

Programirana stanična smrt u praživotinja

Jantol, Nela

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:186492>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

PROGRAMIRANA STANI NA SMRT U PRAŽIVOTINJA

PROGRAMMED CELL DEATH IN PROTOZOA

SEMINARSKI RAD

Nela Jantol
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Renata Matoni kin Kep ija

Zagreb,2011.

Sadržaj

1. Uvod.....	3
1.1. Implikacije.....	3
1.2. Povijest.....	4
1.3. Signali.....	4
2. Tri glavna puta programirane stani ne smrti.....	5
2.1. Apoptoza	5
2.1.1. Apoptoza i gusto a stanica kod afri kih tripanosoma.....	5
2.1.2. Imunološko prigušivanje apoptozom parazitskih praživotinja.....	7
2.1.3. Apoptoti ka <i>Leishmania</i> :Esencijalni faktor	7
2.2. Autofagija.....	8
2.2.1. Autofagija, recikliranje organela i diferencijacija parazita	8
2.2.2. Autofagija kod diferencijacije <i>T. cruzi</i>	9
2.2.3. Autofagija i autofagi ka stani na smrt kao odgovor na stres.....	10
2.2.3.1. Prilagodbe kod stresa u <i>T. brucei sp.</i>	10
2.3. Nekroza	11
3. Programirana stani na smrt kod parazitskih praživotinja	11
3.1. Regulacija gusto e parazitskih stanica pomo u praživotinjske stani ne smrti	12
3.1.1. Gusto a plazmodija u vektoru	12
3.2. Regulacija gusto e <i>T. cruzi</i> unutar i van stanice	13
4. Zaključak.....	13
5. Summary	14
6. Literatura	15

1. Uvod

Pitanje kako parazitske praživotinje umiru je bilo zanemareno dugo vremena. Smatralo se da se smrt u jednostani nih organizama dešava na nekoordinirani način te su procesi uključeni u odluke život-smrt bili ignorirani. Za takvo gledište ponajprije je odgovorna pretpostavka da genetski determinirani putevi smrti u jednostani nim organizmima nisu bili evolucijski povoljni. Međutim, s pojavom detekcije markera stani ne smrti, karakterističnih za metazojsku programiranu stani nu smrt, u različitim slobodnoživim i parazitskim praživotinjama, njihovi putevi smrti su postali intenzivno istraživana tema (Lüder i sur., 2010).

Programirana stani na smrt je genski reguliran proces stani nog samoubojstva koji je važan u razvoju, homeostazi i integritetu kod višestani nih organizama. Suprotno tome, greška u mehanizmima koji reguliraju stani nu smrt je bitna za patogenezu mnogih bolesti. Veliki pomak je napravljen u otkrivanju molekularnih mehanizama programirane stani ne smrti, ali s tim se javila i nova razina kompleksnosti, sa važnim terapijskim implikacijama (Ameisen, 2002).

Različiti oblici regulirano programiranih stani nih smrti dosada su opisani u nekoliko vrsta jednostani nih eukariota. Oni uključuju predstavnike skupine Kinetoplastidea *Trypanosoma cruzi* (Ameisen i sur., 1995), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Welburn i sur., 1996), *Trypanosoma brucei brucei* (Ridgley i sur., 1999) i *Leishmania major* (Arnoult i sur., 2002), *Leishmania amazonensis* (Moreira i sur., 1996), *Leishmania donovani* (Das, Mukherjee i Shaha, 2001), sluzava plijesan *Dictyostlium discoideum* (Cornillon i sur., 1994), trepetljikaša *Tetrahymena thermophila* (Christensen i sur., 1995), dinoflagelata *Peridinium gatunense* (Vardi i sur., 1999)), i truskovce roda *Plasmodium* (Meslin i sur., 2007).

1.1. Implikacije

Evolucijske prednosti u ovakvom načinu samouništenja bi mogle uključivati stalnu selekciju preživljenja najjačih (engl. *survival of the fittest*) stanica u koloniji jednostani nih stanica, optimalnu adaptaciju broja stanica u okolišu i preciznu kontrolu ciklusa stanice i diferencijaciju stanice kao odgovor na promjene u okolišu (Ameisen, 2002). To nas vodi do zaključka da se kontrola stanica oslanja na intercelularnu signalizaciju na razini kolonije.

Saznanja o programu stani nog samoubojstva, nedavno istraženog u nekoliko jednostani nih organizama, podupiru naizgled paradoksalan pogled da bi genske mutacije, koje bi omogu ile stanicama da izbjegnu okolišnu regulaciju mehanizma svog samouništenja, mogle biti odba ene na razini kolonija ovih jednostani nih organizama (Ameisen, 2002).

1.2. Povijest

Samouništenje stanica je u po etku smatrano kao neizgledan doga aj. Ovo mišljenje je polako zamijenjeno idejom da bi programirana stani na smrt mogla igrati glavnu ulogu u embrionalnom razvoju, ali samo u odre enim populacijama stanicama u odre eno vrijeme i na danim lokacijama (Ameisen, 2002).

U novije vrijeme je predloženo da bi programirana stani na smrt mogla biti bitna u odraslim stanicama te da bi greška u regulaciji programirane stani ne smrti mogla biti važna u patogenezi nekoliko bolesti i na kraju da je ve ina, ako i ne sve, stanice višestani nih organizama stalno programirana za samouništenje osim ako im druge stanice ne signaliziraju represiju samouništenja (Ameisen, 2002).

1.3. Signali

Fenotip stani ne smrti Kinetoplastidea, sluzave plijesni, trepetljikaša i dinoflagelata dijeli nekoliko zna ajki s apoptozom, uklju uju i DNA fragmentaciju kod sviju, osim kod *Dictyostelium discoideum*. U ovim jednostani nim organizmima, kao i u stanicama višestani nih organizama, programirana stani na smrt je regulirana ekstracelularnim signalima. Primjerice u predstavnika Kinetoplastidea *Trypanosoma cruzi* i u trepetljikaša *Tetrahymena thermophila* zapaženo je da preživljavanje stanice ovisi o signalima koje šalju druge stanice u populaciji. Ti signali su potrebni da bi potisnuli induciranje glavnog puta programirane stani ne smrti.

Dakle, kao i u stanicama višestani nih životinja, jedan oblik socijalne kontrole preživljavanja stanice djeluje na razini ovih jednostani nih organizama (Ameisen, 2002).

Kada *Trypanosoma cruzi* u e u stresan okoliš koji omogu uje ulazak u drugog doma ina, programirana stani na smrt postaje glavna posljedica neuspjeha u preobražaju epimastigotnog stanja parazita u G0/G1 tripomastigotno stanje, oblik koji migrira izme u dva zaražena doma ina (kukaca i kralježnjaka, uklju uju i i ljude) i koji je prilago en opstanku u oba doma ina (Ameisen i sur., 1995).

U svojstama Kinetoplastidea *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* i *Leishmania amazonensis*, koji uzrokuju teške bolesti kod ovjeka, programirana stani na smrt je također regulirana signalima njihovih višestanih domaćina, kao što su temperatura, lektini, kao i komponente domaćinovog imunološkog sustava (Maslov i Simpson, 1995).

2. Tri glavna puta programirane stani na smrti

Tri glavna puta stani na smrti, apoptoza, autofagija i nekroza, se danas najviše istražuju (Kroemer i sur., 2009) i nedavno je predloženo da se usvoje kriteriji ove klasifikacije i za programiranu stani na smrt u praživotinja (van Zandbergen i sur., 2010).

2.1. Apoptoza

Znakovi apoptoze su uočeni u različitim jednostaničnim parazitima, uključujući i Kinetoplastidea, truskovce, *Trichomonas vaginalis* i *Giardia lamblia* (Bruchhaus i sur., 2007). Markeri apoptoze u praživotinjskim parazitima uključuju smanjivanje stanice, kondenzaciju kromatina, fragmentaciju DNA i jezgre, gubitak potencijala mitohondrijske membrane i translokaciju fosfatidilserina (PS) od unutarnje do vanjske strane plazmatske membrane (Jimenez-Ruiz i sur., 2010).

2.1.1. Apoptoza i gustoća stanica kod afričkih tripanosoma

Trypanosoma brucei, uzročnik bolesti spavanja kod ovjeka i bolesti nagana kod stoke, može proći apoptozu u krvotoku sisavaca (Figarella i sur., 2005) i u crijevu ce-ce muhe (Welburn i Maudlin, 1997). U krvotoku sisavaca, populacija *T. brucei* se povećava i smanjuje periodično i to je dijelom zbog efektivnog posredovanja antitijela u imunološkom odgovoru domaćina i antigenskoj varijaciji velikih površinskih glikoproteina parazita. Međutim, gustoća stanica *T. brucei* se također regulira u nekontaminiranim kulturama bez prisustva ijedne imunološke tvari koja potječe od domaćina. Nakon što se postigne prag ovisan o gustoći stanica, daljnje širenje populacije stanica je ograničeno diferencijacijom između replikacije izduženog (LS¹) oblika i kratkog oblika koji se ne dijeli (SS²) (Vassella, i sur 1997). Nadalje, gustoća parazita se također smanjuje i to je praćeno pojavom morfoloških i biokemijskih markera za apoptozu (Figarella i sur., 2005). Na isti način kultivacija *T. brucei rhodesiense* pod

¹ LS-long slender

² SS-short stumpy

utjecajem velike gustoće se nalazi u uzajamnoj vezi s pojavom parazita koji pokazuju apoptotički fenotip.

Figarella et al. (2005) su pokazali da se stani na smrt kod vrsta roda *Trypanosoma* može izazvati *in vitro* s prostaglandinom (PG) D2 i metabolitima iz J serije. Jedinke roda *Trypanosoma* proizvode PG-e koji uključuju PGD2 i lučuju ih u okoliš. Također, razina PG se povećava u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini tijekom infekcija ljudi s *T. brucei* iako ostaje nepoznato da li PG potječe od domaćina ili parazita.

Nadalje, imunološka obrana protiv *T. brucei* je ograničena CNS³-om i prema tome nije dovoljno učinkovita da ograniči broj parazita koji bi izazivali održivu infekciju (Pentreath i sur., 1990). Ipak, moglo bi biti da apoptoza izazvana PG-om također pomaže u restrikciji broja parazita u perifernoj krvi.

Nakon unosa SS oblika preko obroka krvi i diferencijacije u prociklički stadij, količina parazita u srednjem crijevu ce-ce muhe ostaje za u većini slučajeva konstantna bez obzira na njihovu mogućnost dijeljenja. Ova regulacija gustoće bi mogla biti postignuta apoptotičkim staničnom smrću kao što je uočeno nakon tretmana procikličke *T. brucei rhodesiense in vitro* s lektinom konkanavalinom A (Welburn i sur., 1999).

Većina *Trypanosoma* u inficiranom obroku krvi će umrijeti u srednjem crijevu muhe zbog procesa koji pokazuje odlike apoptoze. Korelacija između gustoće parazita i razine apoptoze još nije ustanovljena. Postavlja se važno pitanje je li apoptoza u procikličkih *Trypanosoma* proizišla kao mehanizam kojim se parazit sam regulira ili kao put smrti koji je induciran imunološkim inhibitorima u kukcima (vektorima). Posljednje razmatranje podupire saznanja da se apoptoza kod parazita regulira lektinima i moguće antimikrobnim peptidima prisutnima u srednjem crijevu ce-ce muhe (Duszenko i sur., 2006). Nadalje, antioksidansi u obroku krvi štite procikličke jedinice roda *Trypanosoma* od apoptoze i pokazuju da bi reaktivni kisik (ROS⁴) mogao imati bitnu ulogu (MacLeod i sur., 2007). Međutim, nije razmotreno da li bi takva inhibicija stanične smrti dovela do hiperparazitizma i smrti vektora. Ovi podaci zajedno pokazuju da bi apoptoza procikličkih parazita u srednjem crijevu vektora mogla doprinijeti gustoći parazita, ali nije poznato je li ovakva programirana stanična smrt oblik samoograničavanja da bi se olakšao prijenos na drugog domaćina ili je to oblik smrti nakon imunološkog napada.

³ CNS- Centralni nervni sustav

⁴ ROS- reactive oxygen species

2.1.2. Imunološko prigušivanje apoptozom parazitskih praživotinja

Za imunološko prigušivanje apoptoti kih parazitskih praživotinja potrebno je uzeti u obzir koji na in života pojedini parazit preferira. Obligatni intracelularni paraziti preferiraju fagocite (npr. *Leishmania*) ili intracelularnost u širokom rasponu doma inovih stanica uklju uju i fagociti ke i nefagociti ke stanice (npr. *Toxoplasma*) ili ograni eni raspon nefagociti kih doma inskih stanica (kod roda *Plasmodium* i *T. cruzi*), kao i ekstracelularnost u slu aju *T. brucei*.

Uzimaju i obligatni intracelularni parazit koji preferira fagocite, imunološko prigušivanje je proces koji se odvija u tri koraka (van Zandbergen i sur., 2007). Ovaj proces se najbolje opisuje kao tiho uzimanje apoptoti kih stanica sisavaca u fagocite. Prvo, apoptoti ke stanice otpuštaju 'na i me' signale da bi okupili fagocite na mjesto apoptoti ke smrti (Lauber i sur., 2003). Drugo, fagociti prepoznaju prisutnost 'pojedi me' signala na membrani apoptoti kih stanica (Fadok i sur., 1998). Posljednji korak je aktivna supresija upale i imunološkog odgovora i može se nazvati 'zaboravi me' signalom. Pošto apoptoti ke stanice ne predstavljaju opasnost, njihov unos ne rezultira aktivacijom antimikrobnih funkcija fagocita (Savill i sur., 1989).

2.1.3. Apoptoti ka *Leishmania*: Esencijalni faktor

Pokazati emo na primjeru roda *Leishmania* kao prototipnog obligatnog intracelularnog parazita koji živi unutar fagocita da ona koristi ovaj proces od tri koraka u barem dvije faze kako bi uspostavila intracelularno preživljavanje (van Zandbergen i sur., 2007). Prvo *Leishmania major* promastigot proizvodi 'na i me' signal (LCF⁵) i vrbuje svoju prvu doma insku stanicu, npr. neutrofil. Nadalje, pokazano je da uspješna invazija neutrofila ovisi o ekspresiji 'pojedi me' signala na sub-populaciji apoptoti kih parazita. Nakon iscrpljivanja apoptoti kih parazita iz zarazne populacije, *L. major* ne preživljava unutar fagocita *in vitro* i gube svoju zaraznost *in vivo*. Tako er je pokazano da preživljavanje promastigota ovisi o produkciji 'zaboravi me' signala.

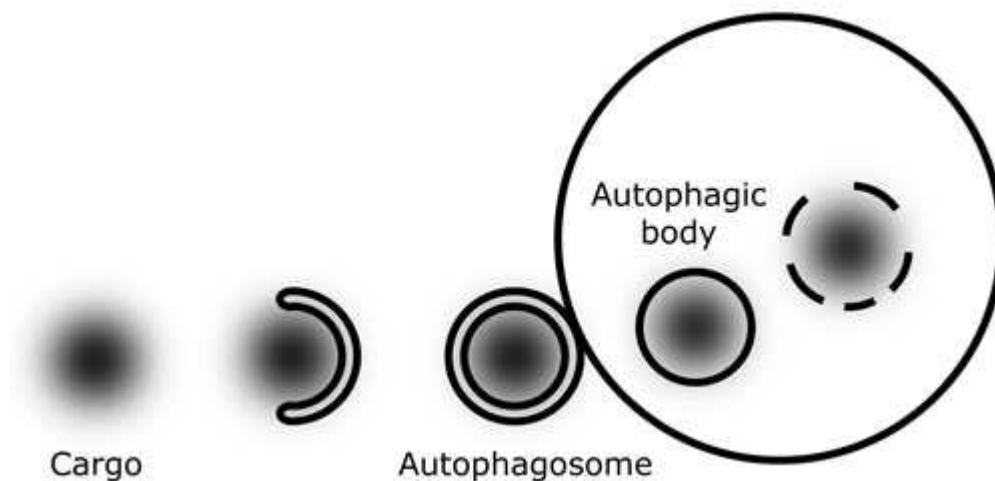
U drugoj fazi infekcije, promastigoti roda *Leishmania* inficiraju makrofage i diferenciraju se u infektivni amastigotni oblik. Pošto su prve u neutrofilima, ove stanice inficirane promastigotama po inju proizvoditi 'na i me' signale koji specifi no okupljaju makrofage. U isto vrijeme inficirani neutrofili postepeno postaju apoptoti ni. *L. major* sad može koristiti neutrofil kao 'trojanskog konja' za uspješan tihi ulazak u makrofag (van Zandbergen i sur.,

⁵ LCF- *Leishmania* chemotactic factor

2004). *In vivo* istraživanja su ukazala na drugi mehanizam invazije, nedavno nazvan strategija 'trojanskog zeca' gdje paraziti pobjegnu iz umiru ih neutrofila da bi inficirali makrofage (Ritter i sur., 2009).

2.2. Autofagija

Autofagija je evolucijski o uvan proces za kojeg se pretpostavlja da je prisutan kod svih parazitskih praživotinja. Smatra se da prvenstveno služi kao mehanizam za preživljavanje koji osigurava stanici energiju tijekom stresnih razdoblja uklju uju i gladovanje, preokret organela, ili pregradnju stanice tijekom diferencijacije. Me utim, ako se ti uvjeti oduže i prevrše kapacitet stanice, oni mogu pokrenuti smrt stanice autofagijom. Smrt stanice autofagijom opisana je kod nekoliko parazitskih praživotinja. Najvažniji korak u autofagiji je formacija nove membrane koja okružuje stani ni materijal koji e se probaviti; ova membrana se kona no formira u vezikulu s dvostrukom membranom i zovemo je autofagosom (Slika 1.) (Kiel, 2010).



Slika 1. Autofagosom (preuzeto s <http://www.umcutrecht.nl/subsite/cmc-utrecht/People/Staff/Fulvio-Reggiori.htm>)

2.2.1. Autofagija, recikliranje organela i diferencijacija parazita

Parazitske praživotinje posjeduju složene životne cikluse i esto se prenose izme u potpuno razli itih vrsta doma ina. Razli iti okoliši razli itih doma ina, ali tako er i razli iti životni ciklusi istog parazita, zahtijevaju proširene adaptacije i diferencijacije parazita. Tijekom zadnjih godina, autofagija kod praživotinja se pojavila kao presudan mehanizam tijekom tih procesa (Tablica 1). Još je nejasno da li se autofagija tijekom diferencijacije može razviti u autofagi ku stani nu smrt.

Tablica 1: Putevi programirane stani ne smrti i njihove mogu e uloge u biologiji parazita i parazit-doma in interakcijama

Funkcija	Parazit/Stadij	Doma in	Na in smrti/glavni put
Kontrola gusto e	<i>T. brucei</i> /short stumpy	sisavac	apoptoza
	<i>T. brucei</i> /procyclic	tsetse muha	apoptoza
	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i> /ookinetes	vektor	apoptoza
	<i>T. cruzi</i> /epimastigotes	vektor	apoptoza
	<i>T. cruzi</i> /amastigotes	sisavac	apoptoza
Imunološko prigušivanje	<i>L. major</i> /promastigotes	sisavac	apoptoza
	<i>L. amazonensis</i> /amastigotes	sisavac	apoptoza
	<i>T. cruzi</i> /trypomastigotes	vektor, sisavac	apoptoza
	<i>T. brucei</i> /short stumpy	sisavac	apoptoza
	<i>Toxoplasma</i> /tachyzoites	sisavac	apoptoza
Diferencijacija	<i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i>	sand fly, sisavac	autofagija
	<i>T. brucei</i>	sisavac, sand fly	autofagija
	<i>T. cruzi</i> /epimastigotes	vektor	autofagija
Stresni odgovor			
gladovanje	<i>T. brucei</i>	tsetse muha	autofagija
ROS, DHA, neuropeptidi	<i>T. brucei</i> /blood stream form	sisavac	autofagija/stani na smrt autofagijom
kemoterapijska sredstva	<i>T. cruzi</i> /epimastigotes, trypomastigotes	vektor, sisavac	autofagija/stani na smrt
gladovanje	<i>T. cruzi</i>	vektor	autofagija
toplinski šok	<i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i>	sisavac	apoptoza

2.2.2. Autofagija kod diferencijacije *T. cruzi*

Najvažniji okida i diferencijacije *T. cruzi* (Slika 2.) su velika gusto a stanica i prehrambeni stres (Figueiredo i sur., 2000). Gusto a stanica i prehrambeni stres su isprepleteni kada parazit dosegne stacionarnu fazu rasta u nekomtaminiranim kulturama. Pod tim uvjetima, epimastigoti prolaze apoptozu, iako bi autofagija mogla pridonositi pove anju mortaliteta tijekom produžene kultivacije (Jimenez i sur., 2008). Me utim, pod uvjetima manjka seruma mogu se promatrati citoplazmatske vakuole koncentrirane s ubikvitin sli nim ATG8.1, karakteristi ne odlike autofagije. Kod *T. cruzi*, gladovanje epimastigota se doga a normalno u crijevu vektora (kukca), koji može prolaziti kroz duga razdoblja bez hrane (i do 12 mjeseci) (Kollien i Schaub, 2000). Prema tome, autofagija bi mogla predstavljati bitni mehanizam preživljavanja *T. cruzi* u probavilu vektora.

Morfološke i strukturne studije su pokazale da je glavni organel koji se mijenja tijekom metaciklogeneze rezervosom, veliki unutarnji odjeljak u epimastigotu gdje se akumuliraju proteini i lipidi (Soares i sur., 1989). Sadržaj rezervosoma se troši prilikom diferencijacije u metacikli ke stadije, zatim se smanjuje i kona no nestaje. Serin karboksipeptidaza, marker rezervosoma i ATG8.1, dijelom se lokalizira u rezervosomu tijekom diferencijacije, vjerojatno

zbog dostave sadržaja autofagosoma reservosomima/lizosomima (Alvarez i sur., 2008). Ovi podaci pokazuju da se proteini akumulirani u reservosomu koriste od strane epimastigotnih oblika kao izvor energije tijekom diferencijacije i da bi autofagija mogla biti presudna za njihov nestanak tijekom kralježnja kih stadija.



Slika 2. *Trypanosoma cruzi* (preuzeto sa <http://papabolivia.blogspot.com/p/health-and-medicine.html>)

2.2.3. Autofagija i autofagi ka stani na smrt kao odgovor na stres

Prilikom prijelaza izme u razli itih doma ina ili tijekom promjena u životnom ciklusu, paraziti ne samo da prolaze kroz procese diferencijacije, nego se suo avaju i sa stani nim stresom, npr. promjenama temperature, gladovanjem, ili anti-parazitskim mehanizmima. Autofagija je prepoznata tijekom okolišnih prilagodbi kod nekoliko praživotinja i može omogu iti opstanak parazita u odre enim stresnim uvjetima. Kao i kod viših eukariota, kod parazitskih praživotinja tako er postoji dvojba izme u opstanak-promoviraju e i smrt-promoviraju e autofagije. Dodatno, autofagi ka stani na smrt kod praživotinja je opisana kod stresnih uvjeta iako njena uloga u biologiji parazita ostaje nepoznata (Lüder i sur., 2010).

2.2.3.1. Prilagodbe kod stresa u *T. brucei*

Gladovanje je fiziološko stanje s kojim se parazitski oblici moraju suo iti unutar crijeva vektora. Gladovanje *T. brucei* *in vitro*, pri uzgoju parazita na mediju s ograni enim nutrijentima, makrolida izolirana iz *Streptomyces hygroscopicus* inducira formaciju autofagi kih organela (Denninger i sur., 2008).

Neuropeptidi su nedavno naeni u sisavcima nakon infekcije s *T. brucei* (Slika 3). Ovi peptidi ciljaju parazitski glikosom i induciraju autofagiju u stani na smrt kod oblika koji su u krvi, ali ne i kod procikli kih oblika. Neuropeptid-posredovanoj stani noj smrti kod *T. brucei* prethodi neuspjeh energetskog metabolizma i prema tome se može povezati sa stresom. (Delgado i sur., 2009).



Slika 3. *Trypanosoma brucei* (preuzeto sa <http://pgcluster.lshtm.ac.uk/genomes.htm>)

2.3. Nekroza

Za razliku od apoptoze, nekroza obično uključuje oticanje stanice i organela, gubitak integriteta plazmatske membrane i samo umjerenu kondenzaciju kromatina. Smrt nekrozom je opisana kod roda *Trypanosoma*. Smatra se da postoji i kod roda *Plasmodium* u krvnim stadijima (Porter i sur., 2008). Važno je napomenuti da se nekroza može pojaviti kao regulirani i fiziološki na in i da se danas konačno ne smatra nekontroliranim oblikom smrti (Festjens i sur., 2006).

3. Programirana stani na smrt kod parazitskih praživotinja

Programirana stani na smrt kod parazitskih praživotinja se istaknulo kao fascinantno područje biologije parazita. To se ne odnosi samo na osnovne mehanizme i njihove evolucijske implikacije, nego i na me udjelovanje između domaćina (sisavca) i vektora (lankonošci). Tijekom posljednjih godina su se otkrile opće funkcije apoptoze i autofagije kod praživotinja i za vrijeme parazitske infekcije. U ovom radu je razmatrano kako bi putevi stani ne smrti kod rodova *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* i *Toxoplasma* mogli

utjecati na regulaciju gustoće stanica u vektorima i domaćinima sisavcima, na diferencijaciju parazita, na odgovor stresu i na modulaciju domaćinova imunološkog sustava.

Dani primjeri ukazuju na važne uloge programirane stanične smrti u biologiji parazita. Postojanje puteva programirane stanične smrti u ovim organizmima i identifikacija bi mogle dati temelj za razvitak novih anti-parazitskih lijekova koji iskorištavaju ove puteve (Lüder i sur., 2010).

3.1. Regulacija gustoće parazitskih stanica pomoću u praživotinjske stanične smrti

Da bi se uspostavile održive infekcije i prijenos na nove domaćine, veština parazita mora izbjegavati hiper-parazitizam koji bi doveo do smrti domaćina i parazita. Broj parazita se može kontrolirati proliferacijom stanica, progresijom staničnog ciklusa ili staničnom smrću. Programirana stanična smrt u pojedinim parazitskim praživotinjama može determinirati gustoću stanica pod određenim uvjetima i pretpostavlja se da to bitno utječe na parazit-domaćin interakcije uspostavljaju i održivu parazit-domaćin ravnotežu (Tablica 1). (Lüder i sur., 2010).

3.1.1. Gustoća plazmodija u vektoru

Ookinete kod malarije glodavaca uzročnika *Plasmodium berghei* mogu pokazivati nekoliko odlika apoptotičnih stanica i *in vivo* u srednjem crijevu ženke roda *Anopheles*, kao i *in vitro* (Al-Olayan i sur., 2002). Znakovi apoptoze su nedavno otkriveni kod *P. yoelli* ookineta *in vitro*, i također kod *P. falciparum*. Ookinete plazmodiuma se diferenciraju od zigote nakon uzimanja makro- i mikrogametocita u obroku krvi od inficiranog domaćina i oplodnje. Zatim se razvijaju u epitelu srednjeg crijeva u oociste koje sadrže tisuće sporozoita. Preživljavanje ovih ookineta određuje količinu parazita u vektoru malarije. Posebni inhibitori kaspaze inhibiraju pojavu apoptoze oblika *Plasmodium* u crijevu i bitno povećavaju broj oocista. Kaspaze uzimaju centralnu ulogu u apoptozi viših eukariota ali ne postoje homolozi kod praživotinja (Nedelcu, 2009).

Kao i kod drugih parazitskih praživotinja, *Plasmodium* lu i mnoge proteaze uključuju i i cistein proteaze koji mogu pomoći u razaranju parazitske stanice (Klemba i Goldberg, 2002).

Bez obzira na molekule koje sudjeluju, gore navedeni rezultati upućuju da apoptoza kod *Plasmodium* zigota i/ili ookineta uistinu regulira jakost infekcije unutar vektora roda *Anopheles* iako postoje i alternativna objašnjenja, kao npr. indirektan efekt preko modulacije

apoptoze kod stanica domaćina. Kao i kod prociklikih nametnika roda *Trypanosoma*, treba se tek razjasniti je li apoptoza roda *Plasmodium* u crijevnom stadiju proizišla kao oblik samorestrikcije i je li potrebna da bi se izbjegla smrt vektora prije prijenosa parazita na novog domaćina (Lüder i sur., 2010).

3.2. Regulacija gustoće *T. cruzi* unutar i van stanice

Markeri apoptoze su opsežno nađeni kod *T. cruzi*, uzročnika Chagasove bolesti, *in vitro* i *in vivo* (de Souza i sur., 2003). Pojava apoptotičke stanice ne smrti se može spriječiti resuspenzijom eksponencijalnog rasta parazita kod smanjenih gustoća i to također zadržava početak stacionarne faze rasta (Ameise i sur., 1995).

4. Zaključak

Tijekom zadnjih 10-15 godina, znatan pomak je napravljen u razumijevanju kako pojedine programirane stanice ne smrti u parazitskim praživotinjama mogu utjecati na njihovu biologiju i njihove interakcije s domaćinima i vektorima. Pojava markera koji pokazuju apoptozu praživotinja ili autofagiju tijekom pojedinih procesa kao i funkcionalni dokazi su poduprli mišljenje da ove programirane stanice ne smrti igraju bitnu ulogu u nađinju života parazitskih praživotinja. U suprotnosti, još nam je uvijek nepoznat u kakav inak parazitske nekroze za parazit-domaćin interakcije i da li se one mogu pojaviti u reguliranom nađinju kako je opisano kod višestaničnih organizama.

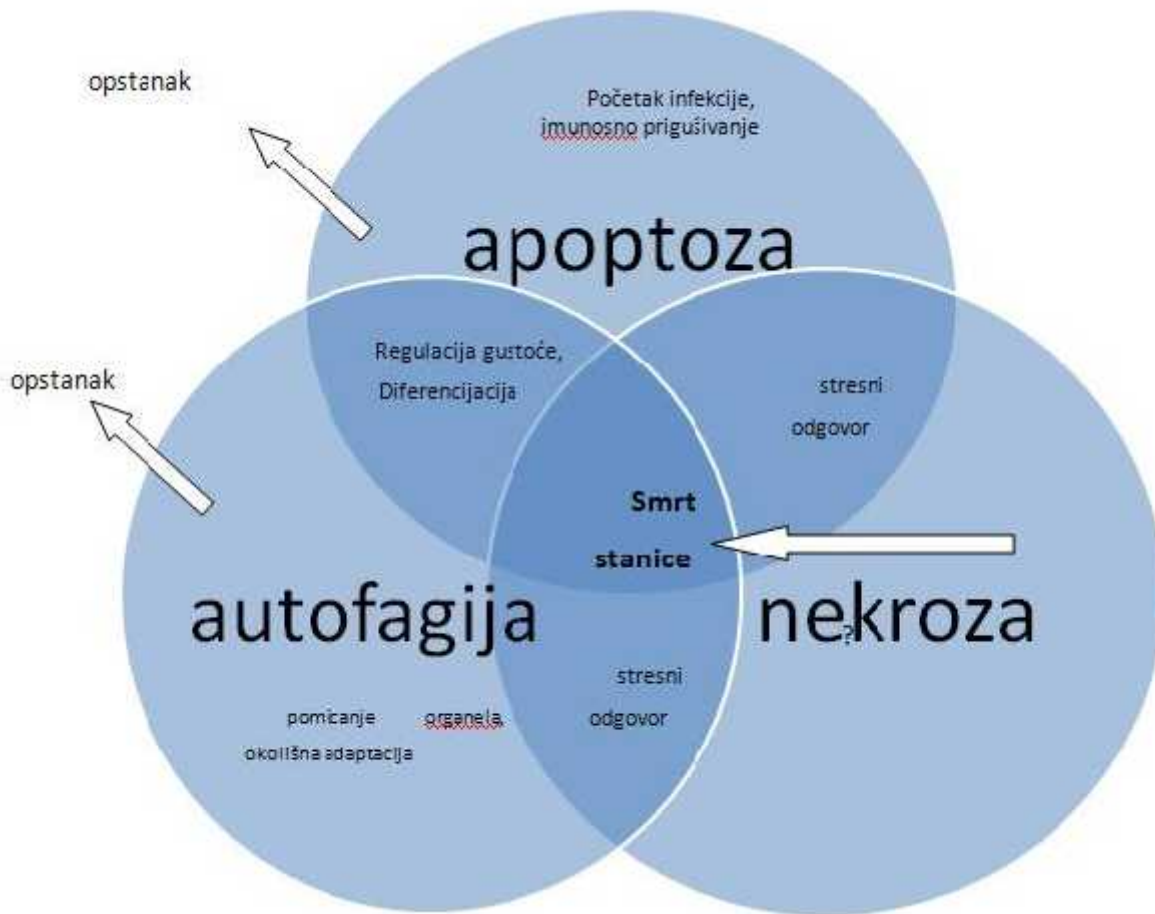
Postoje dokazi da gustoća pojedinih parazita korelira s pojavom markera programirane stanice ne smrti. Mora se naglasiti, međutim, da definitivni dokaz koncepta regulacije gustoće parazita još uvijek nedostaje, posebno u uvjetima *in vivo*.

Druga ova tema koja se pojavljuje iz navedenih primjera je da je autofagija uključena u diferencijaciju parazitskih praživotinja. Dodatno, autofagija i autofagijske stanice na smrt su uobičajeni odgovori kada su paraziti izloženi okolišnom stresu.

Autofagija u parazitskim praživotinjama, kao i u životinjama, primarno promiče opstanak, ali se može pretvoriti u programirani oblik smrti ako uvjeti okoliša premaše kapacitet stanice.

Iako smo daleko od razumijevanja ovih procesa u potpunosti, apoptoza i autofagija su bitne kod parazitskih praživotinja i interakcija s njihovim domaćinima i vektorima. Detaljno

znanje ovih mehanizama bi omogućilo efikasnu borbu protiv parazitskih praživotinja upotrebljavanjem njihovih vlastitih puteva smrti stanice.



Slika 4. Mogući i utjecaj puteva praživotinjske programirane stanice smrti u biologiji parazita i život ili smrt odlukama. (Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/116/figure/F1>)

5. Summary

Over the past 10-15 years, considerable progress has been made in understanding how some of programmed cell death in parasitic protozoa may influence their biology and their interactions with hosts and vectors. The appearance of markers that show apoptosis or autophagy during certain processes and functional evidence support the view that this programmed cell death plays an important role in the lifestyle of parasitic protozoans. In contrast, the effect of parasitic necrosis of the parasite-host interactions and whether it can occur in a regulated manner as described in metazoa is still unknown.

Now there is good evidence that the density of individual trypanosomatids and apicomplexan parasites correlates with the appearance of markers of programmed cell death. It should be noted, however, that definitive proof of the concept of regulation of parasite density by parasite apoptosis is still lacking, especially in vivo.

Another common theme that appears from these examples is that autophagy is involved in differentiation of parasitic protozoans. In addition, autophagy and autophagic cell death are common responses when the parasites encounter environmental stress.

It has become clear that autophagy in parasitic protozoa, as in metazoan, primarily promotes survival, but can be converted to a form of programmed cell death if environmental conditions exceed the capacity of cells.

Although we are far from understanding these processes fully, apoptosis and autophagy are essential for the parasitic protozoa and interactions with their hosts and vectors. A detailed knowledge of the underlying molecular mechanism might open the possibility to combat protozoan parasites efficiently by promoting their own death pathways..

6.Literatura

Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H: Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 2002, 32:1133-1143

Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H: Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 2002, 32:1133-1143

Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B: Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283:3454-3464.

Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi A: Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 1995, 2:285-300.

Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, LoyensM, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi MA: Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary

origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.* 1995, 2:285 - 300

Ameisen, J. (2002).: On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Nature* 2002, 9:367-393.

Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J and Ameisen JC : On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.* 2002, 9: 65 - 81

Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT: Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 2007, 23:376-383.

Christensen ST, Wheatley DN, Rasmussen MI and Rasmussen L :Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death Differ.* 1995, 2: 301- 308

Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD and Golstein P:Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.*1994, 107: 2691 - 2704

Das M, Mukherjee SB and Shaha C :Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell. Sci.*2001, 114:2461 - 2469

de Souza EM, Araujo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, Soeiro MN: Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res* 2003, 314:223-235.

Delgado M, Anderson P, Garcia-Salcedo JA, Caro M, Gonzalez-Rey E: Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death Differ* 2009, 16:406-416

Denninger V, Koopmann R, Muhammad K, Barth T, Bassarak B, Schonfeld C, Kilunga BK, Duszenko M: Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods Enzymol* 2008, 451:373-408.

Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC: Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* 2006, 22:536-542

Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM: The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998, 5:551-562.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1757:1371-1387

Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, Madeo F, Wesselborg S, Duszenko M: Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ* 2005, 12:335-346

Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ: Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of parasitology* 2000, 86:1213-1218.

GK Lüder, C., Campos-Salinas, J., Gonzalez-Rey, E., & van Zandbergen, G. (n.d.). Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Preuzeto* 10. 6 2011 iz *Parasites and vectors*: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/116>

Jimenez V, Paredes R, Sosa MA, Galanti N: Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *Journal of cellular biochemistry* 2008, 105:688-698

Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Luder CG, Fasel N, Hurd H: Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010, 3:104.

Kiel JA: Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010, 365:819-830.

Klemba M, Goldberg DE: Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 2002, 71:275-305.

Kollien AH, Schaub GA: The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today (Personal ed)* 2000, 16:381-387.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Núñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell Death 2009: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009, 16:3-11

Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003, 113:717-730.

MacLeod ET, Maudlin I, Darby AC, Welburn SC: Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* 2007, 134:827-831.

Maslov DA and Simpson L : Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol. Today* 1995,11: 30 - 32

Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, Picot S: Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* 2007, 195:1852-1859

MoreiraMEC, DelPortillo HA, Milder RV, Balanco JMand Barcinski MA :Heat shok induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania amazonensis*. *J. Cell. Physiol.* 1996, 167: 305 - 313

Nedelcu AM: Comparative genomics of phylogenetically diverse unicellular eukaryotes provide new insights into the genetic basis for the evolution of the programmed cell death machinery. *J Mol Evol* 2009, 68:256-268.

Pentreath VW, Rees K, Owolabi OA, Philip KA, Doua F: The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990, 84:795-799

Porter H, Gamette MJ, Cortes-Hernandez DG, Jensen JB: Asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* exhibit signs of secondary necrosis, but not classical apoptosis after exposure to febrile temperature (40 C). *J Parasitol* 2008, 94:473-480

Ridgley EL, Xiong ZH and Ruben L : Reactive oxygen species activate a Ca⁺⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.* 1999, 340 (Pt 1): 33 - 40

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G: Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 2009, 25:505-510

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989, 83:865-875.

Soares MJ, Souto-Padron T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W: A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research* 1989, 75:522-527.

Tan, K. S., & Nasirudeen, A. (2005).: Protozoan programmed cell death-insights from *Bblastocystis deathstyles*. *TRENDS in Parasitology* 2005 , 21:547-549.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T: Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004, 173:6521-6525.

van Zandbergen G, Luder CG, Heussler V, Duszenko M: Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? *Trends Parasitol* 2010, 26:477-483

van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T: Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 2007, 40:349-352.

Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A and Levine A : Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Curr. Biol.* 1999, 9: 1061 - 1064

Vassella E, Reuner B, Yutzy B, Boshart M: Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* 1997, 110(Pt 21):2661-2671.

Welburn SC, Dale C, Ellis D, Beecroft R and Pearson TW : Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro. *Cell Death Differ.*, 1996 3: 229 ±236

Welburn SC, Lillico S, Murphy NB: Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense*--identification of differentially expressed genes during con A induced death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999, 94:229-234.

Welburn SC, Maudlin I: Control of *Trypanosoma brucei brucei* infections in tsetse, *Glossina morsitans*. *Med Vet Entomol* 1997, 11:286-289

Web izvori

<http://pgcluster.lshtm.ac.uk/genomes.htm> (pristupljeno 13.7.2011.)

<http://papabolivia.blogspot.com/p/health-and-medicine.html> (pristupljeno 13.7.2011.)

<http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/116/figure/F1> (pristupljeno: 11.07.2011.)

<http://www.umcutrecht.nl/subsite/cmc-utrecht/People/Staff/Fulvio-Reggiori.htm>

(pristupljeno 13.7.2011.)