

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

PIERWSZE BADANIA PEROKSYDOKSYN – NOWEJ RODZINY ANTYOKSYDANTÓW U PASOŻYTÓW

KRYSTYNA BOCZOŃ

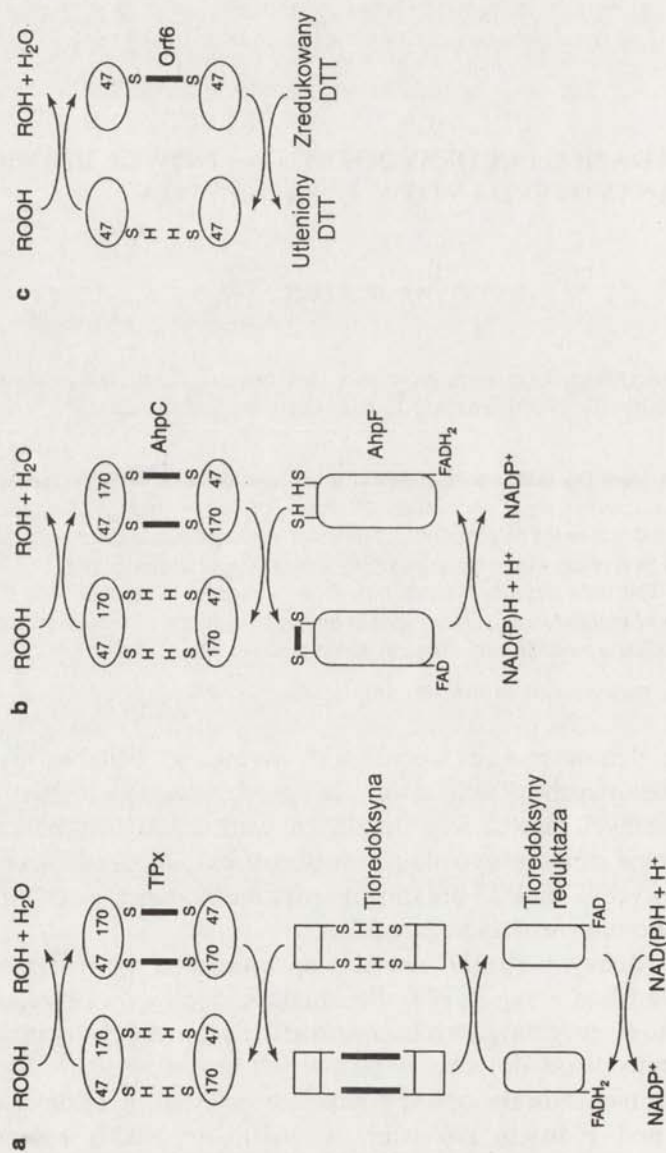
Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego,
ul. Fredry 10, 61-701 Poznań, E-mail: kboczon@am.poznan.pl

ABSTRACT. The data from the first investigations of a new antioxidants family – peroxidoxins – in parasites. The properties and mechanism of action of a new family of antioxidants-peroxidoxins have been described. The properties of parasitic peroxidoxins in some helminths and protozoans discovered as a result of genom sequencing and expressed sequence tag (EST) project have been presented. The data described until now from a number of studies with parasites indicate that the family of peroxidoxins, very important for the host-parasite interactions may be in future a potential candidate vaccine molecules in some systems.

Key words: helminths, peroxidoxins properties, protozoans, vaccines.

W środowisku tlenowym stres oksydacyjny wynika z działania reaktywnych rodników tlenowych (ROS), które są generowane w bardzo wielu systemach biologicznych nawet w normalnych warunkach metabolicznych. Ponieważ ich wysokie stężenie wywołuje poważne defekty błon komórkowych, kwasów nukleinowych i białek, organizmy rozwinęły szereg mechanizmów ochrony przed szkodliwym działaniem ROS.

Nazwa peroksydoksyny (POD) została wprowadzona po raz pierwszy w 1994 roku przez Chae i wsp. (1994) dla opisanie ciągle powiększającej się rodziny kompleksów enzymatycznych o specyficznych właściwościach biologicznych, odmiennych od dotychczas poznanych enzymów antyoksydacyjnych. Większość z nich została opisana zupełnie ostatnio, a członkowie tej grupy są znani pod różnymi nazwami np. ABP – białko zwierzęcego blastomeru, AOP – białko antyoksydacyjne, Per 1 – peroksydoksyna 1, TSA – antyoksydant tiolo-specyficzny. Historycznie pierwszą opisaną peroksydoksyną była peroksydaza tioredoksyny (TPx) nazywana również antyoksydantem tiolo-specyficznym, wykryta u *Saccharomyces cerevisiae*, gdzie jej ekspresja może zostać wywołana przez działanie stresu oksydacyjnego. POD nie wykazują aktywności podobnej do aktywności dobrze znanych enzymów



Rys. 1. Redukcja nadtlenu przez peroksydazę tioredoksyny skutkuje powstaniem wiązań dwusiarczkowych, które są regenerowane poprzez przeniesienie elektronów z NAD(P)H. W proces ten są zaangażowane dwa białka: reduktaza tioredoksyny i tioredoksyna (a). Bakteryjny AhpC jest regenerowany po redukcji nadtlenu poprzez transfer elektronów z NAD(P)H poprzez pojedyncze białko AhpF, (b). 1-Cys peroksydoksyny, takie jak *O. volvulus* 1 i Orf6 nie posiadają Cys 170; ich aktywność katalityczna jest utrzymywana przez małą cząsteczkę chemiczną tiolu takiego jak ditiotriol (DTT) (c) (wg Mc Gonigle i wsp. 1998)

antyoksydacyjnych i nie zawierają atomów metali takich jak Fe, Mn albo Cu-Zn niezbędnych dla pełnej aktywności tych ostatnich.

Działanie antyoksydacyjne POD polega, przynajmniej częściowo, na ich zdolności do rozkładu hydroksynadtlenków alkilowych i H_2O_2 , co zapobiega tworzeniu się groźnych rodników wodorotlenowych. W mechanizm ich działania katalitycznego włączona jest konserwatywna cysteina (Cys 47) aktywna w reakcjach redox.

Wiele genów odpowiedzialnych za tworzenie POD jest zlokalizowanych u Prokaryota w pobliżu genów kodujących białka o innej aktywności redox, np. u *Metanobacterium* gen ten jest położony powyżej genu kodującego aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). U Eukaryota występuje cały szereg POD; u ludzi zidentyfikowano przynajmniej pięć z nich. Sekwencjonowanie znanych POD wykazuje, że opierając się na obecności jednej lub dwóch grup wysoce konserwatywnych reszt cysteiny, odpowiadających Cys 47 i Cys 170 u TPx u drożdży, można je podzielić na 2 grupy (Rys. 1). Podobieństwo pomiędzy tymi dwoma grupami POD rozciąga się wzdłuż całej długości sekwencji i waha się w granicach 20–99%. POD znaleziono u archebakterii, co wskazuje na ich bardzo stare pochodzenie. POD 2-Cys posiadają dwa konserwatywne regiony, natomiast członkowie grupy 1-Cys nie posiadają reszty Cys 170. Poza tym różnią się one sekwencjami w konserwatywnych regionach otaczających Cys 47.

1-Cys POD są reprezentantami oryginalnych genów naszych przodków. Są one, po hemoglobinie, białkami najliczniej występującymi w erytrocytach. Fakt, że geny te są tak dobrze zachowane sugeruje ich fundamentalną funkcję w utrzymaniu homeostazy oksydacyjnej.

MECHANIZM DZIAŁANIA PEROKSYDOKSYN

U *Saccharomyces cerevisiae* peroksydazy tioredoksyne (TPx) wykazują funkcję ochronną przed zniszczeniami wywołanymi przez ROS. Mutanty z uszkodzonym genem odpowiedzialnym za syntezę TPx rosną gorzej. TPx ochraniają białko w systemach utleniających z udziałem katalitycznego Fe używając jako reduktora tiolu, ale nie działają w systemach, w których tiol zastępowany jest przez inny reduktor, taki jak np. askorbinian. Wydaje się, że tiol może redukować wiązanie dwusiarczkowe w TPx uaktywniając w ten sposób ten enzym. TPx drożdży jest homodimerem o podjednostkach 25kDa połączonych dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi pomiędzy Cys 47 i 170. Celowana mutageneza wykazała, że w każdej podjednostce redukcji nadtlenu towarzyszy oksydacja Cys47 SH z wytworzeniem kwasu, który reaguje z Cys 170 SH drugiej podjednostki, tworząc intermolekularne wiązania dwusiarczkowe. System ten wykazuje podobieństwo do systemu zasadowej reduktazy nadtlenu wodoru (Ahp) u *S. typhimurium*, który składa się z peroksydoksyne 2-Cys, AhpF i FAD-zależnej dehydrogenazy NAD(P)H (Rys. 1).

Badania Netto i wsp (1996) wskazywały, że porównanie 2-Cys TPx u drożdży i 1-Cys peroksydoksyny Orf6 ssaków prowadzi do następującego wniosku: 2-Cys POD są redukowane zgodnie z mechanizmem wymagającym albo pojedynczego białka (np. Ahp 7) albo 2 białek (np. reduktazy tiol-redoksyny i tioredoksyny), a 1-Cys POD wymagają tylko jednej małej cząsteczki reduktora chemicznego.

ANTYOKSYDANTY U PASOŻYTÓW

U pasożytów zaproponowano podwójną rolę antyoksydantów: (1) rolę ochronną przed ROS produkowanymi w reakcjach metabolicznych, (2) rolę ochronną przed ROS wydzielanymi przez komórki efektorowe systemu immunologicznego żywiciela.

Jest faktem ogólnie znanym, że eozynofile, neutrofile i makrofagi są głównym źródłem antyoksydantów, które mogą zniszczyć komórkę, a nawet cały organizm. Wszystkie pasożytnicze pierwotniaki i helminty badane do tej pory zawierają przynajmniej jeden z trzech głównych enzymów antyoksydacyjnych, do których należą: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalazy i peroksydazy glutationu. U wielu z nich obecność SOD występowała przy braku aktywności katalazy lub enzymów zależnych od glutationu. Mc Gonigle i wsp. (1998) sugerują, że nowa rodzina POD może być grupą enzymów detoksykujących H_2O_2 , pierwotnie nieuchwytnych, u tych pasożytów.

PASOŻYTNICZE POD

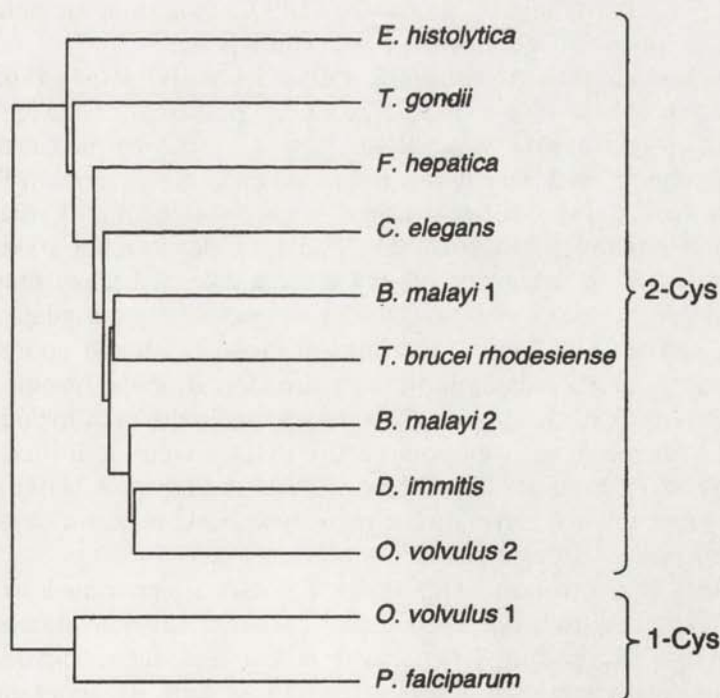
Szereg POD, zarówno u pierwotniaków jak i helmintów, odkryto w wyniku sekwencjonowania genów i użycia techniki EST (expressed sequence tag). Mc Gonigle i wsp. (1998) dla potrzeb swego artykułu przeglądowego wybrali dane pochodzące z odpowiednich baz danych i, opierając się na uszeregowaniu sekwencji aminokwasów, pogrupowali je jako typ 1-Cys albo 2-Cys. Kompletną sekwencję poznano do tej pory dla pięciu pasożytów: *Fasciola hepatica* (Mc Gonigle i wsp. 1998), *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Entamoeba histolytica* (Reed i wsp. 1992), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (El Sayed i wsp. 1995) i dla nicienia wolno żyjącego *Caenorhabditis elegans*. U *O. volvulus* i *B. malayi* wykryto dwa homologi, które w omawianym artykule przeglądowym są nazywane OvPxn1 i OvPxn2 i BmPxn1 i BmPxn2 (Tabela 1).

Porównując konserwatywne regiony cysteinowe w POD robaków pasożytniczych można sporządzić dendrogram, przedstawiony na Rys. 2, pokazujący podobieństwa między tymi sekwencjami w bloku 1 (Cys 47). U *Plasmodium falciparum* i *O. volvulus* występują 1-Cys peroksydoksyny i z przedstawionego dendrogramu wynika wyraźnie, że stanowią one osobną gałąź, oddzieloną od grupy 2-Cys POD. Najbardziej zbliżone do siebie sekwencje posiadają OvPx2 u *Dirofilaria immitis* i BmPxn2 (dane niepublikowane).

Tabela 1. Peroksydoksyne robaków pasożytniczych (wg Mc Gonigle i wsp. 1998)

Pasożyt	Źródło	Typ	Prawdopodobna rola/komentarze
<i>F. hepatica</i>	Biblioteka cDNA postaci dorosłych	2-Cys	Usuwanie H ₂ O ₂ , ochrona enzymów trawiennych
<i>S. mansoni</i> (fragment)	Sekwencja EST	2-Cys	
<i>O. volvulus</i> OvPxn1	Biblioteka cDNA postaci dorosłych	1-Cys	Lokalizacja w hypodermie u postaci dorosłych
OvPxn2	Sekwencja EST, biblioteka cDNA form L ₃	2-Cys	Lokalizacja na powierzchni pasożyta
<i>Brugia malayi</i> BmPxn1	Sekwencja EST, Biblioteka cDNA form L ₃	2-Cys	Lokalizacja w pniu nerwowym i hypodermie
BmPxn2	Sekwencja EST, Biblioteka cDNA form L ₃	2-Cys	
<i>Dirofilaria immitis</i>	Biblioteka cDNA form dorosłych	2-Cys	
<i>Caenorhabditis elegans</i> *	Sekwencja EST	2-Cys	

* nicien wolno żyjący, EST – sekwencja tag ulegająca ekspresji



Rys. 2. Dendrogram pokazujący ułożenie sekwencji w bloku konserwatywnych białek POD zawierających Cys 47. Nawiasy pokazują 2 oddzielne grupy peroksydoksyn 2-Cys i 1-Cys (wg Mc Gonigle i wsp. 1998)

POD helmintów są przedstawione w Tabeli 1.

Pierwszą zidentyfikowaną POD jest 2-Cys peroksydoksyna u *F. hepatica*. Podobnie jak inne przywry *F. hepatica* posiada silnie wykształcony mechanizm obronny przeciwko rodnikom O_2^- , w którym uczestniczy SOD, ale nie posiada aktywnej katalazy i GPx. Mc Gonigle i wsp. (1998) sugerują, że POD może być głównym enzymem antyoksydacyjnym odpowiedzialnym za eliminację H_2O_2 u tego pasożyta. POD są aktywnie wydzielane i to wskazuje, że mogą pełnić rolę w obronie przed ROS generowanymi przez cytotoksyczne komórki immunologiczne. Proteaza katepsyny L1 odgrywa ważną rolę w odżywianiu *F. hepatica* odbywającym się poprzez trawienie hemoglobiny. Uwolniony hem zostaje utleniony do stanu Fe^{++} , co generuje rodnik OH^- . Katepsyna L1 jest bardzo wrażliwa na inaktywację poprzez ROS, ale frakcja rozpuszczalna *F. hepatica* zapobiega inaktywacji zarówno jej, jak i innych enzymów trawieniowych. Wydaje się, że ten mechanizm może być bardzo ważny dla wzrostu, rozwoju i przeżywania nie tylko motylicy ale i innych pasożytów, które odżywiają się ludzką krwią.

Sklonowanie POD z *F. hepatica* nastąpiło z użyciem surowic z krów szczepionych antygenami ekskrecyjno-sekrecyjnymi o wysokim ciężarze cząsteczkowym. Ponieważ szczepionki te wykazywały wysoką (42%) ochronę przeciwko inwazji, wydaje się, że cząsteczki POD mogą stać się potencjalnymi składnikami przyszłej szczepionki przeciwmotyliczej.

U *Onchocerca volvulus* istnieją 2 POD: 1-Cys. (OvPxn1) zlokalizowana w hypodermie robaków co wskazuje, że nie jest prawdopodobne jej wydalanie, i OvPxn2 zlokalizowana w przelyku larw L3 oraz na powierzchni larw, dorosłych i mikrofilarii. Te ostatnie nabywają na swej powierzchni POD kiedy przechodzą przez górny odcinek macicy bogaty w te białka. Wydalanie POD z przewodu pokarmowego i ich lokalizacja na powierzchni styku żywiciela-pasożyta sugeruje, że mogą one odgrywać dużą rolę w mechanizmach obronnych. Dorosłe robaki, które przebywają w guzach nie posiadają natomiast POD na powierzchni. Może to świadczyć raczej o ich roli „porządkującej” (housekeeping). POD zidentyfikowano również u *B. malayi* i obie należą do typu 2-Cys, a zlokalizowane zostały wyłącznie w komórkach hypodermy i pni nerwowych. Istnienie różnych homologów POD u tych filarii i ich odmienna lokalizacja w różnych stadiach rozwojowych sugerują, że białka te zostały zaadaptowane, tak aby odpowiadać różnym warunkom stresu oksydacyjnego jakie napotykają w czasie rozwoju.

W Tabeli 2 zestawiono POD zbadane dotąd u pierwotniaków. W czasie fazy erytrocytarnej rozwoju *Plasmodium* zachodzi aktywne trawienie hemoglobiny (Hb) i uwalnianie w tym czasie potencjalnie niszczycielskiego hemu. W kwaśnych wodniczkach odżywczych Hb utlenia się spontanicznie wytwarzając przy tym rodnik O_2^- , który gwałtownie dysmutuje do H_2O_2 . Utlenianie Fe^{+++} hemowego do stanu Fe^{++} również tworzy ROS. Aby temu się przeciwstawić *P. falciparum* wytworzył mechanizm obrony, który obejmuje

Tabela 2. Peroksydoksyiny pierwotniaków (wg Mc.Gonigle i wsp. 1998)

Pasożyt	Źródło	Typ	Prawdopodobna rola/komentarze
<i>P. falciparum</i> (fragment)	Sekwencja EST	1-Cys	Ochrona przed ROS powstającymi podczas trawienia hemoglobiny
<i>E. histolytica</i>	Biblioteka cDNA, biblioteka genomowa	2-Cys	Unikalne epitopy ulegają ekspresji u peroksydoksyn izolatów patogennych
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Sekwencja EST	2-Cys	
<i>T. gondii</i>	Sekwencja EST	2-Cys	

wychwytywanie SOD żywiciela, który pasożyt zagęszcza w swoich wakuolach trawiennych. Rodniki OH_2^- są zamieniane w H_2O_2 eliminowaną później przez nieznaną enzym. Tym nieznanym enzymem mogą być POD i dalsze badania nad nimi u *P. falciparum* mogą być bardzo istotne, ponieważ wiele związków przeciwmalarycznych swoją skuteczność zawdzięcza współdziałaniu ze zjawiskiem wewnątrz Pasożytniczego stresu oksydacyjnego. Większość sekwencji POD z banku danych zgromadzonych w ramach *P. falciparum* Genom Project świadczy o tym, że należą one do grupy 1-Cys. Stąd glutation, którego zawartość w ludzkich krwinkach jest duża, może być dla nich niskocząsteczkowym reduktorem chemicznym.

Ostatnio u *Crithidia fasciculata* opisano system peroksydazy trypanotyonu (Tetaud i Fairlamb 1998). Ta 2-Cys POD jest regenerowana przez system zawierający 3 białka: tryparedoksynę (Alphey i wsp. 1999), trypanotyon i reduktazę trypanotyonu.

U *Entamoeba histolytica* POD zostały zlokalizowane przy użyciu specyficznych przeciwciał monoklonalnych w jądrze i cytoplazmie. Późniejsze badania dowiodły jednak, że POD istnieją również na powierzchni pasożyta i obecnie postuluje się, że ich prekursorami mogą być POD zlokalizowane w cytoplazmie. Monoklonalne przeciwciała uzyskane przeciwko patogenicznym szczepom *E. histolytica* wykazały, że reaktywną komponentą jest tu POD o ciężarze 29kD (Flores i wsp. 1993). Jednak należy zaznaczyć, że geny kodujące POD u *E. histolytica* są obecne zarówno u izolatów patogennych jak i niepatogennych. Porównanie sekwencji aminokwasowej POD tych szczepów wskazuje na różnicę tylko 4,5% ale oczywiście nie wiadomo, czy właśnie POD są odpowiedzialne za ich patogeniczność lub niepatogeniczność. Nie wykryto antygenów specyficznych dla form patogennych, ale istnieją ilościowe różnice w ekspresji określonych białek, np. zachodzi 10–100 krotnie silniejsza ekspresja genów proteazy cysteinowej w izolatach patogennych. U *E. histolytica* wykryto obecność SOD, ale nie ma danych jakim mechanizmem jest inaktywowana H_2O_2 produkowana przez dysmutację O_2^- . Trofozoity *E. histolytica*

rosną w hodowli bez dodatku glutationu, nie zawierają peroksydazy glutationowej (GPx) i nie wykazują aktywności katalazy. Wydaje się więc, że właśnie POD mogą tu funkcjonować po to aby usuwać H_2O_2 i inne alkilowe hydroksynadtlenki.

POD *Entamoeba histolytica* wydają się być obiecującymi kandydatami na składniki przyszłych szczepionek i rzeczywiście kilka lat temu Soong i wsp. (1995), używając zrekombinowanego antygeny *E. histolytica* w próbach szczepienia gerbili uzyskiwali zmniejszenie (o 54%) tworzenia się ropni wątroby.

W POD w 1994 roku, kiedy to uzyskały one po raz pierwszy własną nazwę, wykryto około 33 sekwencji, a obecnie w genetycznym banku danych jest ich około 200. Przy tak gwałtownym wzroście liczby takich danych możemy oczekiwać ekscytującego rozwoju badań w dziedzinie poznawania tej nowej rodziny antyoksydantów o dużym potencjale aplikacyjnym, jako przyszłe szczepionki przeciw pasożytnicze.

LITERATURA

- Alphey M.S., Tetaud E., Gourley D.G., Fairlamb A.H., Hunter W.N. 1999. Crystallization of recombinant *Crithidia fasciculata* tryparedoxin. *Journal of Structural Biology* 126: 76–79.
- Chae H.Z., Robinson L.B., Poole L.B., Church G., Storz G. 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 91: 7017–7021.
- El Sayed N.M.A., Alarcon C.M., Beck J.C., Sheffield V.C., Donelson J.E. 1995. CDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73: 75–90.
- Flores S.B.M., Reed S.L., Ravdin J.I., Torian B.E. 1993. Serologic reactivity to purified recombinant and native 29kDa peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1403–1407.
- Mc Gonigle S., J.P. Dalton & James E.R. 1998. Peroxidoxins: A new antioxidant family. *Parasitology Today* 14: 139–145.
- Netto I.E.S., Chae H.Z., Won Kang G.S., Goo Rhee S., Stadtman E.R. 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15315–15321.
- Reed S.L., Flores B.M., Batzer M.A., Stein M.A., Stroehrer V.J., Carlone J.E., Diedrich D.J., Torian B.E. 1992. Molecular and cellular characterization of the 29kDa peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infections Immunity* 60: 542–549.
- Soong G.J.G.B., Torian B.E., Abd-Alla M.D., Jackson T.F.H.G., Gatharim V., Ravdin J.I. 1995. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29kDa antigen. *Infections Immunity* 63: 472–477.
- Tetaud D.E., Fairlamb A.H. 1998. Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 96: 111–123.