum*, w odróżnieniu od *P. vivax*, jest obecność dwóch homologicznych domen F1 i F2 składających się na Region II [1].

Na podstawie badań dotyczących najwcześniej poznanego liganda EBA-175 ustalono, że za wiązanie do erytrocytów odpowiedzialny jest Region II, a zwłaszcza jego domena F2 [56]. Wykazano, że receptorem dla białka EBA-175 *P. falciparum* jest główna sjałoglikoproteina erytrocytów – glikoforyna A (GPA). W wiązaniu biorą udział reszty  $\alpha(2,3)$  kwasu sjałowego O-glikozydowych łańcuchów cukrowych, znajdujących się w klasterach, których konformacja zależy od struktury N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego GPA. Otrzymano strukturę krystaliczną Regionu II liganda EBA-175, który może krystalizować w postaci monomeru lub homodimeru utworzonego przez dwie cząsteczki ułożone względem siebie przeciwrównolegle, tworząc strukturę „uściśniętych dłoni” [59]. Pozwoliło to na wyjaśnienie molekularnych podstaw interakcji miejsca wiążącego antygen EBA-175 z O-glikozydowymi łańcuchami cukrowymi GPA. Uzyskane wyniki są niezwykle istotne nie tylko w kontekście poznawczym, ale

Tabela 3. Wybrane białka wytwarzane przez apikalne organelle *P. falciparum*

Nazwa	Funkcje/struktura
AMA-1	66 kDa, receptor nieznan, rola w reorientacji
EBA-140/BAEBL	140 kDa, wiąże glikoforynę C (antygen Gerbich) erytrocytów
EBA-175	175 kDa, wiąże glikoforynę A erytrocytów
EBA-181/JESEBL	181 kDa, wiąże nieznan receptor W odporny na trypsynę
EBL-1	304 kDa, wiąże glikoforynę B erytrocytów
MTRAP	białko kompleksu aktynowo-miozynowego
ASP	przypuszczalnie białko GPI
SUB2	proteaza serynowa, uwalnia MSP-1/AMA-1
Rh1	350 kDa, wiąże erytrocyty poprzez nieznan receptor Y odporny na trypsynę, zależny od kwasu sjałowego
Rh2a	370 kDa, receptor nieznan
Rh2b	370 kDa, wiąże erytrocyty poprzez nieznan receptor Z odporny na trypsynę, niezależny od kwasu sjałowego
Rh3	prawdopodobnie nieekspresjonowany
Rh4	220 kDa, funkcja nieznan

i praktycznym, zmierzającym do otrzymania skutecznych leków, na przykład inhibitorów konkurencyjnych miejsca wiążącego EBA-175.

Podobnie jak w przypadku liganda EBA-175 ustalono, że homologiczny antygen *P. falciparum* EBA-140 rozpoznaje na erytrocytach, inną sjałoglikoproteinę występującą w najmniejszej ilości – glikoforynę C (GPC) [34,37,39]. Jak poprzednio w wiązaniu biorą udział reszty kwasu sjałowego łańcuchów oligosacharydowych N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego GPC. Szczegółowa charakterystyka oddziaływania EBA-140-GPC przeprowadzona w kilku laboratoriach zaowocowała natomiast sprzecznymi wynikami dotyczącymi miejsca wiązania na cząsteczce GPC. Wyniki te wymagają wyjaśnienia, którego podjęliśmy się również i w naszym laboratorium, zajmującym się od wielu lat glikoforynami erytrocytów ludzkich [31]. Wymaga to poznania niezbadanej, jak do tej pory, struktury N-glikanu GPC, który bierze przypuszczalnie udział w wiązaniu oraz użycia rekombinowanej formy Regionu II liganda EBA-140, którą ostatnio otrzymaliśmy [wyniki własne, nieopublikowane].

Najnowsze badania wykazały ponadto, że receptorem dla kolejnego liganda *P. falciparum* EBL-1 jest druga pod względem ilościowym, homologiczna do GPA sjałoglikoproteina erytrocytów – glikoforyna B (GPB) [38]. Podobnie jak w przypadku ligandów EBA-175 i EBA-140, wiązanie białka EBL-1 *P. falciparum* do erytrocytów jest zależne

od reszt kwasu sjałowego, lecz wymaga dalszej szczegółowej charakterystyki.

Białka roptrii *P. falciparum* z rodziny RBL (tab. 3) są homologami ligandów wytwarzanych przez roptrie u *P. vivax*, które uczestniczą w inwazji tylko na młode krwinki, tzw. retikulocyty. Należą do nich cztery białka: PfrRh1 (PfrBp1), PfrRh2a (PfrBp2a), PfrRh2b (PfrBp2b) i PfrRh4 (PfrBp4), które prawdopodobnie pełnią podobną funkcję do białek z rodziny DBL (tab. 3) [58]. Zostały scharakteryzowane receptory na erytrocytach wiążące ligandy PfrRh1 oraz PfrRh2b.

Przypuszczalnie obecność wielu ligandów umożliwia *P. falciparum* wykorzystanie alternatywnych dróg inwazji, które mogą być dostosowywane do różnych receptorów na erytrocytach, zmieniających się w zależności od wieku krwinki oraz danej populacji ludzkiej. Umożliwia to zwiększenie skuteczności zarażenia *P. falciparum* w porównaniu z *P. vivax/knowlesi*, którego jedynym receptorem na erytrocytach jest antygen Duffy, wiążący preferencyjnie retikulocyty. Dodatkową korzyścią jest również dezorientacja układu immunologicznego, który musi odpowiadać wciąż na nowe antygeny. Fakt ten jednocześnie sprawia, że zablokowanie inwazji *P. falciparum* jest wyjątkowo trudne i wymaga kompleksowego zahamowania wielu czynników jednocześnie.

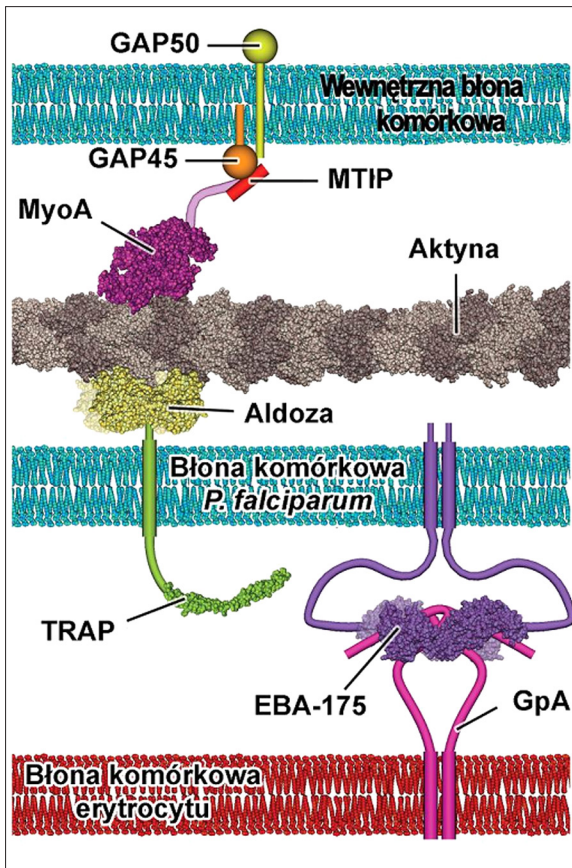
#### DODATKOWE BIAŁKA POŚREDNICZĄCE W PROCESIE INWAZJI

W chwili, kiedy zarodek wytworzy, dzięki apikalnemu końcowi, „ściste” wiązanie wprowadza do krwinki związku mediujące proces inwazji, o których na razie niewiele wiadomo. Są one wydzielane przez mikronemy oraz roptrie i mają na celu stabilizację procesu tworzenia wakuoli pasożytniczej [24]. Prawdopodobnie *P. falciparum* może wykorzystywać również białka komórki nosiciela, ponieważ występuje aktywacja receptorów  $\beta_2$ -adrenergicznych erytrocytu z udziałem białek G [26].

#### Kompleks aktynowo-miozynowy

Jednym z najważniejszych elementów wspomagających proces inwazji jest kompleks aktyna-miozyna, który bierze udział we wnikaniu merozoitu do komórki żywiciela (ryc. 5) [11].

Białka biorące udział w wiązaniu pasożyta do cytoszkieletu zostały poznane głównie u sporozoitów, które infekują komórki wątroby. Sugeruje się, że białko TRAP *P. falciparum* wiąże się krótkim końcem cytoplazmatycznym poprzez aldolazę z F-aktyną, która poprzez kompleks miozyny A z białkami MTIP oraz GAP 45 asocjuje z transbłonowym białkiem GAP50 (ryc. 5) [8]. Cały kompleks zakotwiczony w wewnętrznej błonie komórkowej merozoitu wprawia inwazyjną postać zarodźca w ruch, od apikalnego do przeciwnego końca (ryc. 3). Wnikanie w głąb erytrocytu umożliwiają wyspecjalizowane proteazy trawiące adhezyny w regionach przechodzących przez błonę *Plasmodium*. Ponieważ funkcjonowanie kompleksu aktynowo-miozynowego u *Apicomplexa* wydaje się podobne, leki wymierzone w ten kompleks mogłyby pomóc w walce nie tylko z malarią, ale i z innymi pasożytniczymi chorobami, np. z toksoplazmozą.



Ryc. 5. Schemat budowy kompleksu aktynowo-miozynowego merozoitu (według [11] zmodyfikowano)

#### BIAŁKA UCZESTNICZĄCE W PROCESIE INWAZJI JAKO POTENCJALNE SKŁADNIKI SZCZEPIONEK PRZECIWMALARYCZNYCH

Malaria stanowi nadal globalny problem. Podejmowane ogólnoswiatowe wysiłki zmierzające do jego likwidacji, obejmujące profilaktykę i leczenie, okazały się nie w pełni skuteczne. Świadczy o tym wciąż ogromna liczba zachorowań i zgonów na malarię. Wydaje się, że jedynym panaceum mogłaby być szczepionka, która zapewniłaby skuteczne zablokowanie procesu inwazji komórek oraz eliminację pasożytów z organizmu człowieka.

Pierwsze próby prowadzone w latach 60. i 70. ubiegłego wieku z użyciem atenuowanych napromieniowaniem sporozoitów *P. falciparum* wykazały dobrą skuteczność takich szczepionek [35]. Są one wciąż punktem odniesienia dla opracowania nowoczesnych szczepionek podjednostkowych, których powstanie wymusiły trudności praktyczne w uzyskaniu odpowiedniej liczby atenuowanych zarodźców oraz względy bezpieczeństwa. Otrzymanie skutecznych szczepionek podjednostkowych wiąże się z dogłębną znajomością procesu inwazji i białek biorących w nim udział. Szacuje się, że więcej niż 5200 genów *Plasmodium* może kodować białka nadające się do pełnienia roli antygenów w potencjalnych szczepionkach antymalarycznych [20]. Celem najnowszych szczepionek jest łączenie jak największej ilości białek zaangażowanych we wszystkie etapy inwazji [14,47,51].

I tak kolejno, białka sporozoitów zarażających hepatocyty stanowią składniki szczepionek, których zadaniem jest blokowanie inwazji już na poziomie wątrobowym [28]. Rekombinowany, C-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego (r.a. 207-395) białka CSP (circumsporozoite protein) *P. falciparum*, w fuzji z antygenem powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B, został wykorzystany przez firmę Glaxo-Smith-Kline we współpracy z Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) przy opracowywaniu obecnie najbardziej obiecującej szczepionki RTS,S. Częściowa ochrona przed kliniczną postacią malarii, rzędu 30% została uzyskana w testach prowadzonych w Mozambiku na grupie dzieci w wieku 1–4 lat. Wykazano również utrzymującą się aż do 18 miesięcy ochronę przed zarażeniem u dzieci i niemowląt [2,3]. Inną szczepionką, która bazuje na syntetycznym peptydzie złożonym ze 120 r.a. odpowiadających C-końcowemu fragmentowi białka CSP *P. falciparum* była szczepionka CS102. W połączeniu z adiuwantem Montanide ISA pomyślnie przeszła testy kliniczne I fazy, lecz próby fazy II nie wykazały jej skuteczności w ochronie przed malarią [53].

Blokowanie inwazji pasożyta na poziomie komórek wątrobowych może się odbywać również poprzez uniemożliwienie wytwarzania wakuoli PV (parasitophorous vacuole) przez sporozycy. Do wytworzenia tej wakuoli konieczne są białka z rodziny „6-Cys”. Wykazano, że sporozycy zawierające mutanty delecyjne białek „6-Cys” wnikają do hepatocytów, ale nie rozwijają się dalej [43]. Mogą służyć zatem przy konstrukcji szczepionek, jako genetycznie atenuowane pasożyty. Badania na myszach wykazały, że szczepionka oparta o te mutanty indukuje pełną ochronę przed późniejszą inwazją przez około 6 miesięcy. Nadzieja na pozytywny wynik badań na ludziach wynika ze wcześniejszych doświadczeń ze szczepionkami zawierającymi napromieniowane, żywe sporozycy [35].

Analiza procesu inwazji erytrocytów przez merozoity wskazała kolejne, białkowe składniki szczepionek blokujących rozwój choroby w fazie erytrocytarnej. Zastosowano białka powierzchniowe merozoitów, w tym białka GPI: MSP-1 i MSP-2 oraz białko peryferyjne MSP-3. Badania *in vitro* wykazały, że przeciwciała rozpoznające białko MSP-1 blokują inwazję erytrocytów ludzkich [45]. Dobrym celem dla szczepionki wydaje się jego podwójna C-końcowa domena EGF, gdyż wykazuje ona dużą konserwatywność wśród wszystkich szczepów *Plasmodium* [61]. Białka MSP-1 i MSP-2 są składnikami szczepionki „Combination B”, która zawiera również antygen powierzchniowy zainfekowanego erytrocytu RESA (ring-stage infected-erythrocyte surface antygen) oraz adiuwant Montanide [19]. Faza III testów klinicznych na 120 dzieciach z obszaru Papua Nowa Gwinea wykazała jej 62% skuteczność wobec szczepu 3D7 *P. falciparum*. Niestety, z powodu wysokiego polimorfizmu MSP-2 obserwowanego wśród *Plasmodium*, skuteczność szczepionki gwałtownie zmalała wobec innego klonu FC27. Inne propozycje szczepionek oparte zostały na dwóch rekombinowanych, C-końcowych fragmentach białka MSP-1: fragmencie 42 kDa oraz 19 kDa. Fragment 42 kDa (nazwany FMP1) w połączeniu z adiuwantem AS02 stanowi bazę szczepionki opracowanej przez Glaxo-Smith-Kline we współpracy z Walter Reed Army Institute of Research. Została ona poddana testom klinicznym II fazy na małej grupie dzieci w Kenii [50]. Rezultaty niestety nie

były zadowalające. W Instytucie Pasteura w Paryżu przy współpracy EMVI (European Malaria Vaccine Initiative) opracowano natomiast szczepionkę na bazie syntetycznego polipeptydu odpowiadającego fragmentowi białka MSP-3, który zawiera epitopy dla komórek B i T [5]. Faza I testów klinicznych wykazała, że jest bezpieczna. Indukuje ona u myszy powstawanie długo utrzymujących się przeciwciał zdolnych do hamowania rozwoju *P. falciparum* w obecności monocytów (aktywność ADCI, antibody-dependent cellular inhibition) [15].

Uwzględnia się także i inne syntetyczne peptydy indukujące powstawanie przeciwciał o aktywności ADCI. Efektem współpracy Duńskiego Instytutu Surowic i EMVI jest szczepionka zawierająca syntetyczny polipeptyd powierzchniowego białka merozoitu GLURP (glutamate-rich protein) [27]. Natomiast szczepionka oparta o podjednostki SERA, była testowana w połączeniu z różnymi adiuwantami na małpach szerokonosych (*Aotus*) [30].

Grupa białek wytwarzanych przez apikalne organelle merozoitów, zwłaszcza antygen AMA-1 oraz rodzina antygenów EBA, które są odpowiedzialne za utworzenie „ścislego” wiązania między merozoitem a krwinką są szczególnie interesujące jako składniki szczepionek.

U gryzoni i ssaków naczelnych (z wyjątkiem ludzi) rekombinowana postać AMA-1 wykazała zdolność do indukowania swoistej dla szczepu ochrony przed malarią. Niestety wysoki polimorfizm AMA-1 stanowi problem dla twórców uniwersalnych szczepionek przeciwmalarycznych. Wciąż trwają testy kliniczne fazy I szczepionek zawierających AMA-1 w połączeniu z adiuwantem Montanide ISA 720 w USA, na Mali, w Kenii oraz w Australii [55]. Planowana jest II faza testów klinicznych. Białka AMA-1 oraz MSP-1 zastosowano jednocześnie w innej szczepionce w celu zwiększenia jej uniwersalności i skuteczności. Wyprodukowana w Szanghaju szczepionka PfCP-2.9 zawierała fuzyjny antygen MSP-1/AMA-1 utworzony przez

połączenie C-końcowego regionu AMA-1 oraz 19 kDa fragmentu MSP-1. Przeszła ona pomyślnie I fazę prób klinicznych w Chinach [46]. Antygen AMA-1 stosuje się również w połączeniu z białkiem CSP. Przykładem jest szczepionka MVA (modified vaccina Ankara) opracowywana na Uniwersytecie w Oksfordzie, która zawiera atenuowane wirusy ptasiej ospy jako wektory dla ekspresji białek AMA-1 i CSP [9].

W fazie intensywnych badań są omówione wcześniej szczegółowo ligandy mikronemów *P. falciparum*: EBA-175, EBA-140 oraz EBA-181. Stwierdzono, że mają one zdolność do indukcji przeciwciał u zwierząt doświadczalnych, a przeciwciała te efektywnie blokują inwazję erytrocytów przez *P. falciparum* [32,44]. Co jest istotne, rekombinowane formy regionu wiążącego tych ligandów są rozpoznawane przez naturalne przeciwciała obecne u osób chorych na malarię [12,17,49]. Świadczy to o istotnym znaczeniu drogi inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca sierpowego, przebiegającej z udziałem antygenów EBA, co stawia je w rzędzie potencjalnych składników szczepionki przeciw malarii [48,49]. Przeszkodą w uniwersalnym zastosowaniu takiej szczepionki może być jednakże wysoki polimorfizm ligandów EBA-140 i EBA-181 [36].

Przedstawione przykłady pozwalają uzmysłowić wysiłki związane z opracowaniem skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwmalarycznej. Niestety, wieloetapowa droga inwazji komórek człowieka, mnogość gatunków zarodźca oraz duża liczba polimorficznych białek biorących udział w zarażeniu nadal daje pasożytom przewagę i sprawia, że nadal nie ma takiej szczepionki. Jak się wydaje, największe szanse na sukces mają jedynie wieloantygennowe i/lub wieloepitopowe szczepionki, które zawierają wiele białek lub domen białkowych odnoszących się do kilku etapów rozwoju zarodźca [14,47,51]. Z całą pewnością jednak intensywne i prowadzone na szeroką skalę badania pozwalające na lepsze zrozumienie molekularnych podstaw inwazji to nadzieja na opracowanie nowoczesnej szczepionki w przyszłości.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] 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
- [2] Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Leach A., Macete E., Aide P., Sigauque B., Milman J., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espasa M., Corachan S., Lievens M., Navia M.M., Dubois M.C., Menendez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ballou W.R.: Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomized controlled trial. *Lancet*, 2005; 366: 2012–2018
- [3] Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M.M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M.C., Demoitie M.A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ballou W.R., Thompson R., Cohen J.: Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomized controlled trial. *Lancet*, 2004; 364: 1411–1420
- [4] Aly A.S., Matuschewski K.: A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium sporozoite* egress from oocysts. *J. Exp. Med.*, 2005; 202: 225–230
- [5] Audran R., Cachat M., Lurati F., Soe S., Leroy O., Corradin G., Druilhe P., Spertini F.: Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 8017–8026
- [6] Bannister L.H., Dlugewski A.R.: The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, 1990; 16: 257–292
- [7] Bannister L.H., Hopkins J.M., Fowler R.E., Krishna S., Mitchell G.H.: A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today*, 2000; 16: 427–433
- [8] Baum J., Richard D., Healer J., Rug M., Krnjaiski Z., Gilberger T.W., Green J.L., Holder A.A., Cowman A.F.: A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 5197–5208
- [9] Bejon P., Mwacharo J., Kai O., Mwangi T., Milligan P., Todryk S., Keating S., Lang T., Lowe B., Gikonyo C., Molyneux C., Fegan G., Gilbert S.C., Peshu N., Marsh K., Hill A.V.: A phase 2b randomised trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS Clin. Trials*, 2006; 1: e29
- [10] Black C.G., Wang L., Wu T., Coppel R.L.: Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003; 127: 59–68
- [11] Cowman A.F., Crabb B.S.: Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 2006; 124: 755–766.
- [12] Daugherty J.R., Murphy C.I., Doros-Richert L.A., Barbosa A., Kashala L.O., Ballou W.R., Snellings N.J., Ockenhouse C.F., Lanar D.E.: Baculovirus-mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 3631–3637



- [13] Deryło A.: Wybrane zagadnienia z parazytologii ogólnej. W: Parazytologia i akaroparazytologia medyczna. Deryło A. (red), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002
- [14] Doolan D.L., Stewart V.A.: Status of malaria vaccine R&D in 2007. *Expert Rev. Vaccines*, 2007; 6: 903–905
- [15] Druilhe P., Spertini F., Soesoe D., Corradin G., Mejia P., Singh S., Audran R., Bouzidi A., Oeuvray C., Roussilhon C.: A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.*, 2005; 2: e344
- [16] Dvorak J.A., Miller L.H., Whitehouse W.C., Shiroishi T.: Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, 1975; 187: 748–750
- [17] Ford L., Lobo C.A., Rodriguez M., Zalis M.G., Machado R.L., Rossit A.R., Cavasini C.E., Couto A.A., Enyong P.A., Lustigman S.: Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* invasion ligand proteins in individuals living in malaria-endemic areas in Brazil and Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007; 77: 977–983
- [18] 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
- [19] Genton B., Betuela I., Felger I., Al-Yaman F., Anders R.F., Saul A., Rare L., Baisor M., Lorry K., Brown G.V., Pye D., Irving D.O., Smith T.A., Beck H.P., Alpers M.P.: A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.*, 2002; 185: 820–827
- [20] Girard M.P., Reed Z.H., Friede M., Kieny M.P.: A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine*, 2007; 25: 1567–1580
- [21] Glushakova S., Yin D., Li T., Zimmerberg J.: Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr. Biol.*, 2005; 15: 1645–1650
- [22] Goel V.K., Li X., Chen H., Liu S.C., Chishti A.H., Oh S.S.: Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 5164–5169
- [23] 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
- [24] Hakansson S., Charron A.J., Sibley L.D.: *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.*, 2001; 20: 3132–3144
- [25] Harris P.K., Yeoh S., Dlugowski A.R., O'Donnell R.A., Withers-Martinez C., Hackett F., Bannister L.H., Mitchell G.H., Blackman M.J.: Molecular identification of a malaria merozoite surface shedase. *PLoS Pathog.*, 2005; 1: 241–251
- [26] Harrison T., Samuel B.U., Akompong T., Hamm H., Mohandas N., Lomasney J.W., Haldar K.: Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science*, 2003; 301: 1734–1736
- [27] Hermesen C.C., Verhage D.F., Telgt D.S., Teelen K., Bousema J.T., Roestenberg M., Bolad A., Berzins K., Corradin G., Leroy O., Theisen M., Sauerwein R.W.: Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine*, 2007; 25: 2930–2940
- [28] Hill A.V.: Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 21–32
- [29] Hodder A.N., Crewther P.E., Matthew M.L., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Anders R.F.: The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 29446–29452
- [30] Inselburg J., Bathurst I.C., Kansopon J., Barchfeld G.L., Barr P.J., Rossan R.N.: Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum*: adjuvant effects on induction of protective immunity. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 2041–2047
- [31] Jaśkiewicz E.: Glikoforyny ludzkich erytrocytów jako receptory dla zarodźca sierpowego malarii (*Plasmodium falciparum*). *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 718–724
- [32] Liang H., Narum D.L., Fuhrmann S.R., Luu T., Sim B.K.: A recombinant baculovirus-expressed *Plasmodium falciparum* receptor-binding domain of erythrocyte binding protein EBA-175 biologically mimics native protein. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 3564–3568
- [33] Ling I.T., Ogun S.A., Holder A.A.: Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol.*, 1994; 16: 63–67
- [34] Lobo C.A., Rodriguez M., Reid M., Lustigman S.: Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand P1EBP-2 (baebl). *Blood*, 2003; 101: 4628–4631
- [35] Luke T.C., Hoffman S.L.: Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J. Exp. Biol.*, 2003; 206: 3803–3808
- [36] 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
- [37] 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
- [38] 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
- [39] 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
- [40] Miller L.H., Aikawa M., Johnson J.G., Shiroishi T.: Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J. Exp. Med.*, 1979; 149: 172–184
- [41] Miller S.K., Good R.T., Drew D.R., Delorenzi M., Sanders P.R., Hodder A.N., Speed T.P., Cowman A.F., de Koning-Ward T.F., Crabb B.S.: A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 47524–47532
- [42] Mitchell G.H., Thomas A.W., Margos G., Dlugowski A.R., Bannister L.H.: Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 154–158
- [43] Mueller A.K., Labaied M., Kappe S.H., Matuschewski K.: Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*, 2005; 433: 164–167
- [44] 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
- [45] Pachebat J.A., Ling I.T., Grainger M., Trucco C., Howell S., Fernandez-Reyes D., Gunaratne R., Holder A.A.: The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001; 117: 83–89
- [46] Pan W., Huang D., Zhang Q., Qu L., Zhang D., Zhang X., Xue X., Qian F.: Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *J. Immunol.*, 2004; 172: 6167–6174
- [47] Patarroyo M.E., Patarroyo M.A.: Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Acc. Chem. Res.*, 2008; 41: 377–386
- [48] Pattnaik P., Shakri A.R., Singh S., Goel S., Mukherjee P., Chitnis C.E.: Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine based on receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175. *Vaccine*, 2007; 25: 806–813
- [49] Persson K.E., McCallum F.J., Reiling L., Lister N.A., Stubbs J., Cowman A.F., Marsh K., Beeson J.G.: Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 342–351
- [50] Pichyangkul S., Gettayacamin M., Miller R.S., Lyon J.A., Angov E., Tongtawe P., Ruble D.L., Heppner D.G. Jr., Kester K.E., Ballou W.R., Diggs C.L., Voss G., Cohen J.D., Walsh D.S.: Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate *P. falciparum* MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine*, 2004; 22: 3831–3840
- [51] Pierce S.K., Miller L.H.: World Malaria Day 2009: What malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J. Immunol.*, 2009; 182: 5171–5177
- [52] Pizarro J.C., Chitarra V., Verger D., Holm I., Petres S., Darteville S., Nato F., Longacre S., Bentley G.A.: Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *J. Mol. Biol.*, 2003; 328: 1091–1103
- [53] Roggero M.A., Filippi B., Church P., Hoffman S.L., Blum-Tirouvanziam U., Lopez J.A., Esposito F., Matile H., Reymond C.D., Fasel N., Corradin G.: Synthesis and immunological characterization of 104-mer and 102-mer peptides corresponding to the N- and C-terminal regions of the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Mol. Immunol.*, 1995; 32: 1301–1309

- [54] Sanders P.R., Gilson P.R., Cantin G.T., Greenbaum D.C., Nebl T., Carucci D.J., McConville M.J., Schofield L., Hodder A.N., Yates J.R., Crabb B.S.: Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 40169–40176
- [55] Saul A., Lawrence G., Allworth A., Elliott S., Anderson K., Rzepczyk C., Martin L.B., Taylor D., Eisen D.P., Irving D.O., Pye D., Crewther P.E., Hodder A.N., Murphy V.J., Anders R.F.: A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine*, 2005; 23: 3076–3083
- [56] 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
- [57] Snow R.W., Guerra C.A., Noor A.M., Myint H.Y., Hay S.I.: The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2005; 434: 214–217
- [58] Taylor H.M., Grainger M., Holder A.A.: Variation in the expression of a *Plasmodium falciparum* protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 5779–5789
- [59] 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
- [60] White N.J.: Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 1084–1092
- [61] Woehlbier U., Epp C., Kauth C.W., Lutz R., Long C.A., Coulibaly B., Kouyaté B., Arevalo-Herrera M., Herrera S., Bujard H.: Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.*, 2006; 74: 1313–1322

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.