

## Białka wydzielnicze *Giardia duodenalis* – charakterystyka i rola w biologii pasożyta

Dorota Zysiak

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

**ABSTRACT. Secreted proteins of *Giardia duodenalis* – characteristic and role in biology of the parasite.** The article presents the current knowledge on the proteins under question. The first analysed E-S products released by *G. duodenalis* was a polydisperse hydrophobic complex (16.5-225 kDa), protease VI sensitive, chloroform-methanol insoluble. Based on inhibition studies cysteine protease and metalloprotease were detected in the complex. The further analysis revealed that a 58 kDa heat stable as well as protease sensitive glycoprotein secreted by *G. duodenalis* trophozoites is highly immunogenic for the hosts. Before encystation, *G. duodenalis* trophozoites secrete leucine-rich cyst wall proteins: CWP1, CWP2 and CWP3. Steady-state levels of CWPs gene transcripts are low in non-encysting trophozoites but increase more than 100-fold during encystation. Another protein, which expression also increases during encystation is gGSP (Giardia Granule-Specific Protein). The protein possesses typical structure of calcium-binding proteins. Inhibition of gGSP expression abolishes cyst wall formation, suggesting that this protein regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent degradation of encystation-specific secretory vesicles (ESVs) during cyst wall formation.

**Key words:** *Giardia duodenalis*, excretory-secretory proteins.

### Wstęp

*Giardia duodenalis* jest pierwotniakiem pasożytującym na komórkach nabłonkowych jelita cienkiego ludzi i innych ssaków. Pasożyt ten stanowi główną przyczynę wodnopochoodnych biegunek w Stanach Zjednoczonych [1] i Europie. Jest jednym z 10 pasożytów najczęściej wywołujących choroby u ludzi. Około 200 milionów ludzi w Azji, Afryce i Ameryce Łacińskiej cierpi na giardiozę, a corocznie dochodzi nawet do 500 tysięcy nowych zarażeń [2, 3].

W cyklu życiowym *Giardia duodenalis* występują dwa stadia rozwojowe: cysta o długości 10-12 µm, która jest formą inwazyjną, i trofozoit o długości około 15 µm i kształtu łzy, który ma dwa jądra, tarczę przyssawkową, dwa ciała pośrodkowe oraz cztery pary wici. Cysty *Giardia* są niewrażliwe na działanie wielu naturalnych czynników środowiska, a także na środki dezynfekujące stosowane do uzdatniania wody, toteż w zimnej wodzie mogą zachować żywotność nawet przez kilkanaście miesięcy [4]. Do zarażenia dochodzi po połknięciu cyst *Giardia*, zazwyczaj z zanieczyszczoną wodą. W je-

licie cienkim dochodzi do ekscystacji, w wyniku czego z jednej cysty powstają dwa trofozoity, które namnażają się przez podział podłużny [4, 5].

*Giardia duodenalis* może powodować rozmaite objawy kliniczne o różnym nasileniu. U niektórych osób giardioza przebiega bezobjawowo. Natomiast u pozostałych osób występują różne objawy ze strony układu pokarmowego (ostre lub przewlekłe biegunki, brak łaknienia, zespół złego wchłaniania); giardioza bywa przyczyną reakcji alergicznych [3, 6, 7, 8].

Jak wynika z ostatnich badań [4] *Giardia duodenalis* ma zdolność zarażania wielu gatunków ssaków (Tabela 1), jednakże pełny krąg potencjalnych żywicieli pozostaje nieznany. Ciągłe prowadzone są badania nad możliwością transmisji *G. duodenalis* ze zwierząt domowych i hodowlanych na ludzi, gdyż zwierzęta te mogą być istotnym rezerwuarem tego pasożyta.

Dobrze poznanymi białkami *G. duodenalis* są białka antygenowe takie jak giardina, białka cytoszkieletu, białka szoku cieplnego oraz niektóre białka bogate w cysteinę [3, 9, 10]. Poznana jest też gru-

pa lektyn błonowych, które odgrywają istotną rolę w rozpoznawaniu komórek nabłonkowych jelita i przyleganiu do nich. Trofozoity *G. duodenalis* wytwarzają VSPs (variant surface proteins). Funkcja tych białek nie jest jeszcze do końca scharakteryzowana, ale przypuszcza się, że odgrywają istotną rolę w interakcjach pasożyt-żywiciel [3, 11]. Część VSPs ulega sekrecji, jednak ich sekrecyjna funkcja w regulacji infekcji nie została jeszcze określona [1, 12].

**Tabela 1.** Pochodzenie izolatów *Giardia duodenalis* [4]  
**Table 1.** The provenience of *Giardia duodenalis* isolates (according to [4])

Genotyp	Żywiciele
Grupa A	ludzie, psy, koty, bobry
Grupa B	ludzie, szynszyle, psy, szczury, bobry
Pies	psy
Kot	koty
Zwierzęta hodowlane	bydło, świnie, owce, kozy
Szczur	szczury
Dzikie gryzonie	piżmaki, norniki

Chęć poznania interakcji pasożyt-żywiciel oraz mechanizmów i przebiegu procesu encystacji skłoniła naukowców do bardziej intensywnych badań białek wydzielniczych mogących mieć istotne znaczenie w analizie tego procesu oraz w interakcji pomiędzy żywicielem a pasożytem.

### Białka ekskrecyjno-sekrecyjne

Identyfikacja i charakterystyka produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych (ES) może doprowadzić do zrozumienia biologii pasożyta, a także interakcji pasożyt-żywiciel. Pionierami badań nad tymi białkami byli w przypadku *G. duodenalis* Nash i wsp. [1]. Badane przez nich produkty ES zbierane były z podłoża TYI-S-33, w którym uprzednio hodowany był pasożyt. Określili oni główną grupę tych produktów, których masa zawiera się w przedziale od 94 do 225 kDa, oraz pojawiające się niekiedy produkty z zakresu od 16,5 kDa do 94 kDa. Autorzy wykazali obecność aminokwasów oraz węglowodanów i tłuszczów, jednak próby potwierdzenia obecności grup cukrowych nie powiodły się. Stwierdzono również hydrofobowy charakter badanej grupy białek. Wszystkie badania sugerują, że białka te w przeważającej części mogą być lipoproteinami. Przeprowadzono również testy porównujące dwa izolaty *Giardia* WB i P-1. Użyto przeciwciał królik anti-*G. lamblia* i koza anti-*G. lamblia* do wykrycia

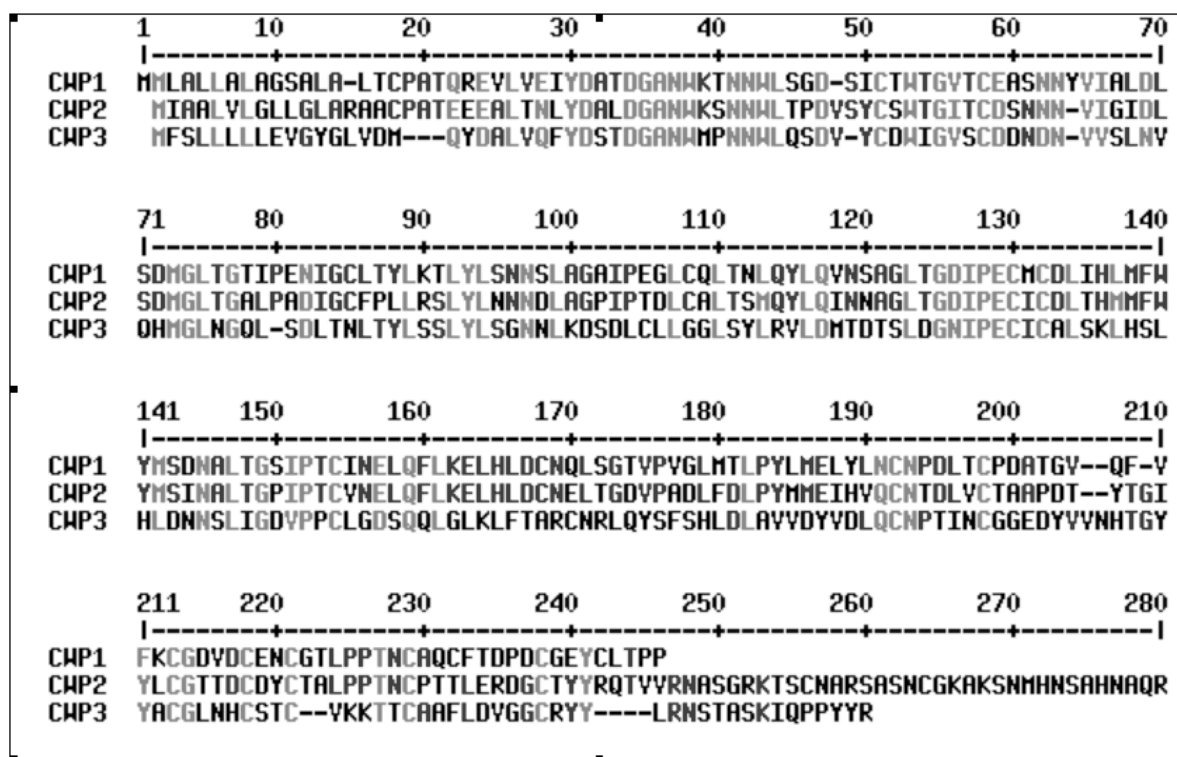
produktów ES. Okazało się, że szczepy te różnią się od siebie pod względem wytwarzanych antygenów [1].

Dalsze badania prowadzone przez Jimenez i wsp. [13] skupiły się na produktach ES uzyskiwanych z podłoża, na którym hodowany był szczep *G. duodenalis* P-1. Elektroforeza tych produktów na żelu poliakrylamidowym ujawniła 6 białek o masie 36, 59, 63, 72, 103 i 175 kDa. Udowodniono również, iż proteolityczne białka błonowe (16, 20, 66, 82, 108, i 120 kDa) różnią się od ekskrecyjno-sekrecyjnych. W wyniku dalszych analiz zidentyfikowano trzy białka ES. Dwa z nich to proteiny cysteinowe o masie 59 kDa i 63 kDa. Ich funkcja biologiczna nie jest jeszcze poznana, ale przypuszcza się, że mogą brać udział w mechanizmie różnicowania pasożyta lub mogą być odpowiedzialne za zmiany śluzówki jelita cienkiego. Prawdopodobnie białka te związane są z procesem ekscystacji. Paget i James [14] sugerują, że omawiane enzymy mogą ułatwiać poruszanie się pasożyta przez nabłonek jelita. Jimenez i wsp. [13] stwierdzili również obecność metaloproteazy o masie 36 kDa. Przypuszczali oni, że jest to metaloproteaza cynkowa. Nie wykryli natomiast proteaz serynowych i asparaginianowych.

Kolejne etapy badań skupiły się na identyfikacji i charakterystyce białka ESP (excretory-secretory product) o masie 58 kDa uzyskanego z podłoża TYI-S-33, w którym hodowany był pasożyt [3]. Proteina ta okazała się odporna na wysoką temperaturę (denaturacja powyżej 80°C) i wrażliwa na proteazy (trypsynę, pepsynę i pronazę). Wykazuje ona właściwości hemolityczne. Z analiz wynika, że ESP jest glikoproteiną [15], której N-terminalny koniec ma następującą sekwencję aminokwasową: AD-FVPQVST [3]. Przeprowadzono także badania pod kątem toksyczności. Wynika z nich, że ESP jest białkiem toksycznym, wchodzącym w reakcje krzyżowe z podjednostką toksyny cholery. Nie wywołało ono jednak zmian histologicznych u myszy, ale wywoływało zmiany morfologiczne w komórkach Hep-2 [3]. Białko to znajduje się głównie na powierzchni trofozoitów. Prawdopodobnie po zsyntetyzowaniu w cytoplazmie trafia na powierzchnię błony komórkowej pasożyta, a w końcu zostaje uwolnione jako ESP [15].

### Białka biorące udział w procesie encystacji

Mechanizm formowania się ściany cysty *Giardia* nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo,



Rys. 1. Porównanie sekwencji białek CWP1, CWP2 i CWP3 metodą Corpet [26]

Fig. 1. The comparison of the sequence of CWP1, CWP2 and CWP3 proteins with the Corpet's method [26]

że zmiany zachodzące w trofozoicie prowadzą do syntezy i uwalniania wydzielniczych komponentów wchodzących w skład ściany cysty. Do tego typu produktów należą białka CWP 1, CWP2 i CWP3 (cyst wall protein). Geny *cwp1*, *cwp2* i *cwp3* kodują białka o masie odpowiednio 26, 39 i 27,3 kDa, kierowane na szlak sekrecyjny przez N-końcowy peptyd sygnałny. Białka te mają pojedyncze miejsce glikozylacji. Wszystkie 14 cystein występujących w białku CWP3 znajduje się w tym samym miejscu co w białkach CWP1 i CWP2. Obydwa te białka (CWP1 i CWP2) mają jeszcze dodatkowo po kilka cystein, z czego tylko 2 znajdują się w miejscach konserwatywnych. CWP1 i CWP2 posiadają 5 regionów bogatych w leucynę (LRR – leucine-rich repeats), natomiast CWP3 ma tylko 4 kompletne regiony tego typu. Każdy z regionów LRR składa się 23-24 aminokwasów, z czego 7 to aminokwasy hydrofobowe. Piąty region LRR białka CWP3 jest niekompletny, z tylko trzema miejscami hydrofobowymi. W związku z tą rozbieżnością, białko to wykazuje odpowiednio 34 i 36% podobieństwo do CWP1 i CWP2 w obrębie LRR. Pomimo tych różnic białka CWPs są podobne do siebie w 61% w komplementarnych regionach bogatych w cysteinę i regionach LRRs (Rys.1) [16, 17, 18].

Obecność regionów bogatych w leucynę (LRRs)

sugeruje, że białka te są składnikiem ściany cysty. Motywy LRRs występujące w CWPs są charakterystyczne dla powierzchniowych białek adhezyjnych [16, 17, 18]. Sekwencje LRR obecne w tych białkach są zbliżone do sekwencji obecnych w roślinnych białkach śródbłonowych [17, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

Białka CWPs w trofozoitach znajdują się na granicy błony komórkowej w ESVs (encystation secretory vesicles). Po przeprowadzeniu szeregu analiz okazało się, że CWP1 i CWP2 tworzą stabilny kompleks o masie 65 kDa natomiast CWP3 występuje samodzielnie. Białka te zakotwiczą się w ścianie cysty po skierowaniu ich na szlak sekrecyjny podczas procesu encystacji. Badania sugerują, że kompleks CWP1-CWP2 w bardzo istotny sposób stabilizuje ścianę cysty [16, 17, 18].

Wykorzystując analizę delecyjną stwierdzono, że peptyd sygnałny i LRR są konieczne do kierowania białek do ESV a potem do ściany cysty. Po usunięciu C-terminalnego odcinka, białka prawidłowo gromadziły się w ESV, ale nie zakotwiczyły się w ścianie cysty. Natomiast usunięcie 44 aminokwasów pomiędzy peptydem sygnałnym a regionem LRR powodowało 50% zmniejszenie liczby komórek z białkami CWP kierowanych do ESV i ściany cysty [18].

Ekspresja CWPów utrzymuje się w trofozoicie na niskim poziomie, dopiero tuż przed encystacją ilość produktów genów CWPów zwiększa się 100-krotnie. Białka te przechodzą w czasie encystacji znaczne modyfikacje potranslacyjne. Są to: wytwarzanie mostków dwusiarczkowych, proteolityczne przetwarzanie peptydu sygnałowego oraz oderwanie C-terminalnego końca o masie 13 kDa w przypadku białka CWP2 [17].

Kolejnym ważnym białkiem wydzielniczym, biorącym także udział w encystacji, jest białko wiążące wapń gGSP (*Giardia Granule-Specific Protein*). Gen *gGSP* koduje białko o masie 54 kDa (480 aminokwasów). Tak, jak w przypadku większości genów *G. duodenalis*, okazało się, że nie zawiera on intronów. Hydrofobowy N-terminalny odcinek koduje najprawdopodobniej peptyd sygnałowy kierujący białko na szlak sekrecyjny, jak ma to miejsce u wyższych eukariontów. C-terminalna domena bogata w Asp/Glu jest homologiczna do domeny białek wiążących jony wapnia typu kalsekwestryn, co sugeruje, że jest ona odpowiedzialna za wiązanie tego pierwiastka. Analizowana sekwencja aminokwasowa gGSP zawiera również region bogaty w aminokwasy zasadowe (RRLRLVPQRKSRRRID-KRKR). Interesujące jest to, że u wyższych eukariontów sekwencja taka stanowi cel dla enzymów proteolitycznych znajdujących się w aparatach Golgiego [25].

Podobnie jak w przypadku białek CWPów, również w przypadku białka gGSP jego ilość znacznie wzrasta w czasie procesu encystacji. Wzrost ekspresji analizowanego białka obserwowany podczas encystacji regulowany jest najprawdopodobniej na poziomie transkrypcji lub podyktowany jest stabilnością i trwałością mRNA [25].

Inhibicja ekspresji białka gGSP nie powoduje zaburzeń w formowaniu się i podziałach trofozoitów. Nie wstrzymuje wytwarzania białek CWPów, tworzenia się ich stabilnych kompleksów i gromadzenia się w ESVs. Hamuje natomiast całkowicie formowanie się cyst przez zahamowanie wydzielania się CWPów do ściany cysty [25].

Poznanie wyżej omówionych białek wydzielniczych *Giardia duodenalis* umożliwiło częściowe poznanie procesu encystacji, dzięki któremu pierwotniak może przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiska. Aby lepiej poznać ten skomplikowany proces konieczne są dalsze analizy biochemiczne białek biorących w nim udział, określenie ich lokalizacji i szlaków metabolicznych, w których uczestniczą.

## Podziękowania

Autorka dziękuje Pani prof. dr hab. Halinie Wędrychowicz za wskazanie tematu i weryfikację manuskryptu.

## Literatura

- [1] Nash T.E., Gillin F.D., Smith P.D. 1983. Excretory-secretory products of *G. lamblia*. *Journal of Immunology* 131: 2004-2010.
- [2] Upcroft J., Upcroft P. 1998. My favourite cell: *Giardia*. *Bioassays* 20: 256-263.
- [3] Shant J., Bhattacharyya S., Ghosh S., Ganguly N.K., Majumdar S. 2002. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* 102: 178-186.
- [4] Lane S., Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 123-147.
- [5] Ortega Y.R., Adam R.D. 1997. *Giardia* overview and update. *Clinical Infection Disease* 25: 545-550.
- [6] Farthing M.J.G., Mata L., Urrutia J.J., Kronmal R.A., 1986. Natural history and *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *American Journal of Clinical Nutrition* 43: 393-403.
- [7] Sullivan P.B., Marsh M.N., Phillips M.B. 1991. Prevalence and treatment of *Giardiasis* in chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of Diseases in Childhood* 60: 152-158.
- [8] Olson M.E., Ceri H., Morck D.W. 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitology Today* 16: 213-218.
- [9] Char S., Shetty N., Narasimha M., Elliot E., Macaden R., Farthing M.J.G. 1991. Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57 kDa antigen. *Parasite Immunology* 13: 329-337.
- [10] Thompson R.C.A., Hopkins R.M., Homan W.L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today* 16: 210-213.
- [11] Papanastasiou P., Bruderer T., Li Y., Bommelic C., Kohler P. 1997. Primary structure and biochemical properties of a variant specific surface protein of *Giardia*. *Molecular and Biochemistry Parasitology* 86: 13-27.
- [12] Hiltbold A., Frey M., Hulsmeier A., Kohler P. 2000. Glycosylation and palmitoylation are common modifications of *Giardia* variant surface proteins. *Molecular and Biochemistry Parasitology* 109: 61-65.
- [13] Jimenez J.C., Uzcanga G., Zambrano A., Di Prisco M.C., Lynch N.R. 2000. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *Journal of Parasitology* 86: 859-862.
- [14] Paget T.A., James S.L. 1994. The mucolytic activity of polyamides and mucosal invasion. *Biochemical So-*

- ciety Transactions* 22: 394.
- [15] Kaur H., Ghosh S., Samar H., Vinayak V.K., Gangu-ly N.K., 2001. Identification and characterization of excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology* 123: 347-356.
- [16] Mowatt M.R., Lujan H.D., Cotton D.B., Bowers B., Yee J., Nash T.E., Stibbs H.H. 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Molecular Microbiology* 15: 955-963.
- [17] Lujan H.D., Mowatt M.R., Conrad J.T., Bowers B., Nash T.E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 29307-29313.
- [18] Sun C.H., McCaffery J.M., Reiner D.S., Gillin F.D. 2003. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 13: 21701-21708.
- [19] Chang C., Schaller G.E., Patterson S.E., Kwok S.F., Meyerowitz E.M., Bleecker A.B. 1992. The TMK1 gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* 4: 1263-1271.
- [20] Stotz H.U., Powell A.L., Damon S.E., Greve L.C., Bennett A.B., Labavitch J.M. 1993. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiology* 102: 133-138.
- [21] Walker J.C. 1993. Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 3: 451-456.
- [22] Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J., Jones J.D.G. 1994. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-793.
- [23] Steinmayr M., Motte P., Sommer H., Saedler H., Schwarz-Sommer Z. 1994. FIL2, an extracellular Leucine-Rich Repeat protein, is specifically expressed in *Antirrhinum* flowers. *Plant Journal* 5: 459-467.
- [24] Rubinstein A.L., Broadwater A.H., Lowrey K.B., Bendinger P.A. 1995. Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 11: 3086-3090.
- [25] Touz M.C., Gottig N., Nash T.E., Lujan H.D. 2002. Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 50557-50563.
- [26] Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.

*Zaakceptowano 15 lutego 2005*