

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: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

PROGRAMIRANA STANIČNA SMRT U PRAŽIVOTINJA

PROGRAMMED CELL DEATH IN PROTOZOA

SEMINARSKI RAD

Nela Jantol
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija

Zagreb, 2011.

Sadržaj

1. Uvod	3
1.1. Implikacije	3
1.2. Povijest	4
1.3. Signali	4
2. Tri glavna puta programirane stanične smrti	5
2.1. Apoptoza	5
2.1.1. Apoptoza i gustoća stanica kod afričkih tripanosoma	5
2.1.2. Imunološko prigušivanje apoptozom parazitskih praživotinja	7
2.1.3. Apoptotička <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 autofagička stanična smrt kao odgovor na stres	10
2.2.3.1. Prilagodbe kod stresa u <i>T.brucei</i> sp.	10
2.3. Nekroza	11
3. Programirana stanična smrt kod parazitskih praživotinja	11
3.1. Regulacija gustoće parazitskih stanica pomoću praživotinjske stanične smrti	12
3.1.1. Gustoća plazmodija u vektoru	12
3.2. Regulacija gustoće <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 jednostaničnih 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 jednostaničnim organizmima nisu bili evolucijski povoljni. Međutim, s pojavom detekcije markera stanične smrti, karakterističnim za metazojsku programiranu staničnu smrt, u različitim slobodnoživućim i parazitskim praživotinjama, njihovi putevi smrti su postali intenzivno istraživana tema (Lüder i sur., 2010).

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

Različiti oblici regulirano programiranih staničnih smrti dosada su opisani u nekoliko vrsta jednostaničnih 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 jednostaničnih 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 staničnog samoubojstva, nedavno istraženog u nekoliko jednostaničnih organizama, podupiru naizgled paradoksalan pogled da bi genske mutacije, koje bi omogućile stanicama da izbjegnu okolišnu regulaciju mehanizma svog samouništenja, mogle biti odbačene na razini kolonija ovih jednostaničnih organizama (Ameisen, 2002).

1.2. Povijest

Samouništenje stanica je u početku smatrano kao neizgledan događaj. Ovo mišljenje je polako zamijenjeno idejom da bi programirana stanična smrt mogla igrati glavnu ulogu u embrionalnom razvoju, ali samo u određenim populacijama stanicama u određeno vrijeme i na danim lokacijama (Ameisen, 2002).

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

1.3. Signali

Fenotip stanične smrti Kinetoplastidea, sluzave plijesni, trepetljikaša i dinoflagelata dijeli nekoliko značajki s apoptozom, uključujući DNA fragmentaciju kod sviju, osim kod *Dictyostelium discoideum*. U ovim jednostaničnim organizmima, kao i u stanicama višestaničnih organizama, programirana stanična 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 stanične smrti.

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

Kada *Trypanosoma cruzi* uđe u stresan okoliš koji omogućuje ulazak u drugog domaćina, programirana stanična smrt postaje glavna posljedica neuspjeha u preobražaju epimastigotnog stanja parazita u G0/G1 tripomastigotno stanje, oblik koji migrira između dva zaražena domaćina (kukaca i kralježnjaka, uključujući i ljude) i koji je prilagođen opstanku u oba domaćina (Ameisen i sur., 1995).

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

2. Tri glavna puta programirane stanične smrti

Tri glavna puta stanične 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 staničnu smrt u praživotinja (van Zandbergen i sur., 2010).

2.1. Apoptoza

Znakovi apoptoze su uočeni u različitim jednostaničnim parazitima, uključujući 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 čovjeka 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 čak 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 stanična 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 luče 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 začuđujuće konstantna bez obzira na njihovu mogućnost dijeljenja. Ova regulacija gustoće bi mogla biti postignuta apoptotičkom 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 čimbenicima u kukcima (vektorima). Posljednje razmatranje podupiru 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 jedinke 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 samo-ograničavanja 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 apoptotičkih parazitskih praživotinja potrebno je uzeti u obzir koji način života pojedini parazit preferira. Obligatni intracelularni paraziti preferiraju fagocite (npr. *Leishmania*) ili intracelularnost u širokom rasponu domaćinovih stanica uključujući fagocitičke i nefagocitičke stanice (npr. *Toxoplasma*) ili ograničeni raspon nefagocitičkih domaćinskih stanica (kod roda *Plasmodium* i *T. cruzi*), kao i ekstracelularnost u slučaju *T. brucei*.

Uzimajući 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 apoptotičkih stanica sisavaca u fagocite. Prvo, apoptotičke stanice otpuštaju 'nađi me' signale da bi okupili fagocite na mjesto apoptotičke smrti (Lauber i sur., 2003). Drugo, fagociti prepoznaju prisutnost 'pojedi me' signala na membrani apoptotičkih stanica (Fadok i sur., 1998). Posljednji korak je aktivna supresija upale i imunološkog odgovora i može se nazvati 'zaboravi me' signalom. Pošto apoptotičke stanice ne predstavljaju opasnost, njihov unos ne rezultira aktivacijom antimikrobnih funkcija fagocita (Savill i sur., 1989).

2.1.3. Apoptotička *Leishmania*: Esencijalni faktor

Pokazati ćemo 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 'nađi me' signal (LCF⁵) i vrbuje svoju prvu domaćinsku stanicu, npr. neutrofil. Nadalje, pokazano je da uspješna invazija neutrofila ovisi o ekspresiji 'pojedi me' signala na sub-populaciji apoptotičkih parazita. Nakon iscrpljivanja apoptotičkih parazita iz zarazne populacije, *L. major* ne preživljava unutar fagocita *in vitro* i gube svoju zaraznost *in vivo*. Također je pokazano da preživljavanje promastigota ovisi o produkciji 'zaboravi me' signala.

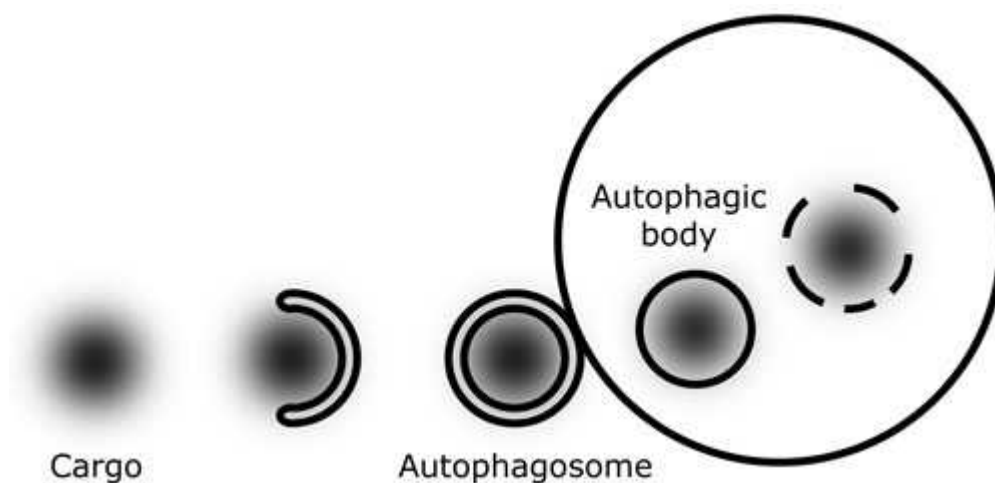
U drugoj fazi infekcije, promastigoti roda *Leishmania* inficiraju makrofage i diferenciraju se u infektivni amastigotni oblik. Pošto su prve u neutrofilima, ove stanice inficirane promastigotama počinju proizvoditi 'nađi me' signale koji specifično okupljaju makrofage. U isto vrijeme inficirani neutrofili postepeno postaju apoptotični. *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 umirućih neutrofila da bi inficirali makrofage (Ritter i sur., 2009).

2.2. Autofagija

Autofagija je evolucijski očuvan 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 uključujući gladovanje, preokret organela, ili pregradnju stanice tijekom diferencijacije. Međutim, 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 stanični materijal koji će se probaviti; ova membrana se konačno 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 često se prenose između potpuno različitih vrsta domaćina. Različiti okoliši različitih domaćina, ali također i različiti 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 autofagičku staničnu smrt.

Tablica 1: Putevi programirane stanične smrti i njihove moguće uloge u biologiji parazita i parazit-domaćin interakcijama

Funkcija	Parazit/Stadij	Domaćin	Način smrti/glavni put
Kontrola gustoće	<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/stanična smrt autofagijom
kemoterapijska sredstva	<i>T. cruzi</i> /epimastigotes, trypomastigotes	vektor, sisavac	autofagija/stanična 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 okidači diferencijacije *T. cruzi* (Slika 2.) su velika gustoća stanica i prehrambeni stres (Figueiredo i sur., 2000). Gustoća stanica i prehrambeni stres su isprepleteni kada parazit dosegne stacionarnu fazu rasta u nekontaminiranim kulturama. Pod tim uvjetima, epimastigoti prolaze apoptozu, iako bi autofagija mogla pridonositi povećanju mortaliteta tijekom produžene kultivacije (Jimenez i sur., 2008). Međutim, pod uvjetima manjka seruma mogu se promatrati citoplazmatske vakuole koncentrirane s ubikvitin sličnim ATG8.1, karakteristične odlike autofagije. Kod *T. cruzi*, gladovanje epimastigota se događa 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 metacikličke stadije, zatim se smanjuje i konačno 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 kralježnjačkih stadija.



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

2.2.3. Autofagija i autofagička stanična smrt kao odgovor na stres

Prilikom prijelaza između različitih domaćina ili tijekom promjena u životnom ciklusu, paraziti ne samo da prolaze kroz procese diferencijacije, nego se suočavaju i sa staničnim stresom, npr. promjenama temperature, gladovanjem, ili anti-parazitskim mehanizmima. Autofagija je prepoznata tijekom okolišnih prilagodbi kod nekoliko praživotinja i može omogućiti opstanak parazita u određenim stresnim uvjetima. Kao i kod viših eukariota, kod parazitskih praživotinja također postoji dvojba između opstanak-promovirajuće i smrt-promovirajuće autofagije. Dodatno, autofagička stanična 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 suočiti unutar crijeva vektora. Gladovanje *T. brucei* *in vitro*, pri uzgoju parazita na mediju s ograničenim nutrijentima, makrolida izolirana iz *Streptomyces hygroscopicus* inducira formaciju autofagičkih organela (Denninger i sur., 2008).

Neuropeptidi su nedavno nađeni u sisavcima nakon infekcije s *T. brucei* (Slika 3). Ovi peptidi ciljaju parazitski glikosom i induciraju autofagičku staničnu smrt kod oblika koji su u krvi, ali ne i kod procikličkih oblika. Neuropeptid-posredovanoj staničnoj 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 način i da se danas konačno ne smatra nekontroliranim oblikom smrti (Festjens i sur., 2006).

3. Programirana stanična smrt kod parazitskih praživotinja

Programirana stanična 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 međudjelovanje između domaćina (sisavca) i vektor a(člankonošci). 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 stanične 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 domaćinovog 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 praživotinjske stanične smrti

Da bi se uspostavile održive infekcije i prijenos na nove domaćine, većina parazita mora izbjegavati hiper-parazitizam koji bi doveo do smrti i domaćina i parazita. Broj parazita se može kontrolirati proliferacijom stanica, progresijom staničnih 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 uspostavljajući 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 plasmodiuma 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* luči mnoge proteaze uključujući 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 procikličkih 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 stanične smrti se može spriječiti resuspendacijom 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 stanične 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 stanične smrti igraju bitnu ulogu u načinu života parazitskih praživotinja. U suprotnosti, još nam je uvijek nepoznat učinak parazitske nekroze za parazit-domaćin interakcije i da li se on može pojaviti u reguliranom načinu kako je opisano kod višestaničnih organizama.

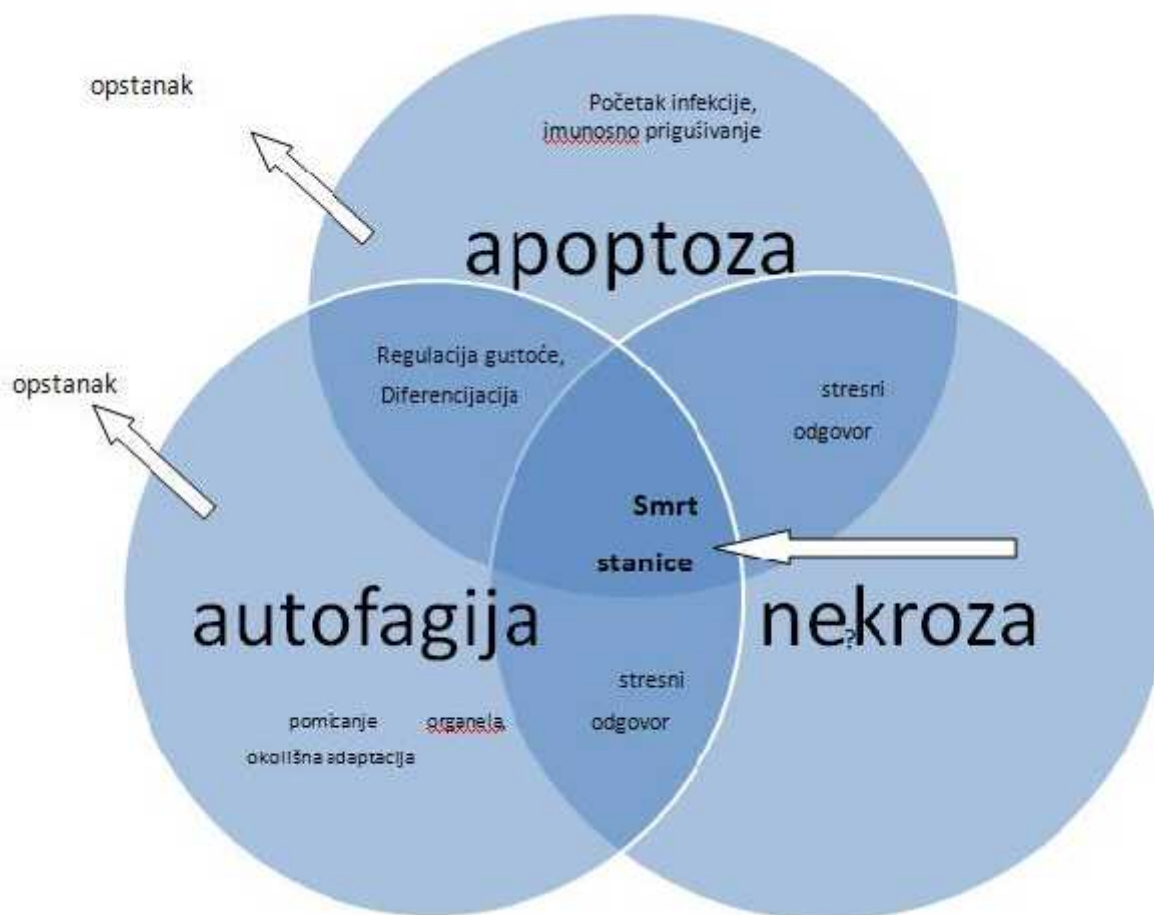
Postoje dokazi da gustoća pojedinih parazita korelira s pojavom markera programirane stanične smrti. Mora se naglasiti, međutim, da definitivan dokaz koncepta regulacije gustoće parazita još uvijek nedostaje, posebno u uvjetima *in vivo*.

Druga česta tema koja se pojavljuje iz navedenih primjera je da je autofagija uključena u diferencijaciju parazitskih praživotinja. Dodatno, autofagija i autofagijska stanična 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 utjecaj puteva praživotinjske programirane stanične 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, Ouaisi 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, Ouaisi 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, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky 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

Moreira MEC, DelPortillo HA, Milder RV, Balanco JM and Barcinski MA :Heat shock 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.

Penttreath 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 *Blastocystis* 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.)